

Doktorarbeit

**Einfluss der intraamniotischen IGF-1-Applikation auf die
Lungenentwicklung von Rattenfeteten mit Nitrofen-
induzierter kongenitaler Zwerchfellhernie**

eingereicht von

Michael Stefan Haader

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor(in) der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

unter der Anleitung von

**Ass.-Prof. Priv.-Doz. Dr.med.univ. Philipp Klaritsch
und Dr.rer.nat. Ursula Hiden**

Ort, Datum: Graz, am 01. 04. 2012

Unterschrift

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 01. 04. 2012

Unterschrift

Vorwort

Die *angeborene Zwerchfellhernie*¹ kommt mit einer Häufigkeit von etwa einer auf 2500 Schwangerschaften vor.

Sie führt bei den betroffenen Neugeborenen u. a. zu *pulmonaler Hypoplasie*² und *Lungenhochdruck* [1]. Hypoplastische Lungen sind kleiner und weisen ein reduziertes Gewicht auf, die Anzahl an Alveolen und deren Größe ist verringert und die Lungen weisen veränderte Gefäße auf. Sie können daher den Gasaustausch nicht, oder nur unzureichend bewerkstelligen und es kommt in der Folge zur *Ateminsuffizienz* und zu möglichem *Atemversagen*.

Die Mortalitätsrate, die mit der Lungenhypoplasie assoziiert ist, variiert breit, liegt aber bei etwa 50%.

Schätzungsweise kommt es in etwa einer von 2000 Schwangerschaften aufgrund einer CDH zu einem vorgeburtlichen Tod des Fetus [2,3].

Obwohl die Ätiologie der CDH noch nicht vollständig geklärt ist, gibt es eine Reihe von Theorien bezüglich ihrer Pathogenese, die in der folgenden Einführung genauer erläutert werden sollen.

Die vorliegende experimentelle Studie wurde im Rahmen des EU-Projektes „*Increase Lung Growth 08*“ durchgeführt. Ziel war es, die Wirkung von *intraamniotisch*³ appliziertem humanem IGF-1⁴ auf die hypoplastischen Lungen von Rattenfeteten mit einer Nitrofen-induzierten Zwerchfellhernie zu untersuchen.

So sollte diese Intervention in Hinblick auf eine eventuelle zukünftige Behandlungsmöglichkeit der humanen fetalen Lungenhypoplasie genauer untersucht und ihre Auswirkung auf das fetale Lungenwachstum in Qualität und Quantität ergründet und dokumentiert werden.

¹ CDH (engl.): *congenital diaphragmatic hernia*, angeborene Zwerchfellhernie

² Unterentwicklung und Unreife der kindlichen Lunge

³ in das fetale Fruchtwasser

⁴ *Insulin-like growth factor 1*

Danksagung

Ich möchte mich an erster Stelle ganz herzlich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Philipp Klaritsch, für die freundliche Betreuung bedanken! Er stand mir stets mit Rat und Hilfe zur Seite und war immer sehr bemüht, mir bei der Lösung der verschiedenen Probleme zu helfen. Er hat mich mit sehr viel Geduld in die Arbeit im Tierlabor eingeführt und mich bei dieser für mich ganz neuen und auch nicht einfachen Herausforderung bestmöglich unterstützt.

Ganz besonders möchte ich Prof. Klaritsch auch für die Ermöglichung meiner Teilnahme am Kurs „Einführung in die Labortierkunde“ (FELASA Kategorie B) an der Veterinärmedizinischen Universität Wien danken. Dadurch wurde mir der Einstieg in die Arbeit im Tierlabor erheblich erleichtert!

Sehr herzlich möchte ich auch meiner Betreuerin, Frau Dr. Ursula Hiden, für ihren unermüdlichen Einsatz danken! Sie hat mich mit viel Geduld in die PCR-Analyse eingeführt und mich immer wieder mit ihren Ratschlägen bei der Erstellung dieser wissenschaftlichen Arbeit unterstützt und sich für meine Betreuung sehr viel Zeit genommen. Durch ihr großes Engagement bei der Beantwortung meiner Fragen und der Lösung meiner Probleme hat sie mir immer wieder Zuversicht und sehr viel Freude an der Forschung vermittelt!

Meinen ganz herzlichen Dank möchte ich auch Frau Anna Kuess aussprechen!

Sie hat sich stets mit sehr großem Einsatz und mit viel Liebe und Fleiß um die Anfertigung der Gewebeschnitte und der immunhistochemischen Färbungen gekümmert und mich mit ihrem Rat und ihrer unerschöpflichen Geduld in die Immunhistochemie eingeführt. Ohne ihr beachtliches Engagement wäre die Durchführung dieses Projekts sicher nicht in dieser Form möglich gewesen!

Ich möchte mich an diese Stelle auch bei Herrn Prof. Amulya Saxena und Herrn Prof. Uwe Lang für die Ermöglichung des Projektes und bei Herrn Prof. Gernot Desoye für die Möglichkeit der Durchführung meiner Analysen im Labor der Frauenklinik sehr herzlich bedanken!

Meinen sehr großen Dank möchte ich auch den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors der Frauenklinik Graz aussprechen, die mich bei meinem Erstkontakt mit der PCR-Analyse so freundlich unterstützt und mir den Einstieg in die Laborarbeit dadurch erheblich erleichtert haben!

Zusammenfassung

Zielsetzung: Die angeborene Zwerchfellhernie (CDH) ist mit einer hohen Morbidität und Mortalität vergesellschaftet, die in erster Linie auf die begleitende Entstehung einer pulmonalen Hypoplasie und pulmonalen Hypertonie zurückzuführen sind. Die Insulin-like growth factors (IGFs) spielen eine wichtige Rolle in der fetalen Entwicklung und bei der Regulation des fetalen Lungenwachstums. In dieser Studie sollte die Wirkung von intraamniotisch appliziertem, humanem rekombinantem IGF-1 (rhIGF-1) auf die hypoplastischen Lungen von Rattenfeten am Nitrofen-Modell untersucht werden.

Methoden: Trächtigen *Sprague-Dawley-Ratten* wurden am Schwangerschaftstag 9,5 (E9,5) 100 mg in Olivenöl gelöstes Nitrofen verabreicht, die Ratten der Kontrollgruppe blieben unbehandelt. In das Fruchtwasser der jeweiligen Feten der Nitrofen-exponierten Mutterratten wurden an den Tagen 19 und 20 jeweils 0,2 µg rhIGF-1 (IGF-1-Gruppe), oder eine Kochsalzlösung (Plazebogruppe) injiziert. Am Tag 21,5 wurden die Feten operativ entbunden, die Überlebenden sezirt und auf das Vorliegen einer angeborenen Zwerchfellhernie untersucht. Jeweils 15 CDH-positive Feten der IGF-1- und der Plazebogruppe und 5 unbehandelte Feten der Kontrollgruppe wurden in die Analyse eingeschlossen. Nach sofortigem Frieren der Proben wurden ihre linken Lungen mittels Immunhistochemie und die rechten Lungen mittels *real-time reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) untersucht.

Ergebnisse: Fetales Körpergewicht, Lungengewicht und fetale *Lung-to-Body Weight Ratio* (LBWR) der Behandlungsgruppen (IGF-1- und Plazebogruppe) waren im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe deutlich reduziert, wobei das Körpergewicht der IGF-1-Gruppe signifikant geringer als das der Plazebogruppe war ($p < 0,05$). Das Lungengewicht der beiden Behandlungsgruppen ließ auf eine schwere Hypoplasie schließen und war im Vergleich zur Kontrollgruppe um etwa 2/3 reduziert. Die Proteinexpression von Ki67 war in den Behandlungsgruppen gleich, aber signifikant höher als bei den Kontrollen. Weiters war in der IGF-1-Gruppe die IGF-1-Proteinexpression signifikant reduziert ($p < 0,01$) und die *Igf-2r*-mRNA-Expression im Vergleich zur Plazebogruppe signifikant gesteigert ($p < 0,01$).

Schlussfolgerung: Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die intraamniotische rhIGF-1-Applikation zu einer signifikanten Reduktion der fetalen Körpergewichte, der IGF-1-Proteinexpression und zu einer signifikanten Steigerung der *Igf-2r*-mRNA-Expression führte. Dies scheint auf eine Suppression der körpereigenen IGF-Produktion zurückzuführen zu sein, was einen therapeutischen Einsatz von IGF-1 mit dieser Methodik als nicht sinnvoll erscheinen lässt.

Abstract

Purpose: Congenital diaphragmatic hernia (CDH) is associated with high rates of morbidity and mortality, which are mainly based on the development of pulmonary hypoplasia and pulmonary hypertension. Insulin-like growth factors (IGFs) play an important role in fetal development and the regulation of fetal lung growth. This experimental study aimed to investigate the effects of intra-amniotically administered human recombinant IGF-1 (rhIGF-1) on rat fetuses with nitrofen induced lung hypoplasia.

Methods: Timed pregnant *Sprague-Dawley rats* were exposed either to 100 mg nitrofen dissolved in olive oil on E9.5 (treatment groups), or remained untreated (control group). On E19 and E20 0.2 µg of rhIGF-1 (IGF-1 group) or saline (placebo group) were injected into the amniotic fluid of the nitrofen-exposed fetuses. After caesarean delivery on E21.5 fetuses were euthanized and necropsy was performed. Only fetuses with left-sided CDH (CDH+) were included, their lungs dissected and snap frozen in liquid nitrogen. 5 untreated fetuses served as external controls (control group). Left lungs were analysed by immunohistochemistry and right lungs by using *real time reverse transcription polymerase chain reaction* (qRT-PCR).

Results: Fetal body weights, lung weights and lung-to-body weight ratios (LBWRs) of the treatment groups were reduced in comparison to the control group and the body weights of the IGF-1 group were lower than the ones of the placebo group ($p < 0.05$). The mean lung weights showed severe hypoplasia and amounted to just about two-thirds of the weights of the controls. Protein expression of Igf-1 was significantly decreased ($p < 0.01$) in the IGF-1 group compared to placebo, whereas protein expression of Ki67, Ttf1, Fgf10, Bmp4, Sma and T1 α did not differ. The results of the *qRT-PCR* revealed a highly significant increase ($p < 0.01$) of the mRNA expression of the *Igf-2r* between the IGF-1 and the placebo group, while the other markers did not differ.

Conclusion: Summarizing the results, the application of rhIGF-1 induced a significant decrease in fetal body weight and protein expression of IGF-1 and an increase in mRNA expression of the *Igf-2r*. This is likely to be caused by a suppressive effect of the applied rhIGF-1.

Inhalt

Vorwort	3
Inhalt	7
Glossar und Abkürzungen	11
1. Einleitung	17
1.1. Die menschliche Lungenentwicklung und ihre Phasen	17
1.1.1. Embryonale Phase	17
1.1.2. Pseudoglanduläre Phase	18
1.1.3. Kanalikuläre Phase	21
1.1.4. Sakkuläre Phase	23
1.1.5. Alveoläre Phase	25
1.2. Anatomie der adulten Lunge	27
1.3. Postnatale Entwicklung der Lunge	28
1.3.1. Stadium der Reifung der Mikrogefäße (wenige Monate bis 2-3 Jahre)	28
1.3.2. Fetales Lungenvolumen, fetale Lungenflüssigkeit, Amnionflüssigkeit und fetale Atembewegungen	29
1.3.3. Hormonelle, transkriptionelle und Wachstums-Faktoren	29
1.3.4. Umgebungs-Faktoren	30
1.3.5. Chronische Lungenerkrankungen (CLD) und ihr Zusammenhang mit den Stadien der Lungenentwicklung	31
1.4. Fetale Atembewegungen	34
1.4.1. Die Rolle der fetale Lungenflüssigkeit	36
1.4.2. Die Bedeutung der Flüssigkeitsbalance und der Thoraxwand für das Lungenwachstum	37
1.4.3. Frühgeburt	37
1.5. Wachstum des Gefäßbaumes	38
1.5.1. Verzweigungsmuster der Arterien und Venen der Lunge	39
1.5.2. Struktur der Wand der pulmonalen Arterien	41
1.5.3. Faktoren, die das arterielle Wachstum kontrollieren	42
1.5.4. Mechanismen, die in die Adaption nach der Geburt involviert sind	43
1.5.5. Der Einfluss von Stickstoffmonoxid	43
1.5.6. Die Wirkung von Prostacyclin	45
1.5.7. Der Einfluss von Endothelin	45
1.5.8. Anormale Lungenzirkulation	46
1.5.9. Die hypoplastische Lunge	46
1.5.10. Primäre pulmonale Hypertension (PPH)	47
1.5.11. Persistierende Pulmonale Hypertension des Neugeborenen (PPHN)	47
1.5.12. Die sekundäre pulmonale Hypertension	47
1.5.13. Frühgeburt und pulmonale Zirkulation	47
1.5.14. Angeborene Herzfehler	48
1.5.15. Behandlung der pulmonalen Hypertension	48
1.6. Molekulare Mechanismen der frühen Lungenentwicklung	49
1.6.1. Frühe Organogenese der Lunge	54
1.6.2. Angeborene Mutationen und Entwicklungsstörungen, die mit frühen Malformationen der Lunge assoziiert sind	56
1.6.3. Molekulare Mechanismen, die die Morphogenese der Verzweigung regeln	56
1.6.4. Molekulare Mechanismen der Regulation der Gefäßentwicklung	58
1.6.5. Molekulare Mechanismen der Regulation der alveolären Entwicklung	60
1.7. Anormale Entwicklung der Lunge und der leitenden Luftwege	62
1.7.1. Die tracheo-ösophageale Fistel	63
1.7.2. Tracheale Agenesie, tracheale Stenose und Tracheomalazie	64
1.7.3. Bronchiale Atresie, bronchiale Stenose und Bronchomalazie	65
1.7.4. Die Bronchopulmonale Sequestrierung	65

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

1.7.5. Kongenitale bronchogene Zysten	67
1.7.6. Kongenitales Emphysem (Lungenüberblähung, Hyperinflation)	67
1.7.7. Kongenitale Malformationen des distalen Lungenparenchyms	68
1.7.7.1. Pulmonale Agenesie und Aplasie	68
1.7.7.2. Pulmonale Hypoplasie	68
1.7.7.3. Pulmonale Hyperplasie	69
1.7.7.4. Kongenitale Zysten der Lunge	70
1.7.7.5. Kongenitale zystisch-adenomatoide Malformation (CCAM)	70
1.7.7.6. Dysplasie der alveolären Kapillaren	71
1.7.7.7. Kongenitale Lymphangiektasie der Lunge	72
1.7.8. Regulation der Alveolarisierung	72
1.7.8.1. Struktur der alveolären Wand	73
1.7.8.2. Bildung von Alveolen in der sich entwickelnden Lunge	74
1.7.8.3. Regulation der Alveolarisierung	75
1.7.8.4. Andere Regulatoren der Angiogenese	76
1.7.8.5. Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)	77
1.7.8.6. Glucocorticoide	77
1.7.8.7. Die Wirkung der Vitamin-A-Säure	78
1.7.8.8. Östrogen und Testosteron	80
1.7.8.9. Ernährung	81
1.7.8.10. Sauerstoff	81
1.7.8.11. Entzündung	82
1.7.8.12. Andere Mediatoren der Alveolarisierung	82
1.8. Die kongenitale Zwerchfellhernie (CDH)	83
1.8.1. Pränatale Diagnose und Therapie der CDH	84
1.8.2. Pränatale Ultraschall-Diagnostik und assoziierte Anomalien	85
1.8.3. Prognose-Parameter bei CDH	86
1.8.4. Untersuchungen der kontralateralen Lunge	86
1.8.5. Neonatale Behandlung der CDH	87
1.8.6. Vorhersage der PAH	88
1.8.7. Konsequenzen einer CDH und Interventionsmöglichkeiten	89
1.8.7.1. Klinische Intervention	89
1.9. Überblick über Behandlungsmöglichkeiten der CDH-bedingten Lungenhypoplasie und deren Erforschung an den verschiedenen Tiermodellen	91
1.9.1. Das Schafsmodell	92
1.9.1.1. Methoden um eine TO durchzuführen	95
1.9.1.2. Stärken und Schwächen der TO-Studien an Schafen	95
1.9.2. Das Hasenmodell	96
1.9.2.1. Methoden der Durchführung der TO am Hasenmodell	97
1.9.2.2. Stärken und Schwächen des Hasenmodells	97
1.9.3. Das Rattenmodell (Rattus norvegicus)	98
1.9.3.1. Methoden zur Durchführung der TO am Rattenmodell	99
1.9.3.2. Stärken und Schwächen des Rattenmodells	99
1.9.4. Das Mausmodell	99
1.9.4.1. Methoden der Durchführung der TO an der Maus	100
1.9.4.2. Vorteile und Nachteile des Maus-Modells	100
1.9.5. Die TO und die Entwicklung der Lungengefäße	101
1.9.5.1. Spezifische Faktoren der Gefäßentwicklung	101
1.9.5.2. Die Effekte der TO auf die vaskuläre Entwicklung	102
1.9.5.3. Zukünftige experimentelle Richtungen der TO	103
1.9.5.4. Ein Modell, das die Dehnung, Lungenentwicklung und TO analysiert	103
1.9.6. Andere Teratogene, die eine CDH induzieren können	107
1.10. Physiologische Mechanismen des normalen und veränderten Lungenwachstums	109
1.10.1. Physiologische Kontrolle der fetalen Lungenentwicklung	109
1.10.1.1. Effekte einer reduzierten Lungendehnung auf das fetale Lungenwachstum	111
1.10.1.2. Effekte einer gesteigerten Lungenexpansion	112
1.10.1.3. Die Rolle der fetalen Atembewegungen in der Lungenentwicklung	113
1.10.1.4. Mechanismen der Mechanotransduktion	115

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

1.10.1.5. Physikalische Ursachen der fetalen Lungenhypoplasie	117
1.10.1.6. Oligohydramnion	117
1.10.1.7. Muskuloskelettale Fehlbildungen	117
1.10.1.8. Effekte von Corticosteroiden auf das Wachstum und die Entwicklung der Lunge	118
1.10.1.9. Effekte von metabolischen Faktoren auf die fetale Lungenreifung und das Lungenwachstum	119
1.10.1.10. Bronchopulmonale Dysplasie (BPD)	122
1.11. Strukturelle Analyse der fetalen Lungenentwicklung der Ratte	123
1.11.1. Morphologie der fetalen Rattenlunge am Tag 17 und 18 (pseudoglanduläres Stadium)	124
1.11.2. Morphologie an den Tagen 19 und 20 (pseudoglanduläres Stadium)	126
1.11.3. Morphologie an den Tagen 21 und 22 (kanalikuläres Stadium)	127
1.11.4. Morphologie am Tag 23 (sakkuläres Stadium)	128
1.11.5. Morphologie am ersten postnatalen Tag (sakkuläres Stadium)	128
1.11.6. Geschichtliches	131
1.11.7. Zusammenfassung	132
1.12. Frühe Entwicklung des Zwerchfells und zelluläre Mechanismen der Nitrofen-induzierten CDH	134
1.12.1. Anormale Bildung der PPF bei Nitrofen-exponierten Rattenembryonen	137
1.12.2. Entwicklung der PPF bei Menschen und Ratten	139
1.12.3. Anormale Formation der PPF bei Nitrofen-exponierten Ratten	140
1.12.4. Nitrofen und seine dosisabhängige Induktion der Lungenhypoplasie	144
1.12.5. Die Pathogenese der durch Nitrofen induzierten CDH	152
1.12.6. Der Nitrofeneffekt auf die Lungenentwicklung	159
1.12.7. Mechanismen der Nitrofen-induzierten Teratogenität	160
1.13. IGF-1 und seine Wirkung	163
1.13.1. Einflüsse der IGF-1 <i>Gendisruption</i> auf das zelluläre Profil des Zwerchfells	163
1.13.1.1. Fasermorphologie	164
1.13.1.2. Faserproportionen	164
1.13.1.3. Muskelfaserquerschnitt	165
1.13.1.4. MyHC-Isoformen	166
1.13.2. Die Folgen der Blockade des IGF-1R	171
1.13.2.1. Zeitlicher Verlauf der IGF-Expression nach Bleomycin-induziertem Schaden	172
1.13.2.2. Herabregulierung des IGF-1r an Mäusen, die mit A12 behandelt wurden	172
1.13.2.3. Untersuchung der Lungenfibrose	173
1.13.2.4. Apoptose in den Lungen von Bleomycin-behandelten Mäusen	173
1.13.2.5. IGF-1-induzierte Migration von Lungenfibroblasten	174
1.13.2.6. IGF-1-Signalwege in Lungenfibroblasten	174
1.13.3. Fetale IGF-1-Therapie bei einer IUGR	177
1.13.3.1. Transamniotischer Katheter	178
1.13.3.2. Katheter über die uterine Arterie	178
1.13.4. Wirkung einer Applikation von IGF an fetale Rhesusaffen (<i>Macaca mulatta</i>)	181
1.13.4.1. Fetales Wachstum <i>in utero</i>	182
1.13.4.2. Hämatologie und Immunologie	182
1.13.4.3. Einfluss von IGF-1 auf die fetalen Glukosespiegel	183
1.13.4.4. Unterscheidung zwischen endogenem und exogenem IGF-1	184
1.13.4.5. Die Wirkung des IGFBP-3	184
1.13.4.6. Fetale Evaluierung	185
1.13.5. IGF-1 verbessert die Wachstumsrate von fetalen Schafen	187
1.13.6. Das Schicksal von intraamniotisch appliziertem IGF-1	194
1.13.7. Der Transport von IGF-1 über Zellmonolayer	199
1.14. Vitamin A-Mangel und sein Zusammenhang mit teratogenen und chirurgischen Modellen der CDH	204
1.14.1. Vitamin A und Vitamin A-Säure in der fetalen Entwicklung	204
1.14.2. Modelle der Vitamin A-Defizienz	207
1.14.3. Parallelen zwischen dem Nitrofen- und dem VAD-Modell	207
1.14.3.1. Nitrofenwirkung und die Induktion der CDH-Frequenz	208

1.15. Herabregulierung des IGFBP-3 und -5 an Lungen mit Nitrofen-induzierter Hypoplasie	210
1.15.1. Die mRNA-Expression des <i>Igfbp-3</i> und <i>Igfbp-5</i> in fetalen Rattenlungen	211
1.15.2. Proteinexpression von <i>Igfbp-3</i> und -5	211
1.16. IGF-1 und -2, deren Rezeptoren und ihre Wirkung auf die fetale Lungentwicklung	213
1.16.1. Der Insulinrezeptor (IR)	216
1.16.2. Die Effekte der IGFs auf das fetale Wachstum und die Entwicklung der Plazenta	218
1.16.3. Die Wirkung von IGF-1 auf Ratten mit akutem Nierenversagen	220
1.17. Fragestellungen	222
2. Material und Methoden	224
2.1. Art des Eingriffs	224
2.1.1. Nitrofungabe	224
2.1.2. Chirurgischer Eingriff und rhIGF-1-Injektion	224
2.2. Analyse der Lungengewebe	227
2.2.1. PCR-Analyse	227
2.2.1.1. Theorie zur RNA-Isolierung	227
2.2.1.2. Praktische Isolierung von RNA aus dem Lungengewebe der Rattenfeten	228
2.2.1.3. Theorie der reversen Transkription (cDNA-Synthese)	229
2.2.1.4. Absorptions-Messung mittels Spektrometrie	229
2.2.1.5. Praktische cDNA-Synthese	230
2.2.1.6. Theorie der RT-PCR (Reverse Transkription-PCR)	231
2.2.1.7. Theorie der Real-time quantitative PCR (RTQ-PCR)	234
2.2.1.8. Praktische Durchführung der RTQ-PCR	236
2.2.1.9. Auswertung der QT-PCR	238
2.2.2. Immunhistochemie	240
2.2.2.1. Theorie der Immunhistochemie	240
2.2.2.2. Praktische Durchführung des Immuno-Stainings:	242
2.2.3. Bedeutung der verwendeten Zellmarker in der immunhistochemischen und PCR-Analyse	243
3. Ergebnisse	249
3.1. Allgemeine und morphologische Parameter der Feten	249
3.1.1. Fetale Mortalität	249
3.1.2. Quote der Zwerchfellhernien	249
3.1.3. Fetale Körpergewichte, Lungengewichte und LBWRs	250
3.2. Ergebnisse des immunhistochemischen Stainings	253
3.2.1. Ki67-Staining	253
3.2.2. Ttf1-Staining	254
3.2.3. Sma-Staining	254
3.2.4. T1 α /Podoplanin-Staining	256
3.2.5. Fgf10-Staining	257
3.2.6. IGF-1-Staining	258
3.2.7. Bmp4-Staining	259
3.3. Ergebnisse der RT-PCR	260
3.3.1. <i>Ki67</i> -mRNA-Expression	260
3.3.2. <i>Ttf1</i> (<i>Nkx2.1</i>)-mRNA-Expression	261
3.3.3. <i>T1α/Podoplanin</i> -mRNA-Expression	261
3.3.4. <i>Fgf10</i> -mRNA-Expression	262
3.3.5. <i>Bmp4</i> -mRNA-Expression	263
3.3.6. <i>Igf-1r</i> -mRNA-Expression	264
3.3.7. <i>Igf-2r</i> -mRNA-Expression	264
3.3.8. <i>Vegf-a</i> -mRNA-Expression	265
3.3.9. <i>Plat</i> -mRNA-Expression	266
3.3.10. <i>Pecam-1</i> -mRNA-Expression	267
3.3.11. <i>Kdr/Flk-1</i> -mRNA-Expression	267

3.3.12. <i>Flt-1</i> -mRNA-Expression	268
4. Diskussion	269
5. Quellenverzeichnis	278

Glossar und Abkürzungen

- ¹²⁵I-IGF-1: mit radioaktivem Iod (¹²⁵I) markiertes IGF-1.
- ³H-Inulin: mit Tritium (³H) markiertes Inulin (auch *Alantstärke*) (112,113).
- ³H-Thymidin: der Einbau von ³H-Thymidin in die zelluläre DNA wird verwendet, um die Rate der DNA-Synthese und Zellproliferation zu beurteilen (123).
- 4-CN: 4-Chloro-1-Naphthol.
- 5-LOX: 5-Lipoxygenase.
- A12: monoklonaler Antikörper gegen den IGF-1R [682].
- ACh: Acetylcholin.
- ACTH: adrenocorticotropes Hormon.
- ADH: Antidiuretisches Hormon, Adiuretin.
- ADMA: Asymmetrisches Dimethylarginin.
- AEC-1 und -2: Alveolarepithelzellen vom Typ 1 und 2.
- AF: Amniotic Fluid (engl.), Fruchtwasser, Amnionflüssigkeit.
- AH23848: Thromboxan-A₂-Blocker.
- Akt: Substrat der PI3-Kinase.
- Aldhla3 (auch Raldhla3): Retinaldehyd-Dehydrogenase .
- Alpha-actin-2 (auch Alpha smooth muscle actin, α -SMA): Antigen der glatten Muskulatur in den Bronchien und Gefäßen [991].
- AMP: Adenosinmonophosphat.
- ANOVA: Analysis of Variance (engl.).
- APGAR-Score: Punkteschema zur Beurteilung des Zustandes des Neugeborenen nach der Geburt (1).
- ARDS: Acute Respiratory Distress Syndrome (engl.).
- ARF: Acute Renal Failure (engl.), akutes Nierenversagen.
- ATP: Adenosintriphosphat.
- AV-Klappe: atrioventrikuläre Klappe.
- BALF: Bronchoalveolar Lavage Fluid (engl.), Flüssigkeit der bronchoalveolären Lavage.
- BCA: 4-Biphenyl-Carboxylsäure.
- BCP: 1-Bromo-3-Chloropropan.
- BLWR: Brain to Liver Weight Ratio (engl.).
- BM: Basalmembran.
- BMP4: Bone morphogenetic protein 4.
- BPD: Bronchopulmonale Dysplasie.
- Branching (engl.): Verzweigungsvorgang (z. B. der Luftwegen oder Blutgefäße).
- BrdU: Bromdesoxyuridin.
- Budding (engl.): Knospung, Knospenbildung (z. B. der Lunge oder der Gefäße).
- BW: Body weight (engl.), Körpergewicht.
- B-Zellen: B-Lymphozyten.
- Caco-2: Zelllinie aus heterogenen humanen Zellen des colorektalen Adenokarzinoms (121).
- CC10: Clara Cell-specific 10 kD Protein.
- CCAM: Congenital Cystic Adenomatoid Malformation (engl.).
- CCSP: Clara-Cell-Secretory-Protein (engl.), sekretorisches Protein der Clara-Zellen.
- CD4/CD8-Ratio: Verhältnis zwischen den CD4- und CD8-T-Lymphozyten.
- CDH: Congenital Diaphragmatic Hernia (engl.), angeborene Zwerchfellhernie.
- Cdks: Cyclin-dependent kinases (engl.), Cyclin-abhängige Kinasen.
- cDNA: complementary DNA (engl.).
- CFR: Capillary-to-Fibre Ratio (engl.).
- cGMP: cyclisches Guanosinmonophosphat.
- CHAOS: Congenital High Airway Obstruction Syndrome (engl.).
- c-met*: Das *c-met*-Gen codiert die β -Untereinheit des HGFR [571].
- COPD: chronisch obstruktive Lungenerkrankung.

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

COUP-TFII: Gen der Kernrezeptor-Familie, das die Wirkung von Vitamin A-Säure beeinflusst (48).
COX-1, -2: Cyclooxygenase 1 und 2.
CPAP: Continuous Positive Airway Pressure (eng.), intensivmedizinische Beatmungsform (1).
CRBP1: Cellular Retinol Binding Protein 1.
CRH: Corticotropin-Releasing Hormone, auch Corticoliberin (1).
CRL: Crown-Rump-Length (engl.), Scheitel-Steiß-Länge (1).
Ct: Cycle threshold (engl.).
CTGF: Connective-tissue growth factor.
CYP: Cytochrom P450.
CYR61: Cystein-Rich-Angiogenic-Inducer 61.
D: Day (engl.), Tag (z. B. D18).
DAB: Diaminobenzidin.
DEPC: Diethyl-Pyrocbonat (ein RNase-Inhibitor) [968].
DFZ: Diformazan.
DGLA: Dihomo- γ -Linolensäure.
DH: diaphragmatische Hernie, Zwerchfellhernie.
DNA: Deoxyribonucleic Acid (engl.), Desoxyribonuclein-Säure.
dNTPS: Desoxy-Nukleosidtriphosphate.
DTT: Dithiothreitol.
E: Embryonalstadium (z. B. E19,5).
ECM: Extracellular Matrix (engl.), extrazelluläre Matrix.
ECMO: Extrakorporale Membranoxygenierung.
EDS: Ehlers-Danlos-Syndrom.
EF-1 α : Elongation Factor -1 α .
EGF: Epidermal growth factor.
EGFR: Epidermale growth factor receptor (engl.).
ELISA: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (engl.).
Eln: Elastin.
EMAPII: Endothelial monocyte-activating polypeptide.
eNOS: vom Endothel gebildete NO-Synthetase.
EPA: Eicosapentaensäure.
EPCs: Ectoplacental Cone Cells (engl.).
ERK1 und ERK2: Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2 (engl.), Proteine und Mitglieder der Familie der MAP-Kinasen.
ERKs: Extracellular Signal-regulated Kinases (engl.).
ET: Endothelin.
Fas: Fas-Rezeptor.
FasL: Fas-Ligand.
FETO: Fetal Endoscopic Tracheal Occlusion (engl.).
FGF: Fibroblast growth factor.
FGFR: Fibroblast growth factor receptor.
FGR: Fetal Growth Restriction (engl.), fetale Wachstumsrestriktion.
Flk-1: fetal liver kinase-1. Gen, das VEGFR-2 codiert [994].
Flt-1: FMS-like tyrosine kinase. Gen, das VEGFR-1 codiert [993].
Fms: das *Fms*-Gen gehört zu einer Genfamilie, die ursprünglich aus einer Zelllinie des feline sarcoma virus isoliert wurde (135).
FOX: Forkhead box proteins.
FOXF1: Forkhead box protein F1.
FOXJ1: Forkhead box protein J1.
FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer (engl.).
FSMCs: Fibroid Smooth Muscle Cells (engl.), Präkursorzellen der glatten Muskelzellen [543].
GAG: Glykosaminoglykane.
GATA: Mitglied einer Familie von Transkriptionsfaktoren.
GD: Gestational Day (engl.), Schwangerschaftstag.
GDF-1: Growth/differentiation factor-1.
GFR: glomerulären Filtrationsrate.
GH: Growth Hormone (engl.), Wachstumshormon.
Ghrelin: Akronym für **G**rowth **H**ormone **R**elease **I**nducing (engl.), d. h. „die Wachstumshormon-Freisetzung einleitend“. Es ist ein appetitanregendes Hormon (109).
GIP: glukoseabhängiges insulinotropes Peptid.

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

GLA: γ -Linolensäure.
GLI: Mitglied einer Familie von Transkriptionsfaktoren.
GLP-1: Glucagon-like peptide-1.
GMCSF: Granulocyte macrophage-colony stimulating factor.
GR: Glucocorticoid-Rezeptor.
GRP: Gastrin-releasing-peptide.
GSH: γ -L-Glutamyl-L-Cysteinylglycine ist ein Pseudotripeptid, das aus den drei Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin aufgebaut ist. Es wird auch als *Glutathion* bezeichnet (1).
HB-EGF: Heparin binding epidermal growth factor.
HE-Färbung: Hämatoxylin-Eosin-Färbung.
HFOV: High Frequency Oscillation Ventilation (engl.), Hochfrequenzbeatmung.
HGFR: Hepatocyte growth factor-receptor.
HIF: Hypoxia-inducible factor.
HIP-1: Hedgehog-interacting protein 1.
HIV: Human Immunodeficiency Virus.
HOX-Gen: *Homeobox*-Gen.
HPRT1: Das Gen codiert die Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (als Housekeeping-Gen geeignet).
HRP: Horseradish Peroxidase (engl.), Meerrettichperoxidase (1).
HSP: Heat-Shock-Protein, Hitze-Schock-Protein.
i.v.: intravenös.
IDDM: Insulin-Dependent Diabetes Mellitus (engl.), Insulin-abhängiger Diabetes mellitus (auch Typ I Diabetes mellitus) (1).
IEC: Intestinal Epithelial Cells.
IGF-1, -2: Insulin-like growth factor-1, -2.
IGF-1R, -2R: Insulin-like growth factor-receptor-1, -2.
IGFBPs: Insulin-like growth factor binding proteins.
IgG: Immunglobulin G.
iNO: inhalatives Stickstoffmonoxid.
iPPROM: Iatrogenic Preterm Premature Rupture of the Membranes (engl.).
IR: Insulinrezeptor.
IR11-: IR-Isoform, die durch ein Fehlen des Exons 11 charakterisiert ist [888].
IRS-1, -2: Insulinrezeptor-Substrat-1, -2.
ISH: In-Situ-Hybridisierung.
IUGR: Intrauterine Growth Restriction (engl.), intrauterine Wachstumsrestriktion.
kb: Kilo-Base (1000 Basenpaare) [968].
kDa: kilo Dalton (1000 Dalton).
KDR (auch VEGFR-2): Kinase insert domain receptor (von *Flk-1* codiert).
KG: Körpergewicht.
KGF: Keratinocyte growth factor.
Ki67 (auch MKI67): ein zellulärer Proliferationsmarker.
LBWI: Lung to Body Weight Index (eng.).
LBWR: Lung to Body Weight Ratio (engl.), Verhältnismaß zwischen Lungen- und Körpergewicht.
LCDH: Left-sided Congenital Diaphragmatic Hernia (engl.), linksseitige angeborene Zwerchfellhernie.
LEFTY-1: Mitglied der TGF- β -Familie.
LEFTY-2: Mitglied der TGF- β -Familie.
LEH-Ratten: Ratten des Stammes „Long-Evans-Hooded“
LHR: Lung Area to Head Circumference Ratio (engl.), Verhältnismaß zwischen Lungengröße und Kopfumfang.
LRAT: Lecithin-Retinol-Acyltransferase.
LTB5: Leukotrien B5.
LW: Lung Weight (engl.): Lungengewicht.
MAP/MAPK: mitogenaktivierte Proteinkinase.
MAS: Mekoniumaspirations-Syndrom.
mATPase: myofibrilläre ATPase.
MCSF: Macrophage colony-stimulating factor.
MDBK: Madin-Darby Bovine Kidney (engl.), eine bovine Nierenepithel-Zelllinie [786].
MEK1 und MEK2: Typen der MAP/ERK-Kinase (50).
MK: Protein, das auch als *Midkine*, oder als NEGF-2 (neurite growth-promoting factor 2) bekannt ist und vom *MDK*-Gen codiert wird (1).
MMP: Matrix-Metalloproteinase.

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

MRF4, auch Myf6 (Myogenic factor 6, *Herculin*): ein muskelspezifischer Transkriptionsfaktor (86).
MRI: Magnetresonanz-Imaging.
mRNA: messenger RNA.
Mv1Lu: *Mustela vison* (mink) Lung (engl.), eine Lungenepithelzell-Linie aus dem Nerz [786].
Myf-5: Protein mit einer Schlüsselrolle in der Muskeldifferenzierung (87).
MyHC: Myosin Heavy Chain (engl.), schwere Kette des Myosins [650].
N.: Nervus (lat.), z. B. N. phrenicus (der Zwerchfellnerv).
NAC: N-Acetyl-Cystein.
NBT: nitroblaues Tetrazolium.
NGF: Nerve growth factor.
NIDDM: Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus (engl.), Insulin-unabhängiger Diabetes mellitus (auch Typ II Diabetes mellitus) (1).
NIH-3T3-Zelllinie: embryonale Fibroblasten-Zelllinie der Maus (1).
Nkx2.1 (*Nkx2 homeobox 1*): Homöobox-Gen, das TTF1 codiert.
N-myc (Myelocytomatosis viral related oncogene): ein Proto-Onkogen, das vom *MYCN*-Gen codiert wird.
NO: Stickstoffmonoxid.
NODAL: Protein und Mitglied der TGF- β -Familie. Wird vom Gen *NODAL* codiert.
NOS: NO-Synthetase.
NPC: Nuclear Pore Complex (engl.), Kernporenkomplex.
NSAR: nichtsteroidales Antirheumatikum, auch nichtsteroidales Antiphlogistikum (NSAP) oder NSAID (Non Steroidal Anti Inflammatory Drug, engl.) (1).
NTC: Non Template Control (eng.), Nullprobe
NUT: nutrition (engl.), Nahrung.
O/E LHR: observed/expectet LHR (engl.).
OD: Optical Density (engl.), optische Dichte.
Oesophagus (lat.): die Speiseröhre.
p.c.: post conceptionem (lat.), nach der Befruchtung (1).
PA: Pulmonalarterienhauptstamm-Durchmesser.
PAH: pulmonale arterielle Hypertonie.
p-Arm: kurzer Arm des Chromosoms.
PBS: Phosphate buffered saline, Pufferlösung.
PCNA: Proliferating-cell-nuclear-antigen, ein Protein (49).
PCR: Polymerase Chain Reaction (engl.), Polymerase-Kettenreaktion.
PDGF: Platelet-derived growth factor.
PDGFR: Platelet-derived growth factor receptor.
PECAM: Platelet endothelial cell adhesion molecule.
PEPCK: Phosphoenol-Pyruvat-Carboxykinase.
PFOB: Perflouroctylbromid.
PGE1: Prostaglandin E1.
PGE2: Prostaglandin E2.
PH: pulmonale Hypoplasie.
PHMP: Posthepatic Mesenchymal Plate (engl.).
PI: Pulsatility Index (engl.), Index der Pulswelle.
PI3-Kinasen: Phosphatidylinositol-3-Kinasen.
PIGF: Phosphatidylinositol-Glycan Biosynthesis Class F Protein.
PLAT: Gen, das den Tissue-type plasminogen activator (PLAT) codiert [997].
PNECs: pulmonale neuroendokrine Zellen.
Podoplanin (auch T1 α): membranständiges Glykoprotein und immunhistochemischer Marker für die Typ-I-Alveolarepithelzellen [986].
PPF: pleuroperitoneale Falte.
PPH: Primäre Pulmonale Hypertension.
PPHN: Persistierende Pulmonale Hypertension des Neugeborenen.
ProSP-C: Vorläufer-Protein des Surfactant-Proteins C.
PSA-NCAM: Polysialic Acid-Neural Cell Adhesion Molecule.
PTCH-1 und -2: Patched -1 und -2 sind Transmembranproteine.
PT-I und -II-Zellen: Pneumozyten (Alveolarepithelzellen, AECs) vom Typ I und II.
q-Arm: langer Arm des Chromosoms.
RA: Retinoic Acid (engl.), *Tretinoin*, Vitamin A-Säure.
RALDH: Retinaldehydogenase.
RAR: Retinoic Acid Receptor (engl.), Vitamin A-Säure-Rezeptor.

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

RAREs: Retinoic Acid Response Elements.
RBP: Retinol Binding Protein (engl.).
RBP-4: Plasma-Retinol-Binding-Protein-4 (engl.).
RCDH: Right-sided Congenital Diaphragmatic Hernia (engl.), rechtsseitige angeborene Zwerchfellhernie.
RCF: Relative Centrifugal Force (engl.), relative Zentrifugalkraft.
RCT: Randomized Controlled Trial (engl.), randomisierte kontrollierte Studie.
RDS: Respiratory Distress Syndrome (engl.), Ateminsuffizienz-Syndrom, das zum Lungenversagen führt (1).
REM: Rapid Eye Movement (engl.), Schlafphase mit raschen Augenbewegungen (1).
RER: raues endoplasmatisches Retikulum.
rhIGF-1: rekombinantes humanes IGF-1.
RIA: Radioimmunoassay (engl.).
RNA: Ribonucleic Acid (engl.), Ribonuklein-Säure.
RNase: RNA-abbauendes Enzym.
rRNA: ribosomale RNA.
RT: Reverse Transkription.
RT-PCR: Reverse Transkription-PCR.
RTQ-PCR: Real Time Quantitative-PCR (engl.).
RXR: Retinoid-X-Receptor (engl.).
RXRE: Retinoid-X-Response-Element (engl.).
s.c.: subcutan (lat.), subkutan (unter der Haut).
SAL: Kochsalzlösung.
SB-202235: Hemmstoff der 5-LOX.
SB-210661: Hemmstoff der 5-LOX.
SD: Standard Deviation (engl.), Standardabweichung.
SDH: Succinat Dehydrogenase.
SD-Ratten: Ratten vom Stamm „Sprague-Dawley“.
SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (engl.), Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (122).
Shh: *Sonic hedgehog* (Gen).
SIV: Simiane Immunodeficiency Virus.
SMCs: Smooth Muscle Cells (engl.), glatte Muskelzellen (1).
Smo: *Smoothed* (Gen des Hedgehog-Signalweges).
SNAT2: System A Transporter 2 (engl.), Aminosäuretransporter.
SO: Sham operation (engl.), *Schein-Operation* oder *Placebo-Operation*. Es handelt sich um einen operativen Eingriff, der (hier in Bezug auf den Tierversuch), in gleicher Weise an der Behandlungsgruppe, wie auch an der Kontrollgruppe vorgenommen wird, ohne dass dabei allerdings in der Kontrollgruppe eine Wirkstoff-Applikation oder eigentliche chirurgische oder therapeutische Intervention erfolgt. Dadurch wird eine Behandlungsgleichheit bezüglich des operativen Eingriffs erzeugt.
SP: Surfactant Protein (engl.), Protein des Surfactants.
Spry2: *Sprouty 2* (Gen).
SSL: Scheitel-Steiß-Länge (siehe auch CRL).
SSW: Schwangerschaftswoche.
SU5416: VEGFR-Blocker [255].
T3: 3,5,3'-Triiodthyronin.
T4: 3,3',5,5'-Tetraiod-L-thyronin oder auch *Thyroxin*.
Tbx: Gene der T-box.
TEF: Tracheoesophageal Fistula (engl.), tracheo-ösophageale Fistel.
TGA: Transposition der großen Arterien.
TGCs: Trophoblast Giant Cells (engl.).
TGF: Transforming growth factor (engl.).
THG: Thyroidhormon-bindendes Globulin.
Tie 2-Rezeptor: Rezeptor auf Endothelzellen, an den z. B. Angiotensin bindet [262].
TNF- α : Tumornekrosefaktor- α .
TO: Tracheal Occlusion (engl.), chirurgischer (reversibler) Verschluss der Trachea [457].
TPO: Thyreoperoxidase.
TPTX: Thyreo-Parathyreoidectomie. Kombinierte Entfernung der Schilddrüse und der Nebenschilddrüsen (1).
Trachea (lat.): die Luftröhre.
tRNA: transfer RNA.
TROP-2: Tumor-associated Calcium Signal Transducer-2 (engl.).

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

TSH: Thyroid Stimulating Hormone (engl.).

TTF1: Thyroid Transcription Factor-1. Protein, das vom Gen *NKX2.1* codiert wird. Es stellt einen immunhistochemischen Marker für die Typ-II-AECs dar.

TTR: Transthyretin.

TUNEL: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labelling.

TVT: tiefe Venenthrombose.

TXA2: Thromboxan-A2.

T-Zellen: T-Lymphozyten.

U0126: ein hoch sensitiver Inhibitor der MEK1 und MEK2 (50).

VACTERL-Assoziation: Kombination komplexer Fehlbildungen des Neugeborenen (1).

VAN-SD-Ratten: Ratten des Stammes "Virus-Antibody-Negative-SD".

VAS: Vitamin A-Säure, *Tretinoin*.

VDUP-1: Vitamin D3-Upregulated-Protein-1.

VEGF-A: Vascular endothelial growth factor A.

VEGFR-1 (codiert von *Flt-1*): Vascular endothelial growth factor receptor-1.

VEGFR-2/KDR (codiert von *Flk-1*): Vascular endothelial growth factor receptor-2.

VSD: Ventrikelseptumdefekt.

WT: Wildtyp. Bezeichnung für das Genom eines Lebewesens, das in seiner natürlichen (in der Evolution entstandenen) Form vorkommt. Durch Mutationen entstehen Abweichungen hiervon (1).

WT-1: Das *Wilms-Tumor-Suppressor-Gen 1* codiert das Wilmstumor-Protein (WTP), einen Transkriptionsfaktor (1).

α -CA: α -Carboanhydrase.

Schreibweise der mRNA, der Gene und der Proteine:

Humane Proteine werden in dieser Arbeit vollständig in Großbuchstaben geschrieben (z. B. IGF-1).

Bei den Proteinen der Ratten und Mäuse wird nur der 1. Buchstabe großgeschrieben (z. B. Igf-1).

Die humanen Gene und die humane mRNA werden vollständig groß und *kursiv* geschrieben (z. B. *IGF-1*-mRNA).

Die mRNA und die Gene der Ratten und Mäuse werden *kursiv* und mit einem Großbuchstaben am Wortanfang geschrieben (z. B. *Igf-1*-mRNA).

1. Einleitung

1.1. Die menschliche Lungenentwicklung und ihre Phasen

Die Entwicklung der menschlichen Lunge vollzieht sich in mehreren Entwicklungsstufen, die hier detailliert beschrieben werden sollen. Sie durchläuft der Reihe nach die *embryonale*, *pseudoglanduläre*, *kanalikuläre*, *sakkuläre* und *alveoläre Phase* [7].

1.1.1. Embryonale Phase

Am Beginn dieser Phase steht die Entwicklung des *Sulcus laryngotrachealis*, einer Rinne im ventralen unteren *Pharynx*⁵ (*Carnegie Stadium*⁶ 10, ca. 28 Tage). Das respiratorische Primordium der Lunge erscheint erstmals am Tag 22 *p.c.*⁷ als eine Vergrößerung des *kaudalen*⁸ Endes des *Sulcus laryngotrachealis*, der in der medialen, pharyngealen Grube eine Aussprossung der ventralen Wand der primitiven Vorknospe darstellt [4,5].

Das primitive, *respiratorische Divertikulum*, oder die *Lungenknospe* erscheint am Tag 26 *p. c.*, wenn der Embryo nur etwa drei Millimeter lang ist und beginnt dann, in ventro-kaudaler Richtung durch das *Mesoderm*⁹, das die Knospe umgibt, zu wachsen, das sich in anteriorer und paralleler Position zum primitiven *Ösophagus*¹⁰ befindet [6].

Nach mehreren Tagen bildet sich im unteren Teil die eigentliche Lungenanlage (*Stadium* 12, ca. 30 Tage). Es folgt die weitere Aufteilung in den rechten und linken *Hauptbronchus* (*Stadium* 14, ca. 33 Tage), von welchen sich die rechte, etwas größere Knospe, parallel zum Ösophagus und etwas stärker nach kaudal ausrichtet und die linke, etwas kleinere Knospe, nach lateral weist [6].

Die weitere Aufteilung erfolgt entsprechend der Konfiguration der späteren Lungenlappen und es bilden sich demnach rechts drei und links nur zwei weitere Knospen. Es entstehen nun die *Segmente* in den einzelnen Lungenlappen. Dem Anschein nach unterliegt die Lungenentwicklung der Kontrolle des darunter liegenden *Mesenchyms*¹¹, wie es experimentelle Ergebnisse andeuten. Das *Trachealepithel*¹² beginnt sich zu verzweigen, wenn es auf einer Schicht aus *bronchialem Mesenchym* gezüchtet wird [6].

⁵ Schlund

⁶ Die *Carnegie-Stadien* oder *Embryonalstadien* stellen eine Einteilung der menschlichen Embryonalentwicklung in 23 Stadien dar und beziehen sich auf die acht Wochen der *Embryonalperiode* von der Befruchtung bis zum Beginn der *Fetalperiode* (2).

⁷ *post conceptionem* (lat.), nach der Befruchtung

⁸ fußwärts gerichtet (1)

⁹ Das mittlere der drei *embryonalen Keimblätter* (1).

¹⁰ Speiseröhre

¹¹ *embryonales Bindegewebe*, dessen Zellen ein lockeres, von *Interzellulärflüssigkeit* ausgefülltes Schwammwerk bilden. Es stellt ein *multipotentes Muttergewebe* aller Formen von Binde- und Stützgewebe, der quergestreiften Muskulatur, fast aller glatten Muskelzellen, der Herzmuskulatur, der Gefäßendothelien und Blutzellen u. a. dar. (1).

¹² Epithel der *Trachea* (Luftröhre)

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Während der embryonalen Phase entwickelt sich die Lunge als Aussprossung der ventralen Wand der primitiven Vorknospe des Endoderms. Die Epithelzellen dieser primitiven Vorknospe infiltrieren das umgebende Mesenchym und unterliegen dann einer dichotomen¹³ Verzweigung, um so die proximalen Strukturen des tracheo-bronchialen Baumes zu formen [7]. Gegen Ende der Embryonalperiode erscheinen die Segmente in den fünf Lappen der Lungen, nämlich drei Segmente rechts und zwei Segmente links. In dieser Zeit haben sich nun auch die Lungengefäße mit ihren späteren Anschlüssen gebildet [6].

Der Lungenkreislauf entsteht aus der 6. *Pharyngealbogenarterie*¹⁴. Ausgehend vom *Aortensack*¹⁵ bildet sich ein Gefäßplexus um die Lungenanlage. Erst nachdem auch aus der dorsalen Aorta Gefäße in diesen Plexus einwachsen, ist der 6. Aortenbogen ausgebildet [8].

Entwicklungsstörungen, die während der embryonalen Phase der Lungenentwicklung auftreten, beziehen sich auf die Knospung der Lunge, die Abgrenzung von Ösophagus und Trachea, die Bildung der proximalen Luftwege und die initiale Lappenbildung. Diese Entwicklungsstörungen beinhalten *Atresien*¹⁶ des Larynx, der Trachea und des Ösophagus, *Stenosen*¹⁷ der Trachea und der Bronchien, *Tracheo- und Bronchomalazie*¹⁸, tracheo-ösophageale Fisteln¹⁹, *pulmonale Agenesie*²⁰, ektope²¹ Lappen, *bronchogene Zysten* und *arterio-venöse Malformationen*²² [9].

1.1.2. Pseudoglanduläre Phase

In der nächsten Phase, die als pseudoglanduläre Phase bezeichnet wird, ähnelt die Lunge einer *tubulo-azinösen Drüse* und davon leitet sich die Bezeichnung dieses Stadiums ab.

Die Lunge besteht hier hauptsächlich aus multiplen Epithel-Schläuchen, die von ausgedehnten Regionen von Mesenchym umgeben werden. Anfangs steigt die Rate der Zellproliferation und die Verzweigung der Luftwege und der vaskulären Strukturen setzt sich fort.

Die Bildung der leitenden Luftwege, inklusive der *terminalen Bronchiolen*, ist am Ende dieses Stadiums mehr oder weniger vollständig und es existieren zwischen 12 und 17 Generationen von bronchialen Schläuchen in den oberen, 18 bis 23 in den mittleren und 14 bis 23 in den unteren Lappen [10].

Zahlreiche azinäre Schläuche und Knospen, aus welchen sich die reifen Azini entwickeln, entstehen in diesem Stadium als distale Äste der terminalen Bronchiolen [11,12]. In dieser Phase werden die gesamten 16 Generationen des luftleitenden Bronchialbaumes bis zu den *Bronchioli terminales* angelegt. Am Ende der pseudoglandulären Phase sind mitunter,

¹³ Bei einer *dichotomen Teilung* gehen zwei gleiche Teile aus einem Teil hervor. Dies ist beispielsweise bei der Verzweigung von Drüsengängen oder Pflanzen zu beobachten (1).

¹⁴ *Schlundbogenarterie*

¹⁵ Anlage der Aorta

¹⁶ Verschluss von Hohlorganen oder natürlichen Körperöffnungen (1)

¹⁷ Verengungen

¹⁸ Angeborene oder erworbene *Stabilitätsverluste* der Luftröhre oder der Bronchien durch Erweichung der Knorpel, Druck von außen, oder Entzündung der Wand (1).

¹⁹ Eine *Fistel* ist eine röhrenförmige, mit Epithel- oder Granulationsgewebe ausgekleidete Verbindung zweier Hohlorgane untereinander (*innere Fistel*), oder eines Hohlorgans und der Körperoberfläche (*äußere Fistel*) (1).

²⁰ vollständiges Fehlen einer Gewebe- oder Organanlage (1)

²¹ *Ektopie*: angeborene Verlagerung von Geweben oder Organen an eine ungewöhnliche Stelle (1)

²² Fehlbildungen zwischen dem venösen und arteriellen Gefäßsystem (1)

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

neueren Studien zufolge, bis zu 20 Generationen vorhanden, was auch darauf hindeutet, dass die *Ductuli respiratorii* bereits teilweise ausgebildet sind [43].

Dies ist die Periode der schnellsten Teilung der intrasegmentalen Luftwege.

In der 14. Woche sind 70% der bei der Geburt vorhandenen Luftwege bereits ausgebildet [13] und am Ende der 17. Woche ist die Bildung der leitenden Luftwege und Bronchioli terminales abgeschlossen [7]. Das Gangsystem wird zum größten Teil von *hochprismatischem Epithel* ausgekleidet, wobei *Flimmerepithelzellen* beim Menschen ab der 13. Schwangerschaftswoche nachweisbar sind. Das hochprismatische Epithel bildet die Vorläuferstruktur des späteren Flimmerepithels und der sekretorischen Zellen [14].

Der *Azinus* enthält zwei bis vier respiratorische Bronchiolen, von welchen jede mit sechs oder sieben Generationen verzweigter *alveolärer Ductuli*²³ und *Sacculi*²⁴ endet.

Die bronchialen Schläuche werden initial durch ein Epithel ausgekleidet. Diese Zellen sind undifferenziert und enthalten einen großen Pool von intrazellulärem Glykogen, das den Großteil ihrer benötigten Energie durch *anaerobe Glykolyse*²⁵ bereitstellt.

Eine prominente Basalmembran, die reich an *Laminin* und *Kollagen Typ IV* ist, liegt unter dem Epithel. Die mesenchymalen Zellen, die diesem Schlauchsystem angrenzen, differenzieren etwa sieben Wochen p.c. zu *Myofibroblasten*²⁶ und ordnen sich zirkulär entlang der longitudinalen Achse der Schläuche an [9].

Die *extrazelluläre Matrix*²⁷ ist aus zahlreichen Varianten von Glykosaminoglykanen und *Proteoglykanen*, wie *Chondroitin-*, *Dermatan-*, und *Heparan-Sulfat*, sowie auch *Laminin*²⁸, *Fibronectin*²⁹, *Tenascin* und *Kollagen vom Typ I und II* zusammengesetzt [15,16]. Diese Makromoleküle sind wichtig für die Zellproliferation, Migration, Adhäsion und Differenzierung während der Lungenentwicklung. Mit Fortschreiten der Verzweigung wird das hochprismatische Epithel der proximalen Luftwege in den distalen azinären Schläuchen und Knospen zu einem *kubischen Epithel* reduziert. Die Differenzierung der Zellen des Epithels der leitenden Luftwege vollzieht sich in zentrifugaler Richtung mit dem Erscheinen von Zilien-tragenden und nicht Zilien-tragenden (serösen) Zellen, *Becherzellen*³⁰, neuroepithelialen und basalen Zellen, die am frühesten innerhalb der proximalen Luftwege erscheinen [17,18]. Einzelne neuroepitheliale Zellen können in den proximalen Luftwegen während der achten bis neunten Woche p. c. nachgewiesen werden [19]. Cluster dieser neuroendokrinen Zellen, die auch *neuroendocrine bodies* genannt werden, werden zwischen der neunten und zehnten Woche p. c. gefunden. Diese sind an Verzweigungspunkten entlang des bronchialen Baumes lokalisiert und werden von sympathischen und sensorischen Nervenfasern innerviert.

Zilien-tragende Zellen erscheinen im trachealen Epithel in der zehnten Woche, im Hauptstamm-Bronchus in der 12. Woche und in den Segment-Bronchien in der 13. Woche.

²³ Ductus (lat.): Gang

²⁴ Sacculus (lat.): Säckchen

²⁵ Abbau von Glucose ohne Sauerstoffverbrauch (1)

²⁶ *Myofibroblasten* stellen eine *Zwischenform* zwischen *glatter Muskelzelle* und *Fibroblast* dar und enthalten kontraktile *Aktin-* und *Myosin-Filamente* sowie eine hohe endogene Produktion von *Kollagen* (1).

²⁷ *Extracellular Matrix* (engl.), *ECM*

²⁸ Die *Laminine* sind kollagenähnliche Glykoproteine und ein Bestandteil der extrazellulären Matrix.

Laminine findet man in allen Basallaminae und sie weisen Bindungsstellen für Zelloberflächenrezeptoren auf (3).

²⁹ *Fibronectin* (von lat. „*fibra*“=Faser und „*nexus*“=Verknüpfung) ist ein Glykoprotein der *extrazellulären Matrix*, das in vielen physiologischen Abläufen, unter anderem auch in der Gewebsreparatur, der Embryogenese, der Hämostase sowie in der *Zellmigration* und *-adhäsion* eine wichtige Rolle spielt (4).

³⁰ Schleim-produzierende Zellen

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Knorpelgewebe tritt in der Trachea und den Bronchien in der zehnten Woche und in den Segment-Bronchien in der 16. Woche in Erscheinung [20]. Schleimbildende Drüsen bilden sich in der Trachea zwischen der 11. und 12. Woche und in den Bronchien in der 13. Woche, wobei die aktive Schleim-Produktion in der 14. Woche beginnt [21]. Am Ende dieses Entwicklungsstadiums dehnen sich die knorpeligen Strukturen bis zu den Segment-Bronchien und die glattmuskulären Anteile der Luftwege bis zu den Ductuli alveolares aus. In Kulturen von fetalen menschlichen Lungen kann eine spontane Kontraktilität der glatten Muskulatur der Luftwege bereits in diesem Stadium beobachtet werden [22].

Die glatte Muskulatur, die die luftleitenden Wege umgibt, wird von einem Netzwerk neuraler Ganglien und Nervenbündeln durchsetzt, das sich ab der siebten bis achten Woche p. c. dort ausbildet [23]. Elastische Fasern können in der Wand der Trachea und der Hauptstamm-Bronchien, sowie der Pleura und der Pulmonalarterie vorgefunden werden [16].

Es erscheinen dann auch *Pneumozyten vom Typ II* und es beginnt die Sekretion von *Amnionflüssigkeit*³¹ [24].

Die *endokrin*³² aktiven „*Kultschitzky Zellen*“³³ sezernieren *Bombesin*³⁴ und *Serotonin*³⁵. Diese Zellen sind *neuroektodermalen Ursprungs*, denn sie entstammen der Neuralleiste. Nach Shan *et al.* bewirkt Bombesin offenbar eine Vermehrung der Typ II-Pneumozyten und spielt darum eine entscheidende Bedeutung in der Entwicklung der Lunge [25].

Die Lunge differenziert sich in zentrifugaler Richtung, was zur Folge hat, dass in den peripheren Abschnitten noch für längere Zeit ein undifferenziertes kubisches Epithel bestehen bleibt. Dies ist für das Vordringen der Atemwege in das umliegende Bindegewebe von entscheidender Bedeutung. Das Epithel in den zentralen, luftleitenden Atemwegen beginnt nun damit, Zilien und Becherzellen zu bilden. In den Bronchien findet man schon ab der zehnten SSW³⁶ Knorpel, glatte Muskulatur, sowie Bronchialdrüsen [7].

Das Muster des *Branchings*³⁷ und der Teilung der Luftwege wird durch Interaktionen zwischen Epithel und Mesenchym beeinflusst. Das bronchiale Mesenchym induziert das Branching in der Trachea, wo hingegen das tracheale Mesenchym das Branching des Bronchialbaumes hemmt. Mit Fortschreiten des pseudoglandulären Stadiums wird das frühe, *pseudo-stratifizierte Epithel*³⁸ zunehmend proximal durch säulenartige Zellen und distal durch kubische Zellen ersetzt. Diese kubischen Zellen, die reich an Glykogen sind, stellen die immaturen³⁹ Typ II-Alveolarepithelzellen dar [26].

Die epitheliale Zelldifferenzierung beginnt in den distalen azinären Strukturen mit der Expression der *Surfactant-Proteine B (SP-B)* und *C (SP-C)*. Diese beiden hydrophoben und lungenspezifischen Proteine werden selektiv im distalen respiratorischen Epithel zwischen der 12. und 14. Woche p. c. exprimiert [27].

Das arterielle System innerhalb der Lunge folgt während seiner Entwicklung den bronchialen und bronchiolären Schläuchen und verzweigt sich parallel zu diesen [28,29].

³¹ Fruchtwasser

³² Hormon-produzierende Zellen

³³ *neuroendokrine Zellen*

³⁴ *Bombesin* ist ein erstmals 1971 aus der Haut der Rotbauchunke (*Bombina bombina*) isoliertes Peptidhormon, das aus 14 Aminosäuren besteht und in ähnlicher Struktur wie das *Gastrin Releasing Peptide (GRP)* mit 27 Aminosäuren am Menschen nachgewiesen werden kann (5).

³⁵ *Serotonin* (5-Hydroxytryptamin; 5-HT) ist ein biogenes Amin, eine Mediatorsubstanz und ein Neurotransmitter. Es wird aus der Aminosäure *Tryptophan* gebildet (1).

³⁶ Schwangerschaftswoche

³⁷ Verzweigung

³⁸ Zellkerne liegen in unterschiedlicher Höhe (1)

³⁹ unreif

Die pulmonalen Venen und die Lymphgefäße nehmen einen anderen Weg durch die Lunge, wobei sie sich innerhalb der Septen des Bindegewebes zwischen den Luftwegen, die jedes pulmonale Segment teilen und umgeben, ausbreiten [30].

Alle präazinären oder distalen Arterien und Venen sind am Ende dieser Periode angelegt [31,32]. Diese Strukturen werden über den Mechanismus der Vasculogenese, durch Epithelzellen oder Angioblasten (aus dem Mesenchym) gebildet und es entstehen endotheliale Röhren. Diese werden von glatten Muskelzellen infiltriert, so dass am Ende dieses Entwicklungsstadiums *Aktin*⁴⁰ und *Myosin*⁴¹ der glatten Muskulatur innerhalb des gesamten Gefäßsystems nachweisbar sind [33,34].

Zahlreiche angeborene Defekte der Morphogenese der Verzweigung der Lunge können während der *pseudoglandulären Phase* der Lungenentwicklung in Erscheinung treten. Dazu gehören die *CCAM*⁴², die *azinäre Aplasie* oder *Dysplasie*⁴³ und die *pulmonale Hypoplasie*.

Die *pleuroperitoneale Höhle* schließt sich in der frühen pseudoglandulären Phase. Ein Versagen dieses Verschlusses wird häufig von einer Herniation der Bauchorgane⁴⁴ in den Brustkorb begleitet, was wiederum zur Komprimierung der Lunge und damit zu einer sekundären Lungenhypoplasie führt [9].

1.1.3. Kanalikuläre Phase

Die kanalikuläre Phase weist zwei sehr wichtige Entwicklungsschritte auf: die Differenzierung der Typ I- und Typ II-Pneumozyten und die Bildung der kapillären Barriere der Alveolen [35].

Das Surfactant-Protein ist ab der 24. Woche des intrauterinen Lebens detektierbar.

In der kanalikulären Phase kommt es, unter Aussprossung der *Canaliculi* aus den *Bronchioli terminales*, zur Bildung des *Parenchyms*⁴⁵ der Lunge. Es entstehen auf diese Weise von jedem Azinus, der von einem Bronchiolus terminalis ausgeht, die *Bronchioli respiratorii*, *Ductuli alveolares* und später die *Sacculi alveolares*. Eine Veränderung des Epithels und des umgebenden Mesenchyms folgt. Entlang des Azinus kommt es zum Einwachsen von kleinen Kapillaren, die die Azini somit umgeben und die wichtigste Grundlage für den späteren Gasaustausch schaffen. Das Lumen der Tubuli vergrößert sich und unter Abflachung der Epithelzellen bilden sich aus den Pneumozyten⁴⁶ vom Typ II die Typ I-Pneumozyten. Dies ist der wichtigste Schritt zur extrauterinen Lebensfähigkeit des Fetus ab der 24. SSW [35].

Die Cluster der azinären Schläuche und Knospen wachsen durch weitere Verlängerung, Unterteilung und Erweiterung auf Kosten des umliegenden Mesenchyms. Das Verhältnis der sich teilenden epithelialen und endothelialen Zellen steigt an und die Zahl der sich teilenden interstitiellen Zellen (*Fibroblasten*⁴⁷) fällt ab. Das Wachstum des Epithels weitet sich auf die größeren Luftwege aus und die Zellteilung tritt vorwiegend in den peripheren azinären Schläuchen und Knospen auf. Dieses periphere Wachstum wird vom Wachstum

⁴⁰ Bestandteil der *Myofilamente* und *Myofibrillen* des Zytoskeletts (1)

⁴¹ Muskelprotein der *Myofibrillen* (1)

⁴² *Kongenitale zystische adenomatoide Malformation*

⁴³ Fehlbildung oder Fehlentwicklung eines Gewebes oder Organs (1)

⁴⁴ Vorwölbung der Bauchorgane in den Thorax

⁴⁵ Das *Parenchym* bilden spezifische Zellen eines Organs, die dessen Funktion bedingen (1).

⁴⁶ Alveolarepithelzellen, Lungenepithelzellen

⁴⁷ Bindegewebszellen

und von der Entwicklung der intra-azinären Kapillaren (aus *Angioblasten*⁴⁸ des Interstitiums) begleitet, die sich um die Lufträume anlagern und mit dem angrenzenden Epithel, zur Formung der primitiven *alveolo-kapillären Membran*, in Kontakt treten. Die Differenzierung der Epithelzellen wird komplex und ist besonders gut in den distalen Regionen des Lungenparenchyms zu beobachten, wo alveoläre Typ I- und Typ II- Zellen vorkommen [35]. Die bronchialen Zellen beginnen damit, zellspezifische Proteine zu synthetisieren, wie das CCSP⁴⁹ [36].

Kuboide Typ II-Zellen, die die distalen Schläuche auskleiden, exprimieren steigende Mengen von *Surfactant-Proteinen* und *Phospholipiden* [36,37]. *Lammelläre Körperchen*, die eine Speicherform des Surfactants der Lunge darstellen, werden gemeinsam mit reichlicher Speicherung von Glykogen in den kubischen Prä-Typ-II-Zellen vorgefunden, die die azinären Schläuche und Knospen auskleiden [38]. Die Zellen der proximalen azinären Schläuche flachen ab und zeigen somit typische Eigenschaften von Alveolarepithelzellen vom Typ I. Die Differenzierung zu Alveolarepithelzellen vom Typ I tritt gemeinsam mit der Bildung der alveolo-kapillären Membran auf. Dies geschieht, wo immer Endothelzellen des sich entwickelnden kapillären Systems mit angrenzenden azinären Epithelzellen in Kontakt treten [38]. Wo dies der Fall ist, schalten die interzellulären, junctionalen Komplexe, die normalerweise um den *Apex*⁵⁰ der Epithelzellen lokalisiert sind, auf die basolaterale Seite des interzellulären Spaltes um. Die Zellen entwickeln dünne zytoplasmatische Ausläufer und differenzieren sich in squamöse Typ I-Zellen und verlieren Merkmale, die ursprünglich mit Prä-Typ I-Zellen in Verbindung gebracht wurden. Am Ende der kanalikulären Phase ist die alveolo-kapilläre Membran (*Blut-Luft-Barriere*) dünn genug, um den Gasaustausch zu ermöglichen [38].

Abnormitäten der Lungenentwicklung, die in der kanalikulären Phase auftreten, sind: *azinäre Dysplasie*, *alveolokapilläre Dysplasie* und *pulmonale Hypoplasie*. Letztere wird häufig durch eine *Zwerchfellhernie* und die darauf folgende Kompression der Lunge durch den abdominalen Inhalt, durch *Ruptur der Membranen*⁵¹ mit der Entstehung eines *Oligohydramnions*⁵², oder durch *renale Agenesie*⁵³ (*Potter Syndrom*), bei welcher die Produktion der Amnionflüssigkeit gestört ist, verursacht [9].

Ein postnataler Gasaustausch wird in der späten kanalikulären Phase ermöglicht. Kinder, die während dieser Periode geboren werden, leiden unter schweren Komplikationen, die vom Grad der Reduktion der Levels des Surfactants abhängen und das *RDS*⁵⁴ und die Bildung von *hyalinen Membranen* auslösen. Die Verabreichung von exogenem Surfactant verbessert das Überleben dieser Kinder, aber leider entwickelt sich häufig eine *bronchopulmonale Dysplasie* als Spätkomplikation einer Ventilations-Therapie bei RDS. Die Synthese des Surfactants und die Ausdünnung des Mesenchyms kann durch Glucocorticoide beschleunigt werden [39,40], die der Mutter zur Prophylaxe eines kindlichen RDS verabreicht werden [41].

Das kanalikuläre Stadium wurde nach dem Erscheinen von vaskulären Kanälen oder Kapillaren benannt, die im interstitiellen Raum erscheinen und die *Blut-Luft-Barriere*⁵⁵

⁴⁸ gefäßbildende Zellen

⁴⁹ Clara-cell-secretory-protein

⁵⁰ Spitze

⁵¹ das Einreißen der Fruchtblase

⁵² Fruchtwassermangel

⁵³ vollständiges Fehlen der Niere (1)

⁵⁴ *Respiratory Distress Syndrome* (Ateminsuffizienz-Syndrom mit möglichem Lungenversagen) (1)

⁵⁵ auch *alveolo-kapilläre Membran*

formen. Diese bildet die zukünftige Gasaustausch-Oberfläche der Lunge. Die Entwicklung der alveolo-kapillären Membran ist, gemeinsam mit der Synthese und Sekretion des Surfactants, eine kritische Determinante für das extrauterine Überleben des immaturren Fetus, wenn dieser vorzeitig, gegen Ende dieses Stadiums, geboren wird. Ein Gasaustausch kann beim frühgeborenen Kind nicht stattfinden, solange diese Kapillaren dem angrenzenden Alveolarepithel nicht ausreichend angenähert sind. Eine schnelle Ausdehnung des Gefäßbettes mit einer Kondensation und Ausdünnung des Mesenchyms ist der erste kritische Schritt bei der Bildung der Gasaustausch-Regionen der Lunge. Während dieses Stadiums der Lungenentwicklung steigt die gesamte Gasaustausch-Oberfläche der alveolo-kapillären Membran exponentiell an und dies wird von einer Abnahme der mittleren Dicke der mesenchymalen Wände begleitet, wodurch das Gasaustausch-Potential der unreifen Lunge ansteigt [42]. Störungen in diesem Entwicklungsstadium führen zu schwerer *Hypoxämie*⁵⁶ und sind mit dem Leben nach der Geburt nicht vereinbar [42].

Erste „*paradoxe Atembewegungen*“ des Embryos kann man schon am Ende der Embryonalzeit beobachten, die allerdings, allem Anschein nach, noch keinen Zweck erfüllen [43]. Das Lungenepithel produziert gegen Ende der kanalikulären Phase einen großen Teil der *Amnionflüssigkeit*⁵⁷. Die Lungenreife kann ab diesem Zeitpunkt, anhand der Messung des durch die Pneumozyten vom Typ II gebildeten *Surfactants*⁵⁸, beurteilt werden.

Der Surfactant besteht aus *Glycerophospholipiden*, *spezifischen Proteinen*, *Neutralfetten* und *Cholesterol*. Er überzieht die alveoläre Oberfläche und reduziert die Oberflächenspannung, damit die Alveolen nach der Geburt bei der Expiration nicht kollabieren. Er enthält einen Anteil an *Lezithin* und *Sphingomyelin*, der sich im Reifungsprozess zugunsten des Lezithin-Anteils verschiebt. Entwicklungsschäden in diesem Stadium führen bereits zu Strukturveränderungen am späteren Lungenparenchym [42].

1.1.4. Sakkuläre Phase

In dieser Phase bildet sich eine große Anzahl von Aussackungen am Ende des terminalen Lungenbaumes. Die Teilung der Luftwege ist fast vollständig abgeschlossen und das weitere Wachstum und die weitere Entwicklung der Lunge beinhalten die Vergrößerung der peripheren Luftwege mit der Dilatation der azinären Tubuli, die somit die *Sacculi* bilden, die diesem Stadium seinen Namen geben. Zusätzlich vollzieht sich eine Ausdünnung der Wände der Luftwege. Dies vergrößert die Oberfläche für den Gasaustausch enorm [42].

Die Lunge setzt ihre periphere Entwicklung durch Verzweigung und Wachstum der *alveolären Ductuli* fort, so dass sich am Ende dieser Periode drei zusätzliche Generationen von alveolären Ductuli, die in *terminalen Sacculi* enden, finden.

Diese peripheren Lungenregionen nehmen durch Verlängerung und Erweiterung aller Segmente distal der terminalen Bronchiolen an Größe zu. Die intersacculären und interductalen Septen, die kollagene Fasern und ein doppeltes kapilläres Netzwerk enthalten, entwickeln sich [42]. Es zeigen sich im weiteren Verlauf ultrastrukturelle Anzeichen der Zytodifferenzierung. Die Reifung der Typ II-Epithelzellen schreitet fort und

⁵⁶ Erniedrigung des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks (1)

⁵⁷ kindliches Fruchtwasser

⁵⁸ *Surfactant* ist eine Abkürzung für *surface active agent* (engl.) (1).

geht mit einer ansteigenden Synthese der *Surfactant-Phospholipide* [41,44] und der *Surfactant-assoziierten Proteine A, B, C und D* [36,45] einher. Der Glykogengehalt wird reduziert und die Aktivität der Enzyme innerhalb der Mitochondrien steigt, was auf eine Umschaltung in Richtung *aerober oxidativer Prozesse* hindeutet. Die lamellären Körperchen steigen in Anzahl und Größe und eine ansteigende Menge an *tubulärem Myelin*⁵⁹ ist innerhalb der terminalen Lufträume nachweisbar [38,46]. Die Konzentration des Surfactants ist noch gering und seine Zusammensetzung aus Phospholipiden weicht signifikant von jener zum Geburtszeitpunkt ab [41].

Squamöse Typ I-Zellen differenzieren weiterhin und bedecken einen größer werdenden Teil der Oberfläche der distalen Lunge. Die Vergrößerung der potentiellen Gasaustauschoberfläche hängt von der Entwicklung der Typ I-Zellen mit ihrer abgeflachten squamösen Zellform ab. Die Blutgefäße geraten in nähere Umgebung der squamösen Typ I-Zellen, wodurch die Distanz der Diffusion zwischen den Lufträumen und dem Gefäßbett sinkt. Die Basalmembranen des Epithels und Endothels fusionieren und formen die dünnwandige alveolo-kapilläre Membran. In der Lunge des Erwachsenen und des Neugeborenen beträgt die Dicke der alveolo-kapillären Membran 0,6 µm und sie gestattet die passive Diffusion von Sauerstoff und CO₂ zwischen dem alveolären Lumen und dem Gefäßbett [42].

Am Ende des sakkulären Stadiums enthält das *Stroma* (oder *interstitielle Gewebe*) einen ansteigenden Gehalt von *ECM* und *Elastin*. Diese werden in jenen Bereichen abgelagert, wo zukünftige interalveoläre Septen entstehen. Damit werden die terminalen Sacculi in echte Alveolen unterteilt. Die unreife Lunge enthält relativ wenig Elastin- und Kollagenfasern, ist nur wenig elastisch und kann in diesem Stadium leicht rupturieren⁶⁰ [16].

Am Anfang des sakkulären Stadiums haben sich in den Luftwegen beide Arten von Zellen, Zilien-tragende und schleimbildende Zellen, entwickelt. Der Knorpel und die submucosalen Drüsen erweitern sich so weit abwärts in die Luftwege, wie sie dies auch in der reifen Lunge tun. Die epithelialen Zellen produzieren die fetale Lungenflüssigkeit.

Die Störungen in der Entwicklung während der sakkulären Phase sind jenen in der kanalikulären Phase vergleichbar. Es treten *pulmonale Hypoplasie*, *azinäre Dysplasie* oder *Aplasie*, *Dysplasie der alveolären Kapillaren*, das *RDS*, *hyaline Membranen* und die *bronchopulmonale Dysplasie* auf [16].

Die letzte Aufteilung sind die *Bronchioli terminales*. Am Ende des Pfades der Atemwege bilden sich glattwandige Aussackungen (*Sacculi*), die von Typ I und Typ II Pneumozyten ausgekleidet sind. Die Septen zwischen den Sacculi (*primäre Septen*) sind noch dick und enthalten Netzwerke von Kapillaren. Das zellreiche Interstitium zeigt eine geringe Zahl von kollagenen und elastischen Fasern, es spielt aber eine wichtige Rolle für die Differenzierung und das Wachstum des darüber liegenden Epithels.

Am Ende dieser Phase beginnen die *Fibroblasten*, die im Interstitium ansässig sind, mit der Produktion von extrazellulärem Material, sowohl im interductalen als auch im intersakkulären Raum [47].

Zum Zeitpunkt der Geburt sind die Sacculi glatt und dünnwandig und entsprechen den *Sacculi alveolares*. Alle Generationen des leitenden und parenchymatösen Atemwegganges sind bereits entstanden [47].

⁵⁹ sekretorische Form des Surfactants

⁶⁰ rupturieren: einreißen

1.1.5. Alveoläre Phase

Diese Phase beginnt, unterschiedlichen Autoren zur Folge, zu unterschiedlichen Zeitpunkten [47]. In diesem Stadium werden vor allem die *sekundären Septen* der terminalen Luftwege und die schalenförmigen *Alveolen* gebildet. Es entstehen sekundäre Septen, deren Wände ein doppeltes Netzwerk von Kapillaren enthalten und die Vervielfältigung der Alveolen schreitet rasch, mindestens bis zum zweiten menschlichen Lebensjahr, fort [48].

Am Anfang dieses Stadiums sind die alveolären Septen relativ dick und enthalten auf jeder Seite eines zentralen Kerns aus Bindegewebe ein kapilläres Netzwerk, also ein doppeltes Netzwerk von Kapillaren. Die sekundären interalveolären Septen bestehen aus Bindegewebe, das ebenfalls ein doppeltes Netzwerk an Kapillaren und interstitielle Zellen aufweist, die Kollagen und Elastin synthetisieren. Die Umstrukturierung eines terminalen Sacculus zu einem echten Alveolus vollzieht sich mittels einer Verlängerung und Ausdünnung der sekundären Septen, einer Reduktion des septalen interstitiellen Gewebes und der Fusion der beiden kapillären Netzwerke zu einem gemeinsamen Netzwerk [42].

Der pulmonale Gefäßwiderstand sinkt während des *Remodelings*⁶¹ der pulmonalen Gefäße und des kapillären Bettes. Dieses Stadium wird von einer schnellen Zellproliferation der Epithel- und Mesenchymzellen begleitet. Interstitielle Fibroblasten proliferieren aktiv und früh in diesem Stadium, doch mit zunehmender Ablagerung von Kollagen, Elastin und Fibronektin wird ihre Proliferation langsamer. Es zeigt sich ein starkes endotheliales Wachstum in dieser Phase und die sich teilenden endothelialen Zellen erscheinen vorwiegend in den Bereichen der Leisten der sich entwickelnden sekundären Septen. Beide, sowohl die Typ I-, als auch die Typ II-Zellen, steigen in ihrer Anzahl in diesem Stadium an, aber nur die Typ II-Zellen proliferieren aktiv. Die Typ I-Zellen scheinen terminal differenziert zu sein und es fehlt ihnen offenbar an Kapazität für die Mitose. Auch bilden die Typ II-Zellen etwa zwei Drittel der Gesamtzahl der Alveolarepithelzellen in der adulten Lunge. Die größeren squamösen Typ I-Zellen belegen etwa 93% der Gesamtoberfläche der Alveolen. Typ I-Zellen formen eine enge epitheliale Barriere, die für Ionen und extrazelluläre Flüssigkeit impermeabel⁶² ist. Sie sind aber leicht durch Oxidantien, Barotrauma und Infektionen zu verletzen und lösen sich dann von der Alveolarwand ab [9].

Eine Schädigung der Lunge in diesem Entwicklungsstadium führt zu einem abnormen Remodeling der Lunge mit einer Reduktion der Zahl der Alveolen und zur Entwicklung einer *interstitiellen Fibrose*⁶³ [9].

Ein anderer Faktor, der Störungen der Alveolarisierung hervorrufen kann, ist die Anwendung von Glucocorticoiden, die die zelluläre Proliferation inhibieren und damit die Septierung und Bildung der Alveolen reduzieren. Andererseits führt die Anwendung von Glucocorticoiden zu einer verstärkten Ausdünnung der alveolären Septen, steigert die Reifung von Typ II-Zellen und verstärkt dadurch die Produktion von Surfactant in der prämaturen Lunge und in fetalen Explantaten von Lungen [39,40]. Zu den Störungen, die mit der alveolären Phase der Lungenentwicklung assoziiert sind, gehören: das *Persistieren der fetalen Zirkulation*, die *pulmonale Hypertension des Neugeborenen*, das *Lappen-Emphysem*⁶⁴, das *Mekonium-Aspirations-Syndrom*⁶⁵, die *Pneumonie*⁶⁶ und das *RDS* in Assoziation mit *genetischer Surfactant-Protein-B-Defizienz* [49, 50].

⁶¹ Umbau

⁶² undurchdringbar

⁶³ Bindegewebszunahme im Bereich des Lungeninterstitiums (1)

⁶⁴ Lappen-Überblähung (1)

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Einen zeitlichen Überblick über die Stadien der Lungenentwicklung gibt die **Abbildung 1**.

Zum Zeitpunkt der Geburt sind etwa 1/3 der insgesamt 300 Millionen Alveolen ausgebildet und es bilden sich offenbar gegen Ende der Schwangerschaft neue Sacculi und daraus weitere Alveolen. Das Parenchym bildet zwischen den Sacculi alveolares die *primären Septen* und besteht aus einer Doppelschicht von Kapillaren.

Entlang der primären Septen bilden sich noch vor der Geburt multiple Ausstülpungen. Sie unterteilen dann die Sacculi in kleinere Alveolen, die durch *sekundäre Septen* begrenzt werden. Die Alveolen sind von elastischen Fasern umgeben und diese bilden interstitielle Septen zwischen zwei Kapillarnetzen.

Die Alveolisierung und Bildung von sekundären Septen nimmt bis zum sechsten Lebensmonat noch massiv zu, läuft beim Menschen über den Zeitpunkt der Geburt hinaus und wird im zweiten bis dritten Lebensjahr beendet.

Die endgültige Zahl der Alveolen in der reifen und entwickelten Lunge reicht von 300 – 600 Millionen, was einer Anzahl von etwa 1000 Alveolen pro Azinus entspricht [51].

Die definitiven Alveolen können in der menschlichen Lunge ab der 36. Schwangerschaftswoche gefunden werden und mehr als 85 bis 90% aller Alveolen werden innerhalb der ersten sechs Lebensmonate gebildet [52]. Nach den ersten sechs Lebensmonaten setzt sich die Bildung der Alveolen in langsamerer Weise bis zum zweiten Lebensjahr fort, und das weitere Wachstum der Lunge nimmt dann proportional zum Körperwachstum zu. Die Oberfläche für den Gasaustausch und die Diffusionskapazität steigen linear mit dem Körpergewicht bis zum 18. Lebensjahr an [53].

⁶⁵ Eine *Mekoniumaspiration* (*Mekoniumaspirationssyndrom*, *MAS*) bezeichnet das Eindringen von *Mekonium* in die Lungen des Neugeborenen vor oder während der Geburt und die damit verbundene Folgesymptomatik. *Mekonium*, auch „*Kindspech*“ genannt, ist die Bezeichnung für den Darminhalt des Feten und den Stuhlgang des Neugeborenen in den ersten Lebenstagen (6).

⁶⁶ Lungenentzündung

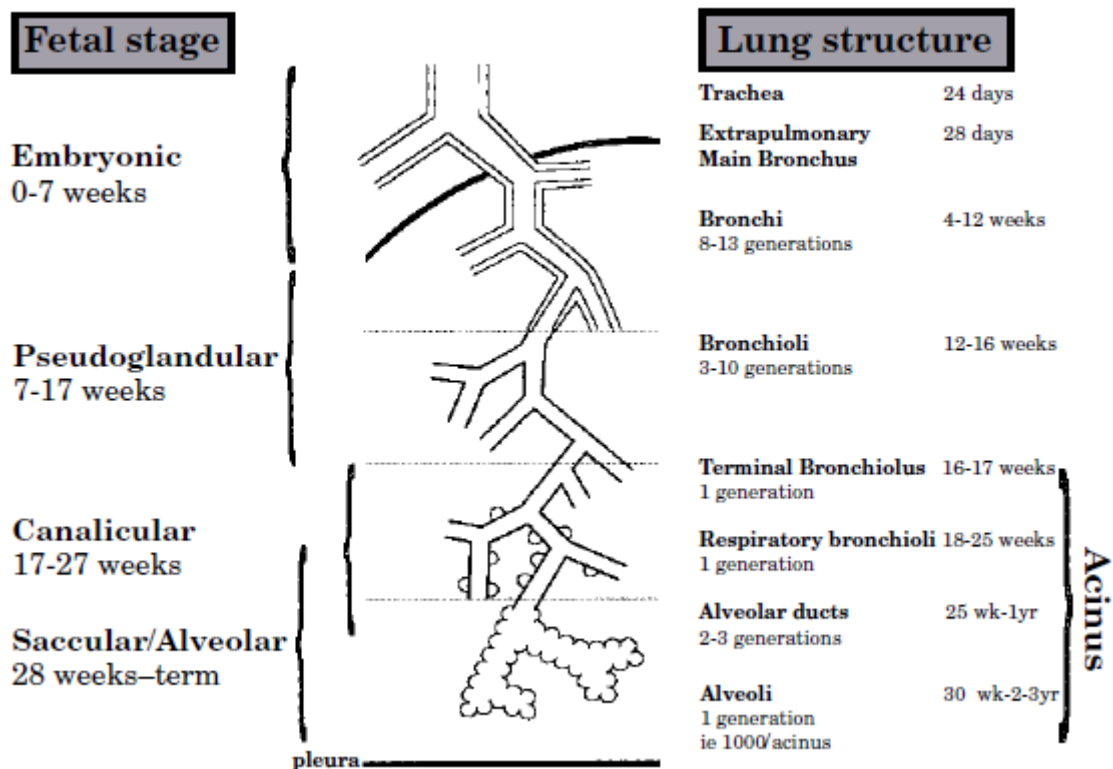


Abbildung 1: Stadien der Lungenentwicklung. Quelle: © Hislop A [7,29]

1.2. Anatomie der adulten Lunge

Die adulte Lunge besteht aus *konduktiven*⁶⁷ und *respiratorischen*⁶⁸ Abschnitten. Die konduktiven Abschnitte enthalten alle Zweige des Bronchialbaumes. Als *Bronchien* werden die Strukturen, die Knorpelgewebe und *seromuköse Drüsen* enthalten, bezeichnet. Fehlen Knorpel und Drüsen, so tragen sie die Bezeichnung *Bronchiolen* [54].

Konduktive Abschnitte (16 Generationen) [54]:

- *Bronchi segmentales* (Segmentbronchien)
- *Bronchi intersegmentales* (bis 1 mm Durchmesser)
- *Bronchioli* (unter 1 mm Durchmesser)
- *Bronchioli terminales* (0,4 mm Durchmesser, Endstrecke der konduktiven Atemstrecke)

Respiratorische Abschnitte (7 Generationen) [54]:

- *Bronchioli respiratorii* (3 Generationen)
- *Ductuli alveolares* (3 Generationen)
- *Sacculi alveolares* (enden in der letzten, 23. Generation)

⁶⁷ luftleitende Abschnitte

⁶⁸ Abschnitte des Gasaustausches

Für die Entwicklung und Aussprossung von neuen Lungenknospen sind Faktoren wie *TGF- β* ⁶⁹ und *EGF*⁷⁰ von entscheidender Bedeutung. Vor allem geht es dabei um die Interaktion zwischen dem respiratorischen Epithel und dem umgebenden Lungenmesenchym. Um die Gänge und in den Aufgabelungen des Lungenbaumes finden sich unter anderem auch *Kollagene* vom *Typ I* und *III*, sowie das Proteoglykan *Fibronectin* und das Glykoprotein *Syndecan*. Diese stabilisieren die älteren, bereits geformten Lungensprossen und sind in den neu gebildeten Strukturen noch nicht vorhanden. Ein Protein wie *Epimorphin* spielt offenbar eine entscheidende Rolle bei der Röhrenformung und Bildung der epithelialen Gänge. Wenn es durch einen Antikörper blockiert wird, bleibt das Epithel ungeformt und organisiert sich nicht [54,55].

1.3. Postnatale Entwicklung der Lunge

Die Vervielfältigung der Alveolen schreitet in der postnatalen Periode zumindest bis zum Alter von zwei bis drei Jahren fort und die Größe der Alveolen und ihrer Oberfläche steigen bis nach der Adoleszenz an [7]. Ochs *et al.* [56] berichteten über eine Anzahl von 300 bis 800 Millionen Alveolen in einer vollentwickelten adulten Lunge, was einer Anzahl von etwa 170 Alveolen pro mm³ entspricht. Untersuchungen, die post-mortem an Lungen von Kindern, die in Folge eines Traumas oder einer kurzen Krankheit verstarben, durchgeführt wurden, zeigten, dass Knaben größere Lungen als Mädchen gleicher Statur aufwiesen und es fiel unter den Knaben auch eine höhere Anzahl an Alveolen und eine größere alveoläre Oberfläche, als bei Mädchen vergleichbaren Alters und vergleichbarer Statur auf [51].

Bei genauerer Betrachtung des Kalibers der kleinen, auf natürliche Weise maximal erweiterten Luftwege und Alveolen, beschrieben Zeman *et al.* bei 53 Kindern im Alter von sechs bis 22 Jahren und 50 Erwachsenen im Alter von 22 bis 80 Jahren, dass die Größe beider, sowohl der kleinen Luftwege, als auch der Alveolen, mit zunehmendem Alter auf signifikante Weise, bis zum Erreichen eines Alters von 22 Jahren, expandierte. Allerdings war danach die Größenzunahme nicht mehr signifikant [57].

1.3.1. Stadium der Reifung der Mikrogefäße (wenige Monate bis 2-3 Jahre)

Das wohl wichtigste Ereignis dieses Stadiums ist die Entstehung eines einzelnen *kapillären Layers*⁷¹ aus dem doppelten kapillären Netzwerk. Dies ist deshalb von so großer Bedeutung, weil die *Angiogenese*⁷² und *Alveolarisierung*⁷³ der Lunge Hand in Hand gehen und weil, wenn das kapilläre Netzwerk einmal zum einzelnen kapillären Layer geworden ist, keine Bildung neuer alveolärer Septen mehr möglich ist.

Dieser Sachverhalt wird heute als Hauptgrund des prämaternen Arrests des Lungenwachstums nach postnataler Behandlung mit *Dexamethason*⁷⁴ bei Kindern mit chronischer Lungenerkrankung angenommen [48].

⁶⁹ *Transforming growth Factor- β*

⁷⁰ *Epidermale growth factor*

⁷¹ einzelne Gefäßschicht

⁷² Gefäßbildung

⁷³ Bildung der Alveolen

⁷⁴ ein *Glucocorticoid*

1.3.2. Fetales Lungenvolumen, fetale Lungenflüssigkeit, Amnionflüssigkeit und fetale Atembewegungen

Die Wirkung von *Vasopressin*⁷⁵, *Katecholaminen*⁷⁶, *Cortisol*, *Prostaglandin E2* und *atrialem natriuretischen Hormon*⁷⁸ ist mit einer Abnahme der Produktion der fetalen Lungenflüssigkeit zum oder um den Geburtstermin assoziiert. Auch das Volumen der Amnionflüssigkeit trägt zur Dehnung der fetalen Lunge bei und damit auch zum Lungenwachstum. An der fetalen Ratte zeigten sich, bei Vorliegen eines *Oligohydramnions*, ein retardiertes Lungenwachstum und eine retardierte Entwicklung der Typ I-Alveolarepithelzellen. Allerdings konnten Kitterman *et al.* keine Effekte auf die Typ II-Zellen und die Produktion des Surfactants nachweisen [58].

Ein Anstieg der CO₂- und Glukose-Levels, eine *Azidose*⁷⁹ und Substanzen, wie *Koffein* und *Theophyllin*⁸⁰, sind mit einer Steigerung fetaler Atembewegungen assoziiert.

Mütterliches Rauchen und der Gebrauch von Alkohol und Drogen sind dafür bekannt, die fetalen Atembewegungen zu reduzieren. In ähnlicher Weise rufen auch *Hypoxie*, *Hypoglykämie*, *intrauterine Infektionen* und *Prostaglandin E2* nachteilige Effekte auf diese Atembewegungen hervor [7].

1.3.3. Hormonelle, transkriptionelle und Wachstums-Faktoren

Das Schilddrüsenhormon spielt offenbar eine wichtige Rolle bei der Differenzierung der Epithel- und Mesenchymzellen und dem *Branching*⁸¹ der Luftwege in frühen Entwicklungsperioden, aber auch bei der Differenzierung der Typ II-Zellen und der Sekretion des Surfactants in der späteren Entwicklung.

⁷⁵ *Antidiuretisches Hormon, Adiuretin*

⁷⁶ *Katecholamine* sind eine Klasse von körpereigenen und künstlichen Stoffen, die an den sympathischen *Alpha-* und *Beta-Rezeptoren* des Herz-Kreislaufsystems eine anregende Wirkung haben. Somit fungieren Katecholamine als Hormone, die pharmazeutisch zu den Sympathomimetika zählen (7).

⁷⁷ *Prostaglandine* sind eine Gruppe von Gewebshormonen. Sie entstehen durch *Cyclooxygenasen (COX-1 und COX-2)* und nachfolgenden verschiedenen *Prostaglandin-Synthasen* aus der *Arachidonsäure* oder der *Eicosapentaensäure*. Das Hauptaugenmerk in der Pharmaforschung liegt auf den Prostaglandinen aus der *Arachidonsäure (Serie-2)*, da diese für Schmerz, Blutgerinnung, Entzündungen u. a. verantwortlich sind (8).

⁷⁸ *Atriales natriuretisches Peptid (ANP)*, auch bekannt als *atrialer natriuretischer Faktor (ANF)*, oder *Atriopeptin*, ist ein *Peptidhormon*, das zum größten Teil von den Muskelzellen (*Myocyten*) des Herzvorhofes (*Atrium*) aufgrund von Dehnungsreizen ausgeschüttet wird. Es bewirkt eine Steigerung der Harnausscheidung. Daran gekoppelt ist eine Natrium-Ionen-ausschwemmende (*natriuretische*) Wirkung (10).

⁷⁹ Abfall des pH-Werts (sauer werden)

⁸⁰ *Theophyllin* ist ein Hemmstoff der Phosphodiesterase. Es führt zu Erschlaffung der glatten Muskulatur (11).

⁸¹ Verzweigung

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Tabelle 1: Mögliche Rolle einiger Wachstums- und Transkriptionsfaktoren beim Lungenwachstum und bei der Lungenentwicklung. Quelle: Suchita J [48]

Transkriptions- und Wachstumsfaktoren	Mögliche Rolle bei der Lungenentwicklung und dem Lungenwachstum
FOXA1, FOXA2, GATA4 und GATA6	<ul style="list-style-type: none"> • Bildung und Aufrechterhaltung der Struktur des Vorderdarmes
Tbx4	<ul style="list-style-type: none"> • Lokalisation der Seite der Knospung
Fibroblast growth factors (FGFs)	<ul style="list-style-type: none"> • Lokalisation der Organe, die vom Vorderdarm abstammen • Induktion des <i>Buddings</i>⁸² und <i>Branchings</i> (FGF10) • Alveolarisierung • Differenzierung der Typ II-Zellen • Induktion der Bildung des <i>Surfactant-Proteins C</i> (FGF2 und FGF7)
Sonic hedgehog (Shh)	<ul style="list-style-type: none"> • Unterdrückung der FGF10-Expression und Verhinderung des Branching an Stellen, wo es nicht stattfinden soll
Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4)	<ul style="list-style-type: none"> • Bildung und Kontrolle des dorsalen und ventralen Branchings
<i>HOX</i> -Gene	<ul style="list-style-type: none"> • Definition der drei-dimensionalen Struktur
Epidermal growth factor (EGF)	<ul style="list-style-type: none"> • Proliferation, Differenzierung und Branching der Luftwege
Platelet-derived growth factor (PDGF)	<ul style="list-style-type: none"> • Alveolarisierung
Retinoic Acid (Vitamin A-Säure, RA)	<ul style="list-style-type: none"> • Induktion von FGF10 und endodermale Differenzierung
Transforming growth factor (TGF- β)	<ul style="list-style-type: none"> • Reparatur der Lunge nach Schäden • Matrix Produktion • Hemmung der Zell-Proliferation
Insulin-like growth factor (IGF)	<ul style="list-style-type: none"> • Proliferation der Luftwege
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	<ul style="list-style-type: none"> • Vasculo-, Angio-, und Lymphangiogenese
Granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)	<ul style="list-style-type: none"> • Differenzierung der Makrophase

1.3.4. Umgebungs-Faktoren

Tabakrauch ist als Verursacher eines reduzierten fetalen Lungenvolumens und einer reduzierten Anzahl und Vergrößerung der Alveolen, sowie einer anormalen Septierung bekannt und dies führt wiederum zu einer Reduktion der Gasaustauschoberfläche. Allerdings sind die präzisen Mechanismen und das Timing dieser ungünstigen und nachteiligen Effekte noch nicht bekannt [7].

⁸² Knospung

Eine Studie an Ratten, die von Rehan und Mitarbeitern durchgeführt wurde, brachte interessante Informationen über den Einfluss von Nikotin auf die Morphologie der Typ II-Pneumozyten und deren Metabolismus hervor.

Wenn man Rattenföten im frühen embryonalen Leben vom Tag sechs bis zum Tag 20 dem Einfluss von Nikotin aussetzte, wurde ersichtlich, dass Nikotin zu einer permanenten Veränderung des Wachstums der sich entwickelnden Lunge, durch Stimulation der Proliferation, Differenzierung und des Metabolismus der Typ II-Zellen und damit zu einer Stimulation der Bildung des Surfactants, führte [59].

1.3.5. Chronische Lungenerkrankungen (CLD) und ihr Zusammenhang mit den Stadien der Lungenentwicklung

Sowohl die *Hyperoxie*⁸³, als auch das *Barotrauma*⁸⁴ verursachen Schäden an der Lunge und auch entzündliche Prozesse, die letztlich zu einer Reduktion der Alveolarisierung führen. Die Hyperoxie stört in hohem Maße die Septierung, verursacht eine Steigerung der Durchmesser der terminalen Sacculi und reduziert damit die Oberfläche für den Gasaustausch [35].

Die intrauterine Infektion mit der Mycoplasma-Spezies⁸⁵ *Ureaplasma* und anderen, kann ebenso zu einem gestörten Lungenwachstum des Fetus und Neugeborenen führen. Die postnatale Anwendung von Glucocorticoiden hat sich als „*Rescue-Therapy*“ bei *chronisch ventilierten*⁸⁶ Frühgeborenen als unschätzbar erwiesen, es existieren aber Befürchtungen bezüglich ihrer kurzzeitigen und langzeitigen nachteiligen Effekte.

Aus Studien an Tieren geht hervor, dass Glucocorticoide direkt das alveoläre und mikrovasculäre Wachstum der Lunge beeinflussen können. Tschanz und Mitarbeiter haben sowohl die Effekte einer *Hochdosis-* und *Kurzzeit-*, als auch einer *Niedrigdosis-* und *Langzeit-Therapie* auf die Alveolarisierung und die Entwicklung der Mikrogefäße der Lunge von Ratten untersucht. Dabei zeigte sich eine permanente Beeinträchtigung der Alveolarisierung der Lunge bei einer *Niedrigdosis-Langzeit-Therapie* und das war möglicherweise die Folge einer frühzeitigen Reifung der Mikrogefäße. Die *Kurzzeit-Hochdosis-Therapie* mit Glucocorticoiden, verabreicht an vier aufeinanderfolgenden Tagen, führte bei den Lungen von postnatalen Ratten ebenfalls zum Auftreten einer vorzeitigen Reifung der Mikrogefäße durch die Fusion von Kapillaren und den Arrest der Septierung des Parenchyms, aber diese Effekte waren nur befristet. Diese initiale Phase des beschleunigten Lungenwachstums war nach kurzer Zeit beendet und das normale Wachstum der Alveolen stellte sich am Tag 10 wieder ein. Demzufolge ist zu berücksichtigen, dass die präzise Dosis, das Timing und die Dauer der Therapie mit Glucocorticoiden einen großen Einfluss auf das Lungenwachstum und die Differenzierung der Lunge haben können [7,60].

Neben den Effekten der Glucocorticoide auf die Lungenmorphologie, wurden auch ihre Langzeit-Effekte auf die Lungenfunktion untersucht. Diese Ergebnisse sind allerdings aufgrund der Variationen bezüglich der Anwendung des Surfactants, der Schwere der chronischen Lungenerkrankung, der Dosis, der Dauer und des Timings der Anwendung des Dexamethasons, und aufgrund von unterschiedlichen Methoden der Messung der

⁸³ Vermehrte *Sauerstoffexposition*, zu hohes Sauerstoffangebot

⁸⁴ Schäden, die durch Druck ausgelöst werden (z. B. bei künstlicher Beatmung)

⁸⁵ sehr kleine, eigenständig vermehrungsfähige Bakterien aus der Klasse der *Mollicutes* (1)

⁸⁶ künstlich beatmet

Lungenfunktion, in den unterschiedlichen Studien nur sehr schwer miteinander zu vergleichen oder zu interpretieren [60].

Bei der Durchführung eines *Follow-Ups* durch Jones *et al.* an 145 Kinder im Alter von 13 bis 17 Jahren, die an einer *doppelt-verblindeten RCT*⁸⁷ (1984-1989) mit Dexamethason- (0,5 mg/kg/Tag für eine Woche), oder Plazebo-Behandlung bei Vorliegen von neonatalen chronischen Lungenerkrankungen teilnahmen, ergab sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Lungenfunktion zwischen den beiden Gruppen, was anhand der *Spirometrie*⁸⁸ beurteilt wurde. Diese Studie kam zu dem Ergebnis, dass keinerlei Evidenz dafür besteht, dass die Anwendung von Dexamethason während der neonatalen Periode Langzeitfolgen auf die Lunge hat, aber es wurden auch keinerlei nützliche Effekte gefunden [61].

Eine andere *Follow-Up-Studie* von Nixon *et al.*, wurde an 68 Kindern im Alter von acht und 11 Jahren durchgeführt. In dieser *RCT* (1992-1995) einer über 42 Tage ausschleichenden, postnatalen Dexamethason- (0,5 mg/kg/Tag), oder Plazebo-Therapie während der neonatalen Periode, zur Reduktion der Dauer der Ventilator-Abhängigkeit, kamen die Autoren zu dem Ergebnis, dass die postnatale Dexamethason-Applikation mit einem höheren, *expiratorischen Flow*⁸⁹ assoziiert war, aber die gemessenen *Asthma-Scores*⁹⁰ waren zwischen den beiden Gruppen gleich [62].

Um dem Neugeborenen die Anpassung an die postnatalen Umgebungsfaktoren zu ermöglichen, sind mehrere Faktoren von großer Bedeutung: Die Lungenflüssigkeit muss absorbiert werden, die Lungen müssen sich mit Luft füllen und es muss eine ausreichende Oberfläche für den Gasaustausch vorhanden sein. Die meiste Aufmerksamkeit erfährt in dieser Hinsicht das Surfactant-System, da es den Lungen durch eine Reduktion der alveolären Oberflächenspannung ermöglicht, in expandiertem Zustand zu verbleiben und somit einen wichtigen Faktor der Lungenentwicklung darstellt [7].

Beide, sowohl das Surfactant-System [63], als auch die Flüssigkeits-Clearance der Lunge [64], wurden von verschiedenen Forschergruppen genau untersucht. Die molekularen und zellulären Mechanismen, die zur normalen Entwicklung der Lunge beitragen, waren ebenfalls Gegenstand intensiver Forschung [35].

Für eine normale Lungenentwicklung sind nach McDonald folgende Faktoren von entscheidender Bedeutung: normale fetale Atembewegungen, ein adäquater intra-thorakaler Raum, ausreichende intra- und extra-pulmonale Flüssigkeitsvolumina und ein ausreichender pulmonaler Blutfluss [65].

In jedem der oben angeführten Stadien der Lungenentwicklung können Anomalitäten durch feto-maternale Faktoren ausgelöst werden. Dazu zählen solche, wie die Entwicklung eines *Oligohydramnions*⁹¹, genetische Faktoren (Mangel an *Surfactant-Protein B*), oder entwicklungsbedingte Anomalien [7].

In folgenden Phasen der Lungenentwicklung kommt es zur Assoziation mit entsprechenden Malformationen [7]:

Embryonale Phase:

- *Agenesie*⁹² der Lunge

⁸⁷ *randomisierte kontrollierte Studie*

⁸⁸ Messung der Atemfunktion

⁸⁹ Expiratorischer Atemfluss (1)

⁹⁰ Score zur Beurteilung des Schweregrades des Asthmas (1)

⁹¹ verringerte Menge an Fruchtwasser (1)

⁹² vollständiges Fehlen einer Gewebe- oder Organanlage (1)

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

- *Agenesie* oder *Stenose*⁹³ des Larynx oder der Trachea
- *Tracheo-* oder *Bronchomalazie*
- bronchiale Fehlbildungen
- *ektope*⁹⁴ Lungenlappen
- atrio-ventrikuläre Malformationen
- kongenitale Zysten der Lappen

Pseudoglanduläre Phase:

- zystisch-adenomatoide Malformation
- *Hypoplasie*⁹⁵ der Lunge
- Lungenzysten
- *kongenitale pulmonale Lymphangiektasie*⁹⁶
- *kongenitale Zwerchfellhernie (CDH)*

Kanalikuläre Phase:

- *Lungenhypoplasie*
- *Respiratory-Distress-Syndrom*⁹⁷
- *Dysplasie* der Azini

Sacculäre und alveoläre Phase:

- *Lungenhypoplasie*
- *RDS*
- *Dysplasie* der Azini
- *Dysplasie* der alveolären Kapillaren

Wigglesworth und Desai [66] demonstrierten in eleganter Weise die Wichtigkeit und Bedeutung der fetalen Atembewegungen für die normale Lungenentwicklung und das normale Lungenwachstum. Eine experimentelle Unterbindung dieser Atembewegungen, durch eine Durchtrennung des Rückenmarkes auf Höhe des *Nervus phrenicus*, führte zur Unterentwicklung der Lungen bei neugeborenen Hasen. Wurde diese Durchtrennung auf Höhe von C1 bis C3 durchgeführt, also oberhalb des phrenischen Nervs, bildeten sich hypoplastische Lungen mit reduziertem Lungengewicht und dürftig entwickelten, dünnwandigen terminalen Säckchen aus. Bei Durchtrennung des Rückenmarks unterhalb des Zwerchfellnervs, auf dem Level C5 bis C8, wurde ebenfalls eine gewisse Gewichtsreduktion der Lungen beobachtet, aber die terminalen Säckchen der Lungen waren mit jenen von Tieren der Kontrollgruppe vergleichbar. Nachdem an anderen Organen keine Anomalitäten beobachtet wurden, wurde die anormale Lungenentwicklung von den Autoren mit der Abwesenheit der Atembewegungen in Verbindung gebracht [66].

⁹³ Verengung

⁹⁴ Eine *Ektopie* ist eine angeborene Verlagerung von Geweben oder Organen an eine ungewöhnliche Stelle (1).

⁹⁵ Unterentwicklung

⁹⁶ angeborene Fehlbildung der Lymphgefäße der Lunge (1)

⁹⁷ Das *RDS* ist ein schweres Ateminsuffizienzsyndrom, das zum Lungenversagen führt (1).

Weitere Experimente bestätigten die zuvor angeführten Beobachtungen und wurden von Fewell *et al.* [67] durchgeführt, die die Folgen einer Durchtrennung des Nervus phrenicus an Schafen untersuchten. Diese Forschergruppe berichtete außerdem über reduzierte Flüssigkeitsmengen in den Luftwegen, ein reduziertes Lungengewicht und einen reduzierten *DNA*⁹⁸-Gehalt der Lungen. Die Produktion der Lungenflüssigkeit war davon nicht betroffen. Auch diese Experimente unterstreichen die Bedeutung der fetalen Atembewegungen bezüglich der normalen Lungenentwicklung. Eine Störung der Zwerchfellbeweglichkeit und -Beschaffenheit reduziert das intrathorakale Volumen, weil sich dadurch Bauchorgane in die Thoraxhöhle vorwölben können [67].

1.4. Fetale Atembewegungen

Am menschlichen Fetus werden die ersten Atembewegungen in der 11. Schwangerschaftswoche verzeichnet, aber in der 30. bis 40. Schwangerschaftswoche nimmt ihre Frequenz stark zu. Sie steigen nach mütterlichen Mahlzeiten, offenbar durch den Anstieg des mütterlichen Blutglukose-Spiegels, und es zeigt sich ein *zirkadianer Rhythmus*⁹⁹ mit minimalen Atembewegungen (zwischen 14 Uhr und Mitternacht) und gesteigerten Bewegungen (zwischen 4 und 7 Uhr früh) [7]. Während der mütterlichen Wehen sinkt die Aktivität der fetalen Atembewegungen von 25% zu Wehenbeginn auf 8% während der späten Wehen und auf unter 1% während der aktiven Wehen [68]. Ash *et al.* [69] berichteten allerdings über eine fetale Atemaktivität, die sich von 76% im Stadium der frühen Wehen, auf 90% im Stadium der späten Wehen steigerte. Die fetale Atembewegung scheint mit dem Verhaltenszustand des Fetus in Zusammenhang zu stehen [70]. Wenn der Fetus den Zustand der Reife erreicht, ist die Inzidenz dieser Atembewegungen während der Perioden fetaler Aktivität größer, als während jener fetaler Inaktivität [71]. Neben einem zirkadianen Rhythmus und einem Zusammenhang mit dem Schlaf beeinflussen viele andere Faktoren die Atembewegungen des Fetus [7]:

Zu einem **Anstieg** der fetalen Atembewegungen führen:

- *Hyperkapnie*¹⁰⁰
- *Hyperglykämie*¹⁰¹
- *Azidose*¹⁰²
- Temperaturanstieg
- *Indomethacin*¹⁰³
- *Koffein*
- *Theophyllin*

Zu einer **Abnahme** der fetalen Atembewegungen führen:

- *Hypoxie*¹⁰⁴
- *Hypoglykämie*

⁹⁸ *Desoxyribonucleinsäure*

⁹⁹ tageszeitlicher Rhythmus

¹⁰⁰ erhöhter CO₂-Gehalt im Blut (1)

¹⁰¹ erhöhter Blutzuckerspiegel (1)

¹⁰² Abfall des Blut-pH-Wertes

¹⁰³ NSAR (nicht-steroidaler Entzündungshemmer) (1)

¹⁰⁴ Sauerstoffmangel

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

- *Prostaglandin E2*
- mütterliches Rauchen
- mütterlicher Alkoholkonsum
- intrauterine Infektionen
- *Diazepam*¹⁰⁵
- *Morphin*¹⁰⁶

Die fetalen Atembewegungen steigen nach einer mütterlichen Mahlzeit und nach Infusion von Glukose. Ein Anstieg von CO₂ steigert die Atembewegungen bei Mensch und Tier und der gegenteilige Effekt zeigt sich bei *Hypokapnie*¹⁰⁷ [72]. Dies führt zu der Annahme, dass die zentralen fetalen Chemorezeptoren bereits während des fetalen Lebens aktiv sein könnten. In ähnlicher Weise unterdrückt *Hypoxie* die motorischen fetalen Bewegungen, besonders die Extremitätenbewegungen, die zufälligen Augenbewegungen, das Schlucken und das fetale Atmen. Im Gegensatz dazu, hat *Hyperoxie* nur minimale Effekte auf die fetale Atmung [72].

Das *Prostaglandin E2* steigt während der mütterlichen Wehen an und übt einen steigernden Effekt auf die fetalen Atembewegungen aus. Bei Fortschreiten der Wehen zeigte sich eine Abnahme der fetalen Atembewegungen, obwohl Ash *et al.* (siehe oben) in ihren Untersuchungen eine gesteigerte Atemaktivität beobachtet haben [69,72,73].

Das mütterliche Rauchen reduziert die fetalen Atembewegungen durch verschiedene Mechanismen, wie Hypoxie und Reduktion des uterinen Blutflusses. Die Bedeutung der Atembewegungen liegt in der Ausbildung eines adäquaten Lungenvolumens [74]. Während der *Apnoe-Phasen*¹⁰⁸ verhindert der relativ hohe Widerstand der oberen Luftwege den *Efflux*¹⁰⁹ von Lungenflüssigkeit, was zu einem Druckanstieg innerhalb der Lungen führt. Während der fetalen Atembewegungen relaxieren die oberen Atemwege und die Kontraktionen des Zwerchfells unterhalten die Expansion der Lungen. Eine Ablation des Zwerchfellnervs, wie von Miller *et al.* beschrieben, führte demnach zu einer Abnahme des Volumens der Lungenflüssigkeit [75].

Die Dehnungen des Lungengewebes und die rhythmischen Kontraktionen des Zwerchfells während der fetalen Atembewegungen leisten einen wichtigen Beitrag zum Lungenwachstum, was der Nachweis einer Freisetzung von mitogenen¹¹⁰ Wachstumsfaktoren während der rhythmischen Phasen der Dehnung bestätigte [76].

Viele Forscher versuchten, die Atembewegungen des Fetus zu untersuchen und erhofften sich so, Feten einer Hochrisiko-Gruppe, wie jene mit einer Hypoxie, frühzeitig erkennen zu können. Besinger *et al.* beobachteten fetale Atembewegungen bei 50 Schwangerschaften zwischen der 26. und 34. SSW und fanden dabei heraus, dass, wenn die Atembewegungen während einer Beobachtungsperiode von 20 Minuten ausblieben, bei 16 von 17 beobachteten Frauen die Wehen auftraten. In 29 der verbleibenden 33 Schwangerschaften, in welchen fetale Atembewegungen beobachtet wurden, traten die

¹⁰⁵ *Diazepam* ist ein Arzneistoff aus der Gruppe der *Benzodiazepine* mit relativ langer Halbwertszeit. Er wird insbesondere als Psychopharmakon zur Behandlung von Angstzuständen, in der Therapie epileptischer Anfälle und als Schlafmittel angewendet (12).

¹⁰⁶ Derivat des *Morphiums*

¹⁰⁷ Verringerung des CO₂-Partialdruckes im Blut (1)

¹⁰⁸ Phasen des Atemstillstandes

¹⁰⁹ Ausfluss

¹¹⁰ Mitose-(Zellteilungs-)fördernde Wachstumsfaktoren (1)

Wehen, während einer Periode von mindestens 48 Stunden nach der Observation, nicht auf [77].

Die fetalen Atembewegungen wurden auch analysiert, um damit die Entwicklung einer *pulmonale Hypoplasie* bei schwangeren Frauen mit *Oligohydramnion* vorherzusagen. Blott *et al.* berichteten von einem letalen Outcome in fünf von 20 Schwangerschaften, die durch das Auftreten eines Oligohydramnions verkompliziert wurden, wenn die fetalen Atembewegungen ausfielen [78]. Nachdem die fetalen Atembewegungen episodisch auftreten, ist eine solche Methode der Erkennung und der Analyse der Atembewegungen nur dann akkurat, wenn sie während einer prolongierter Perioden durchgeführt wird [78].

1.4.1. Die Rolle der fetale Lungenflüssigkeit

Der Erhalt der Lungenflüssigkeit in der fetalen Lunge ist für ihre Entwicklung und ihr Wachstum von großer Bedeutung.

Die fetalen Atembewegungen, in Kombination mit dem Widerstand der oberen Luftwege, scheinen für die Beibehaltung der Menge an Lungenflüssigkeit verantwortlich zu sein [79]. Dies wurde anhand einer Serie von Experimenten von Moessinger *et al.* [80] elegant am Schafsmodell demonstriert. Wenn ein Lungenlappen von fetalen Schafen operativ ligiert¹¹¹ wurde, was in diesem Lappen zum Anstieg der Menge an Lungenflüssigkeit führte, und der andere Lappen frei drainierte¹¹², zeigte sich der drainierte Lappen *hypoplastisch*, während der ligierte Lappen eine *Hyperplasie* entwickelte. In gleicher Weise war auch zu beobachten, dass eine Abnahme des Druckes innerhalb der fetalen Lunge (ohne Verlust von Lungenflüssigkeit) zu einer Fehlentwicklung der Lunge führte [81]. Die Lungenflüssigkeit wird von den Epithelzellen, speziell in den distalen Luftwegen, produziert und fließt durch die oberen Luftwege, wo sie entweder verschluckt, oder in den amniotischen Raum freigesetzt wird. Die Flüssigkeit ist reich an Chlorid und arm an Bikarbonat und Proteinen. Die Balance zwischen Produktion und Drainage der Lungenflüssigkeit macht den wichtigsten Aspekt der normalen Lungenentwicklung aus [82].

Die Rate der Flüssigkeitsproduktion steigerte sich an fetalen Schafen von annähernd 5 ml/kg in der mittleren Schwangerschaftsperiode, auf bis zu 20 ml/kg zum Geburtszeitpunkt mit stündlichen Raten, die von 2 ml/kg/h auf 5 ml/kg/h anstiegen [82]. Chlorid wird in den luminalen Raum über die apikale Oberfläche des Lungenepithels gemeinsam mit Natrium ausgeschleust und Natrium wird in weiterer Folge im Gegenzug gegen Kalium reabsorbiert. Wenn der Fetus die Reife erreicht, sinkt die Rate der Flüssigkeitsproduktion [83].

Von Olver und Kollegen wurde angenommen, dass das *RDS des Neugeborenen* nicht nur durch ein Defizit an Surfactant, sondern auch durch eine inadäquate *Flüssigkeitsclearance*¹¹³ der Lunge verursacht werden könnte [84]. *Beta-Agonisten* stimulieren die Natrium-Aufnahme durch die Epithelzellen mit nachfolgender Reabsorption von Wasser aus dem extrazellulären Raum und führen damit zu einer Abnahme der Menge der fetalen Lungenflüssigkeit [84]. Auch *Vasopressin* reduziert die Produktion der Lungenflüssigkeit. Zum Geburtszeitpunkt können somit Beta-Agonisten und Vasopressin eine synergistische Wirkung ausüben und die Lungenflüssigkeit des Fetus verringern, so dass eine bessere Adaption an die postnatale Umgebung möglich wird [85].

¹¹¹ operativ unterbunden

¹¹² abfließen

¹¹³ Flüssigkeitsverringern, Flüssigkeitsresorption

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Andere Faktoren wie *Prostaglandin E2*, *Aldosteron*¹¹⁴ und *atriales natriuretisches Hormon*, können alle zu einer Verringerung der Menge der fetalen Lungenflüssigkeit in der späten Schwangerschaft beitragen [85].

1.4.2. Die Bedeutung der Flüssigkeitsbalance und der Thoraxwand für das Lungenwachstum

Es überrascht nicht, dass jede Ursache, die die Balance zwischen der Produktion und der Drainage der Lungenflüssigkeit ändert, die Entwicklung der fetalen Lunge beeinflussen kann.

Die Produktion der Lungenflüssigkeit scheint allerdings von den fetalen Atembewegungen unabhängig zu sein, wie sich anhand von Experimenten mit einer Durchtrennung des Zwerchfellnervs zeigte. Es ist demnach hauptsächlich die Drainage der Lungenflüssigkeit, die das Lungenwachstum beeinflusst. Ein Oligohydramnion tritt bei spontaner Ruptur der Membranen oder in Assoziation mit uterinen Infektionen auf. Wenn keine adäquate extrathorakale Flüssigkeitsmenge aufrechterhalten werden kann, verschlechtert sich die Lungenentwicklung und es resultiert eine Hypoplasie.

In ähnlicher Weise führt das *Potter-Syndrom*, bei welchem eine Agenesie der Nieren auftritt, zu einem Mangel an Amnionflüssigkeit und zu hypoplastischen Lungen. Anomalitäten der Thoraxwand oder Erkrankungen der Muskulatur können ebenso das Wachstum und die Entwicklung der Lunge beeinflussen. Erstere führen zu einer Verringerung des Raumes für das Lungenwachstum, letztere verursachen über eine Reduktion der Atembewegungen eine verringerte Lungenentwicklung. Alle Ursachen, die zu einer Verringerung des intrathorakalen Raumes führen, beeinflussen auch die Lungenentwicklung und eine der wichtigsten Ursachen ist die angeborene *Zwerchfellhernie*¹¹⁵. Bei dieser zeigt sich auch eine anormale Entwicklung der Verzweigung der Luftwege und der Alveolen [67].

1.4.3. Frühgeburt

Der offensichtlich wichtigste Faktor, der das Wachstum der Lunge beeinflusst, ist eine zu frühe Geburt. Eine reduzierte und gestörte Alveolarisierung wurde an Kindern beobachtet, die eine chronische Lungenerkrankung bei Frühgeburt entwickelten [86]. Eine schlechte Alveolarisierung könnte nach Hislop *et al.* auch durch andere, postnatale Einflüsse, wie mechanische Ventilation, Sauerstofftherapie, persistierenden *Ductus arteriosus botalli*¹¹⁶ und Infektionen bedingt sein, oder ihren Ursprung vor der Geburt nehmen [87].

Coalson *et al.* [88] demonstrierten am Pavian-Modell, dass *Hyperoxie* und *Barotrauma* zur Lungenschädigung mit Defiziten bezüglich der Alveolarisierung führten. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in vielen Tiermodellen, in welchen die Auswirkungen von mechanischer Beatmung und Hyperoxie untersucht wurden. Die chronische Lungenerkrankung bei Frühgeborenen bleibt, trotz der Verbesserungen der Therapie und des Einsatzes neuer Technologien, eine Hauptursache für Morbidität und Mortalität [88].

Die Aufmerksamkeit wird zusehends auf die Rolle der vorgeburtlichen Faktoren gelenkt. Romero *et al.* berichteten über einen Zusammenhang zwischen *proinflammatorischen Zytokinen*¹¹⁷ im Uterus und der Entwicklung der chronischen Lungenerkrankung des

¹¹⁴ *Aldosteron* ist ein zu den Mineralocorticoiden zählendes Hormon der Nebennierenrinde, das einen wesentlichen Einfluss auf die Regulation des Na⁺-, K⁺- und Wasserhaushaltes ausübt (1).

¹¹⁵ *Congenital Diaphragmatic Hernia (CDH)*

¹¹⁶ Verbindung (*Shunt*) zwischen Lungen und Körperkreislauf (1)

¹¹⁷ Entzündungsmediatoren

Frühgeborenen. Ein wichtiger Triggerfaktor ist dabei eine intrauterine Infektion, wie z. B. durch *Ureaplasma urealyticum*. Es bestehen offenbar Anzeichen, dass eine *Chorioamnionitis*¹¹⁸ den Fetus für die Entstehung einer Lungenerkrankung und eines gestörten Lungenwachstums prädisponieren könnte [89,90].

Die Kaskade, die zu einer Abnahme und Störung der Alveolarisierung führt, könnte durch einen Vorfall, wie eine *antenatale Infektion*¹¹⁹, in Gang kommen und zu einer Antwort im Sinne einer Entzündung in der kindlichen Lunge führen. Die dabei involvierten Wachstumsfaktoren sind auch für die normale Lungenentwicklung wichtig. Allerdings kommt es im Zuge der Entzündung zu einer Überexpression dieser Faktoren, die dann vermutlich ihre Wirkung auf das Lungenwachstum ausüben [7].

1.5. Wachstum des Gefäßbaumes

Die Zirkulation in der Lunge unterliegt bei der Geburt tiefgreifenden Veränderungen. Ein Versagen der Adaptionsmechanismen führt zur *pulmonalen Hypertension*¹²⁰ des Neugeborenen. Die Grundlage dafür könnte ein anormales Lungenwachstum im Uterus, oder ein Versagen der Mechanismen der *Vasodilatation*¹²¹ in der Neugeborenen-Periode bilden [91].

Während des fetalen Lebens strömen etwa acht bis zehn Prozent des gesamten *Blut-Outputs*¹²² des Herzens durch die pulmonale Zirkulation (siehe **Abbildung 2**). Die Oxygenierung des Blutes wird durch die Plazenta bewerkstelligt und das Blut wird von der fetalen Lunge weggelenkt. Dies wird durch den hohen Widerstand der fetalen Zirkulation in der Lunge erreicht. Unmittelbar nach der Geburt setzt beim Neugeborenen die Atmung ein und dadurch fällt der Widerstand in den fetalen Lungenarterien ab und ermöglicht damit einen acht- bis zehnfach höheren Blutfluss durch die Lunge. Ein Versagen oder eine Störung dieses Druckabfalls führt zu einem Aufrechterhalten des hohen Druckes in den Lungengefäßen und damit zu einem Versagen der postnatalen Adaption. Die Mechanismen, die in ein solches Versagen involviert sind, sind noch nicht vollständig bekannt. Aber es existieren einige Annahmen, die sich auf eine gestörte Entwicklung der Blutgefäße *in utero* beziehen [91].

¹¹⁸ Entzündung des *Amnions* und *Chorions* (Entzündung der Eihäute) (1)

¹¹⁹ vorgeburtliche Infektion

¹²⁰ Lungenhochdruck

¹²¹ Erweiterung der Gefäße

¹²² Blut-Auswurf-Volumen

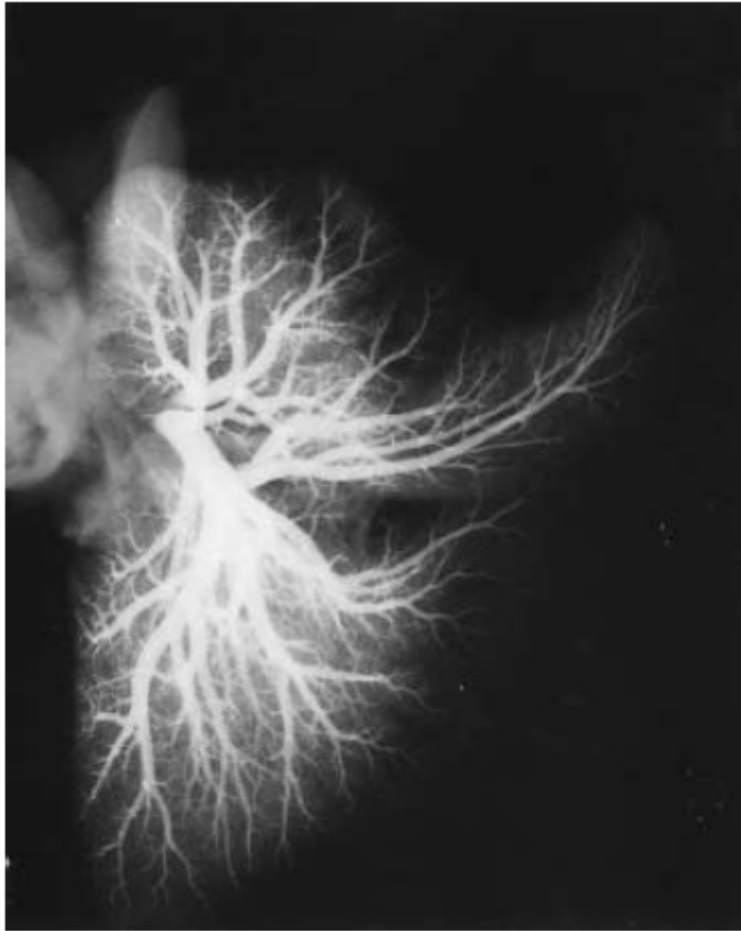


Abbildung 2:

Post mortem Arteriogramm eines Fetus in der 39. SSW (nach arterieller Injektion von Bariumsulfat).
Quelle: Hislop *et al.* [91]

1.5.1. Verzweigungsmuster der Arterien und Venen der Lunge

Die primäre Funktion der Lunge ist der Gasaustausch und dieser wird durch die Lungengefäße, die innerhalb der Alveolen eine große Oberfläche bilden, ermöglicht.

Der Blutfluss muss hierzu ausreichend sein und der Lineargeschwindigkeit des Gegenstroms entsprechen, um den ausreichenden Gasaustausch zu ermöglichen. Die Blutgefäße kontrollieren auch die Produktion, den Transport und die Konzentration vasoaktiver Mediatoren. Während der Entwicklung entsteht ein kompliziertes Verzweigungsmuster der Blutgefäße aus einer einzelnen, avaskulären Knospe. Die Gefäße werden dann, im Zuge der weiteren Entwicklung, an das linke *Atrium*¹²³ und den rechte *Ventrikel*¹²⁴ des Herzens angeschlossen [91].

In der adulten Lunge finden sich ein Verlauf und eine Verzweigung der Arterien entlang der Luftwege, was darauf hindeutet, dass ihr Wachstum durch die Luftwege reguliert werden könnte [91].

Neben diesen konventionellen Arterien längs der Zweige der Luftwege, existieren zusätzliche, kleinere, *supernumeräre*¹²⁵ Arterien, die in zwei- bis dreifach höherer Anzahl vorkommen und die alveoläre Region direkt versorgen. Diese können bis zu 40% des

¹²³ Vorhof

¹²⁴ Kammer

¹²⁵ „überzählige“

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

gesamten Blutflusses aufnehmen und ihre Anzahl nimmt in der Peripherie der Lunge zu. Die Venen der Lunge weisen die gleiche Anzahl von konventionellen und supernumerären Ästen auf, aber sie verlaufen unabhängig von den Luftwegen zwischen den Azini und den Segmenten der Lunge [91].

Frühe Studien der Lungenentwicklung brachten hervor, dass die Arterien und Venen der Lunge zur gleichen Zeit wie die Luftwege wachsen, so dass damit alle *präazinären*¹²⁶ Gefäße in der 17. Schwangerschaftswoche, am Ende der *pseudoglandulären Phase*, ausgebildet sind [92]. Die supernumerären Arterien und Venen, die mit den Alveolen assoziiert sind, sind in diesem Stadium noch nicht entwickelt, wachsen aber auch in dieser Periode. Dies deutet auf einen genetischen Einfluss bei der Entwicklung der Blutgefäße hin. Das Wachstumsmuster ist unter Zwillingen ähnlicher, als jenes zwischen andere Individuen der übrigen Bevölkerung, was ebenfalls auf einen genetischen Einfluss hindeutet. In der *kanalikulären Phase* (17.-27. SSW) begleitet das weitere *Branching*¹²⁷ der Arterien und Venen die Entwicklung der Atemwege [91].

Zu dieser Zeit kommen die Kapillaren innerhalb des Mesenchyms, unterhalb des Epithels, zu liegen, das sich zu *Typ I-* und *Typ II-Pneumozyten*¹²⁸ differenziert. Dies lässt eine *Blut-Luft-Barriere* entstehen, die bezüglich ihrer Dicke, jener der in der adulten Lunge gemessenen gleicht [91].

Menschliche Studien von Hall *et al.* brachten hervor, dass die Blutgefäße der Lunge viel eher initial durch die Entstehung von „*de novo*“ *endothelialen Tubuli*¹²⁹ innerhalb des Mesenchyms um die peripheren Luftwege gebildet werden (*Vasculogenese*), als durch einwärts gerichtetes Wachstum bereits bestehender Arterien (*Angiogenese*) [93]. *Präkursorzellen*¹³⁰ des Endothels aus glatter Muskulatur wurden, ohne ein Vorkommen eines Lumens, im *splanchnischen Mesenchym* des Vorderdarms und der Lungenknospe in der vierten SSW nachgewiesen [91].

Die endothelialen Tubuli werden geformt, verschmelzen und eine erste Zirkulation zwischen dem rechten Ventrikel und dem linken Atrium des Herzens kann um die fünfte SSW vorgefunden werden, wenn die Lunge nur eine Generation an Luftwegen aufweist.

Wenn sich die Luftwege in Richtung der Peripherie teilen, bilden sich die intrapulmonalen Arterien durch kontinuierliches Verschmelzen der endothelialen Tubuli längs der Luftwege aus. Im Gegensatz dazu bilden sich die Venen unabhängig aus dem gleichen Mesenchym und verlaufen dann zwischen den Luftwegen [91].

Wenn sich die Alveolen im späten fetalen Leben (nach der 30. SSW) und nach der Geburt bilden, kommt es zu einem raschen Anstieg der Anzahl der prä- und postkapillären Gefäße. Im Alter von zwei Jahren wächst die Lunge durch Zunahme der Oberfläche der Alveolen und das Areal des Gefäßbettes steigt neben diesem Wachstum ebenfalls an.

Zwischen der Geburt und dem Erreichen des Erwachsenenalters, nimmt die Oberfläche der Lunge um das etwa 20-Fache und das Volumen der Kapillaren um das 35-Fache zu und damit wird ein effizienterer Gasaustausch ermöglicht. Bei der Geburt zeigt sich in der Lunge ein gleiches Muster der Arterien und Venen, wie in der adulten Lunge. Die Blutgefäße nehmen mit zunehmendem Alter und steigendem Lungenvolumen an Größe zu und die Anzahl und das Volumen der Gefäße in der Peripherie steigen ebenfalls an [91].

Stadien des normalen Wachstums der Lungengefäße [91]:

¹²⁶ vor dem Azinus liegend

¹²⁷ die Verzweigung

¹²⁸ Alveolarepithelzellen, Lungenepithelzellen

¹²⁹ schlauchartiger Gefäßstrukturen

¹³⁰ Vorläuferzellen

- 4.–16. SSW: Arterien und Venen entwickeln sich durch *Vasculogenese* aus dem Mesenchym, das die Knospen der Luftwege umgibt
- 17. SSW: die präazinären Arterien und Venen sind komplett angelegt
- 24. SSW: die *Blut-Luft-Barriere* ist etabliert
- Spätes fetales Leben bis zweites Lebensjahr: die intraazinären Arterien und Venen entwickeln sich mit den Alveolen
- Mit dem Lungenwachstum nimmt auch die Größe der Arterien und Venen zu
- Hohe Dicke der Arterienwand im fetalen Leben
- Nach der Geburt: rasche Dilatation der pulmonalen Arterien und Ausdünnung der Wände
- Allmählicher Ausbau der Muskulatur während der Kindheit
- Innervation der glatten Muskelzellen der pulmonalen Arterien

1.5.2. Struktur der Wand der pulmonalen Arterien

Glatte Muskelzellen werden sehr bald in der Umgebung der neu gebildeten Arterien gefunden, nachdem sie sich längs der Luftwege angesiedelt haben. Die Muskelzellen scheinen den bronchialen glatten Muskelzellen der angrenzenden Luftwege zu entstammen. Mit zunehmender Größe der Arterien werden weitere, mutmaßliche Muskelzellen aus dem Mesenchym rekrutiert und steigern die Dicke der muskulären Wand. Auch *elastische Laminae*¹³¹ und Kollagen werden zwischen den *Layern*¹³² der Muskelzellen abgelagert [93].

Um die Mitte des fetalen Lebens ist die Struktur der Lungenarterien gleich, wie auch in der adulten Lunge [92]. Der *proximale Anteil* des pulmonalarteriellen Gefäßbettes zeigt Gefäße mit elastischen Strukturen und hier treten mehr als sieben Lagen von glatten Muskelzellen auf, die durch Kollagen gegeneinander abgegrenzt werden. Das Elastin verleiht dem Gefäß die Dehnbarkeit, während das Kollagen für die Widerstandskraft und Rigidität¹³³ verantwortlich ist [91].

Unterhalb dieser proximalen Hälfte des Gefäßbettes zeigt sich eine zunehmende Reduktion der Zahl der Layer der Muskulatur und so ist in den peripheren Arterien nur mehr eine Lage von Muskelzellen zwischen den elastischen Laminae zu finden. Im Gegensatz dazu, sind die Venen nur dünnwandig und weisen nur zwei bis drei Lagen von Muskulatur auf und das gilt auch für den Bereich des Hilus. Sowohl die Arterien, als auch die Venen, werden durch eine dicke *Adventitia*¹³⁴ aus Kollagen umgeben.

Während des fetalen Lebens ist der Widerstand der Lungengefäße hoch und das ist mit einem relativ kleinen Gefäßlumen und einer dicken Muskelwand der Arterien assoziiert. Nach der Geburt kommt es zu einer Abnahme der Wanddicke. Dieser Vorgang vollzieht sich in den kleinen Arterien sehr schnell, in größeren Arterien dauert er allerdings mehrere Monate. Es kommt dabei offenbar anfänglich zu einer Zunahme der Größe der Arterien, ohne dass dies die Größe der Muskelzellen betrifft. Danach, wenn die Blutgefäße an Größe zunehmen, erfolgt auch eine begleitende Größenzunahme der glatten Muskelzellen und des Bindegewebes, um damit den entsprechenden Anteils-Prozentsatz der Wanddicke zu erreichen [91].

¹³¹ Schichten

¹³² Lagen

¹³³ Steifigkeit

¹³⁴ äußere Gefäßschicht

Während der frühen Kindheit sind die peripheren Lungenarterien relativ muskelarm und mit der Zeit zeigt sich eine, mit zunehmendem Wachstum der Arterien fortschreitende, Ausdehnung der Muskulatur in Richtung der Peripherie. Die Arterien werden früh, etwa zur gleichen Zeit wie die Luftwege, innerviert. Diese Nervenversorgung erweitert sich in Richtung der Peripherie längs der glatten Muskelzellen. Bei den Venen zeigt sich nach der Geburt keine schnelle Strukturveränderung, aber die Muskulatur nimmt auch hier in der Wand durch Größenzunahme zu [92,94].

1.5.3. Faktoren, die das arterielle Wachstum kontrollieren

Die Entwicklung des Gefäßbaumes der pulmonalen Arterien hängt von den Interaktionen zwischen verschiedenen Zelltypen und dem Bindegewebe innerhalb des *Endoderms*¹³⁵ der Luftwege und der *mesenchymalen Matrix* ab. Die Komponenten der extrazellulären Matrix induzieren die Differenzierung des Endothels¹³⁶. Hier spielen *Fibronektin*, *Laminin* und die Kollagene IV und V eine frühe Rolle bei der Bildung der endothelialen Tubuli.

Diese werden durch *Zelladhäsions-Moleküle*, wie E-Selektin und das PECAM-1¹³⁷, aufrechterhalten.

Mit Antikörpern gegen diese Faktoren lässt sich in Kulturen die Bildung der endothelialen Tubuli verhindern [91,95].

Die Bildung der kapillären Tubuli um die Lungenknospen deutet darauf hin, dass Wachstumsfaktoren von den Luftwegen produziert werden, die die Vasculogenese steuern. Zum Beispiel findet sich der VEGF¹³⁸ im bronchialen Epithel und seine Rezeptoren befinden sich auf den Endothelzellen der sich entwickelnden menschlichen Lunge. Ein anderer Wachstumsfaktor, der FGF¹³⁹, induziert die Bildung der Endothel-Tubuli in mesenchymalen Zellen von Vögeln, während andere Wachstumsfaktoren dies nicht bewerkstelligen. Fgf lässt sich im Epithel und Mesenchym von Mäusen nachweisen, aber der Rezeptor findet sich nur im Mesenchym [91].

Nach der Bildung der Tubuli sind verschiedene Signale in die Bildung der muskulären Wand involviert. Ein diesbezügliches Modell wurde von Folkman und D'Amore [96] etabliert.

Sie beschrieben, dass undifferenzierte Mesenchymzellen an TIE2-Rezeptoren der Endothelzellen gebundenes *Angiopoietin*¹⁴⁰ produzierten (siehe unten). Dies führte in der Folge zur Freisetzung von Signalen, wie dem PDGF¹⁴¹, oder dem HB-EGF¹⁴², die auf die mesenchymalen Zellen anziehend wirken [91]. Längs der Endothelzellen tragen sie zur Bildung der glatten Muskelzellen bei. Durch die Ansammlung von kontraktilen und zytoskelettalen Anteilen, differenzieren sie dann zu einem reiferen Zelltyp. Die großen pulmonalen Arterien weisen Anteile an Kollagen und Elastin auf, die durch die glatten Muskelzellen produziert werden und über die Hälfte der Wanddicke dieser Arterien ausmachen. Der größte Anteil dieses Elastins wird während des fetalen Lebens angelegt, während der Anteil an Kollagen, das für die Rigidität der Gefäße verantwortlich ist (hauptsächlich Kollagen Typ I), nach der Geburt zunimmt [97].

¹³⁵ Ursprungsgewebe der Luftwege

¹³⁶ innerste Gewebeschicht der Gefäße

¹³⁷ *Platelet endothelial cell adhesion molecule-1*

¹³⁸ *Vascular endothelial growth factor*

¹³⁹ *Fibroblast growth factor*

¹⁴⁰ Die Wandausbildung der Gefäße wird u. a. durch *Angiopoietin-1* reguliert (1).

¹⁴¹ *Platelet-derived growth factor*

¹⁴² *Heparin binding epidermal growth factor*

1.5.4. Mechanismen, die in die Adaption nach der Geburt involviert sind

Während des fetalen Lebens sind die pulmonalen Arterien sehr dickwandig und tragen damit den größten Teil zur Entstehung des hohen pulmonalen Gefäßwiderstandes bei. Bedingt durch die Dicke dieser Wand, weisen die glatten Muskelzellen keine so reife kontraktile Struktur, wie die glatten Muskelzellen der Bronchien auf. Um diese Zellen ist auch nur wenig Bindegewebe vorhanden [91].

Unmittelbar nach der Geburt kommt es zur Zunahme des Blutflusses und zu einer Abnahme der Wanddicke. Bei den kleinen muskulären Arterien wird dies durch das *Realignment*¹⁴³ und die Ausdünnung der Endothelzellen und glatten Muskelzellen der Gefäßwand, innerhalb von wenigen Stunden, vollzogen. Dieser Prozess wird durch den geringen Anteil an Bindegewebe und den relativ synthetischen Phänotyp der Muskelzellen unterstützt. Während dieser Periode der Adaption zeigt sich kein Nettoverlust an Muskelzellen [94].

Studien zur Untersuchung dieser Ausdünnung der Gefäßwände wurden vorwiegend *in vitro* und *in vivo* an Schweinen und Schafen durchgeführt. Die Veränderungen der Wandstruktur, die gleich nach der Geburt auftreten, beinhalten das Remodeling des Zytoskeletts des *Aktins*¹⁴⁴. Es kommt zu einer abrupten, wenn auch transienten, Reduktion der Anzahl der *kontraktilen Myofilamente* aufgrund eines Umbaus der *Aktinfilamente* zu ihrer monomeren Form. Bei Ferkeln im Alter von zwei bis drei Wochen war diese Reduktion dann wieder aufgehoben. Der Gefäßwiderstand innerhalb der Lunge fällt mit Beginn der Ventilation stark ab. Experimentelle Studien zeigten, dass der Abfall des Lungengefäßwiderstandes sowohl für die Atmung von Stickstoff, als auch von Sauerstoff gilt, allerdings bestand auf Sauerstoff ein stärkeres Ansprechen.

Die Endothelzellen spielen bei der Modulation des *Gefäßtonus* in der systemischen und pulmonalen Zirkulation während des ganzen Lebens eine entscheidende Rolle. Sie nehmen auch an Modulationen bezüglich des Wachstums und der strukturellen Veränderungen teil und sind bei der Adaption an das extrauterine Leben von großer Bedeutung. Der plötzliche Anstieg des Blutflusses nach der Geburt ruft an den Endothelzellen der Gefäße einen, durch Scherkräfte bedingten Stress hervor, und dieser stimuliert die Freisetzung von Vasodilatoren¹⁴⁵, wie *NO*¹⁴⁶ und *Prostacyclin*¹⁴⁷. Aber auch die Bildung von *Endothelin*¹⁴⁸, eines potenten *Vasokonstriktors*, wird dadurch angeregt [91,94,97,98].

1.5.5. Der Einfluss von Stickstoffmonoxid

Die Stimulation der endothelialen Zellen durch Sauerstoff (O₂), Scherkräfte, *Bradykinin*¹⁴⁹ oder *Acetylcholin*¹⁵⁰ führt zur Produktion von *NO*¹⁵¹. NO wird bei der Umwandlung von *L-Arginin* in *Citrullin* durch das Enzym *NO-Synthase*¹⁵² produziert. Mehrere *Co-Faktoren*, wie Kalzium u. a., werden hierbei benötigt [91].

¹⁴³ die Neuausrichtung

¹⁴⁴ *Aktin* ermöglicht in Wechselwirkung mit Myosin die Muskelkontraktion (1).

¹⁴⁵ Gefäß-erweiternde Mediatoren

¹⁴⁶ *Stickstoffmonoxid*

¹⁴⁷ *Prostaglandin I₂ (PGI₂)* (1)

¹⁴⁸ *ET-I (Endothelin-I)*

¹⁴⁹ Das *Bradykinin* ist ein vasoaktives Peptid- und Gewebshormon der Kinin-Gruppe (1).

¹⁵⁰ Neurotransmitter

¹⁵¹ *Stickstoffmonoxid*

¹⁵² *NOS*

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Es existieren drei *Isoformen* der NOS, aber die vom Endothel produzierte NOS vom Typ III ist der wichtigste Typ für die pulmonale Zirkulation. Das vom Endothel gebildete NO (*eNO*) diffundiert aus den Endothelzellen in die darunterliegenden glatten Muskelzellen und führt, hervorgerufen durch die Aktivität der *Guanylat-Zyklase*, zur Produktion von *cGMP*¹⁵³, das eine *Vasodilatation* hervorruft. An fetalen Lämmern wurde am 70. Schwangerschaftstag (die Geburt erfolgt bei Schafen nach etwa 145 Tagen) eine höhere Konzentration des Proteins und der mRNA¹⁵⁴ des cGMP gemessen, als nach der Geburt [91,98].

In Lungen von Ferkeln zeigte sich ein Gehalt an eNOS, der bei Feten und Neugeborenen höher war, als bei erwachsenen Schweinen. Ein starker vorübergehender Anstieg trat bei diesen Ferkeln zwei bis drei Tage nach der Geburt auf.

Die pulmonalen Venen zeigen einen höheren Gehalt an eNOS, als die pulmonalen Arterien. Auch eine starke basale NO-Freisetzung innerhalb der Venen von Ferkeln und Lämmern, die größer war, als jene in den Arterien, wurde beschrieben [91,99].

Wenn bei Lämmern vor dem Geburtstermin die NOS-Aktivität experimentell blockiert wurde, war der postnatale Abfall des pulmonal-vaskulären Gefäßwiderstandes *attenuiert*¹⁵⁵. Die Tatsache, dass die NOS-Aktivität im mittleren Stadium der Schwangerschaft höher war, als bei Neugeborenen oder Erwachsenen, könnte auf die Wichtigkeit dieses Enzyms, in Bezug auf das Lungenwachstum und die Entwicklung des Endothels, hindeuten [91,98].

Die stimulierte Freisetzung von NO ist bezüglich des Alters, der untersuchten Spezies und dem Typ der Gefäße unterschiedlich. Sauerstoff führt bei menschlichen Endothelzellen zu einer Hochregulierung der *NOS*-Gene. Bei neugeborenen Ferkeln sprachen die pulmonalen Arterien, bis zum Erreichen eines Alters von drei Tagen, nicht auf die *Relaxation* durch *Acetylcholin* an, während die Venen schon darauf ansprachen. Dies könnte durch die Wirkung der NOS, oder der *muscarinen*¹⁵⁶ *Rezeptoren* bedingt worden sein [91].

Auch bei neugeborenen Lämmern zeigte sich ein abgeschwächtes Ansprechen auf Acetylcholin. In der Lungenperipherie von Ferkeln konnte die NOS-Aktivität bei Geburt stimuliert und damit erhöht sein, sie war aber eine Woche vor der Geburt im fetalen Lungengewebe nicht mehr nachweisbar. Dies suggerierte, den Berichten von MacAllister *et al.* folgend, das Vorkommen eines Inhibitors der NOS während des fetalen Lebens und dieser könnte möglicherweise *Dimethylarginin*¹⁵⁷ sein, dessen Gehalt bei *systemischer Hypertension*¹⁵⁸ und bei Kindern mit *Lungenhochdruck* gesteigert war [91,100].

Ein Mangel an NOS, wie er bei Mäusen mit der genetischen Nullmutation von *eNOS* vorkommt, führte, laut einer Studie von Fagan und Kollegen, zu keiner Hypertension auf Meeresspiegel-Niveau, aber bei Hypoxie (also in höheren geographischen Lagen) stieg die Vasokonstriktion an. Dies deutet darauf hin, dass NOS weniger für den basalen Tonus der Gefäße, als für die Vasokonstriktion wichtig sein könnte [91,101].

¹⁵³ *cyclisches Guanosinmonophosphat*

¹⁵⁴ *Messenger RNA*

¹⁵⁵ abgeschwächt, weniger stark ausgeprägt

¹⁵⁶ *Muskarinrezeptoren* sind membranständige Rezeptoren, die im parasympathischen Nervensystem vorkommen und als Substrat den Neurotransmitter *Acetylcholin (ACh)* binden (*Acetylcholinrezeptoren*), aber auch von *Muskarin* aktiviert werden können (13).

¹⁵⁷ *ADMA*

¹⁵⁸ systemischem Bluthochdruck

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Die an Lämmern durch den Verschluss des Ductus arteriosus *in utero* hervorgerufene Hypertension, führte zu einer Reduktion der Produktion und Aktivität der eNOS und reduzierte auch die Antwort der glatten Muskelzellen auf NO.

Gleiche Veränderungen ließen sich an hypertensiven neugeborenen Ferkeln machen [91].

1.5.6. Die Wirkung von Prostacyclin

Prostacyclin ist für seinen erweiternden Effekt auf das vaskuläre Bett des Fetus bekannt und seine Synthese wird in glatten Muskelzellen und Endothelzellen während des fetalen Lebens gesteigert [97]. Eine gesteigerte *Sauerstoff-Spannung*¹⁵⁹ in den Arterien von fetalen Lämmern steigerte auch die *Prostacyclin-Produktion*, aber in intakten Lungen führte dies zu keiner Zunahme der entsprechenden Plasmalevels [97].

Laut Untersuchungsberichten sank die Produktion von Prostacyclin bei Lämmern nach der Geburt innerhalb von wenigen Stunden, aber Hypoxie steigerte seine Produktion und auch die Genexpression. Das Prostacyclin ruft seinen relaxierenden Effekt über die *Adenylat-Cyclase* hervor, ein Enzym, dessen Gehalt mit Annäherung an den Geburtstermin abnimmt. Deshalb könnte die Prostacyclin-Wirkung in vorgeburtlichen Stadien der Lungenentwicklung eine wichtige Rolle spielen [91].

1.5.7. Der Einfluss von Endothelin

Endothelin ist ein vasoaktiver Faktor und auch ein Wachstumsfaktor, der vom Endothel produziert wird [91]. Experimentelle Studien zeigten einen vasokonstriktorisches Effekt auf Arterien und Venen fetaler Lämmer und Endothelin führte hier auch zu einem Anstieg des Druckes in den Lungenarterien bei neugeborenen Lämmern [97,98]. Der Plasmaspiegel von ET-I ist bei Neugeborenen und hypertensiven Kindern hoch, aber nimmt offenbar mit dem Anstieg des Druckes der Lungenarterien ab [91]. Untersuchungen an gesunden Ferkeln ergaben, dass die Endothelin-Levels zum Zeitpunkt der Geburt hoch waren, aber ab dem Alter von drei Tagen abfielen. Bei jenen Ferkeln, die nach der Geburt eine Hypertension aufrechterhielten, war dieser Abfall geringer ausgeprägt [97].

ET-I wirkt über zwei Rezeptoren: den *ET_A*- und den *ET_B*-Rezeptor.

Der *ET_A*-Rezeptor findet sich auf glatten Muskelzellen und seine Stimulation führt zur Vasokonstriktion. *ET_B*-Rezeptoren finden sich einerseits auf den gleichen Zellen und ihre Stimulation führt ebenfalls zur Vasokonstriktion, aber andererseits finden sie sich auch auf Endothelzellen, wo sie die Freisetzung von NO oder Prostacyclin hervorrufen und somit zur Vasodilatation führen. Eine Studie, die von Noguchi und Mitarbeitern an Ferkeln vorgenommen wurde, brachte hervor, dass der *ET_B*-Rezeptor auf dem Endothel ein bis drei Tage nach der Geburt nachweisbar war, aber bei hypertensiven Ferkeln fehlte. Die Menge an kontraktilen Rezeptor *ET_A* war bei hypertensiven Ferkeln gesteigert. Auch der Gehalt an Endothelin war bei Versagen des vasodilatativen Effekts von ET-I bei hypertensiven Schafen erhöht.

Bei solchen Schafen schwächte die Anwendung eines *ET_A-Blockers* die strukturellen Veränderungen der pulmonalen Arterien ab und steigerte die Vasodilatation bei der Geburt.

Somit könnten, laut Ansicht der Autoren, *ET_A*-Antagonisten eine therapeutische Rolle bei der Behandlung von Kindern mit hypertensiven Lungenerkrankungen spielen [91,102].

¹⁵⁹ Sauerstoff-Gehalt

1.5.8. Anormale Lungenzirkulation

Störungen der pulmonalen Zirkulation können die Folge einer abnormen Entwicklung des Gefäßbaumes *in utero*, eines abnormen Musters des Branchings oder einer abnormen Struktur der Gefäßwand sein. Sie können auch durch ein Versagen der postnatalen Adaption, angeborene Herzfehler oder eine Frühgeburt hervorgerufen werden (siehe **Tabelle 2**). In den meisten Fällen zeigt sich die Pathologie in Form einer Zunahme der glatten Muskulatur innerhalb der Wand der kleinen pulmonalen Arterien [91].

Tabelle 2: Pulmonaler Hochdruck in der Kindheit.
Quelle: Hislop *et al.* [91]

Primär	Sekundär	PPHN ¹⁶⁰
	Hypoxie	Aspiration von Mekonium
Hypoplastische Lunge (z. B. in Folge einer CDH)	Frühgeburt, <i>BPD</i> ¹⁶¹	Sepsis
Primärer Lungenhochdruck	Angeborene Herzfehler	Hypoxie, unbekannte Faktoren

1.5.9. Die hypoplastische Lunge

Die Entwicklung der Arterien der Lunge scheint durch die Luftwege beeinflusst zu werden und demzufolge führt eine Reduktion des Branchings der Luftwege zu einer begleitenden Reduktion der Zahl der Arterien. In hypoplastischen Lungen kann der erhöhte Gefäßwiderstand die Folge einer abnormen hypoplastischen Entwicklung des vaskulären Baumes sein. Bei der *angeborenen Zwerchfellhernie*¹⁶², wo sich eine Reduktion der präaziniären Luftwege und Zweige der arteriellen Gefäße zeigt, fällt auch eine Reduktion der Anzahl der Alveolen und Arterien auf. In den meisten Fällen kommt, bei Auftreten einer CDH, auch eine pulmonale Hypertension vor, die durch die Reduktion des Gefäßbettes oder eine strukturelle Anomalität der Gefäße bedingt sein könnte.

Bei beide Lungen, sowohl jenen mit angeborener Hypoplasie, als auch jenen mit CDH, zeigt sich in den Arterien eine Zunahme der glatten Muskelzellen der Media¹⁶³ und des Bindegewebes in der Adventitia und beide Veränderungen ließen sich durch die Anwendung der *ECMO*¹⁶⁴ reduzieren.

Viele Fälle der CDH sind gegen eine Behandlung mit NO resistent und dies deutet auf eine fundamentale Anomalität der Struktur der Arterienwände hin. Bei der *renalen Agenesie* und *Dysplasie*¹⁶⁵, die mit einer Lungenhypoplasie assoziiert sind, zeigt sich eine Reduktion der Zweige der Luftwege und Arterien, aber keine Steigerung der Wanddicke der Arterien [91,103].

¹⁶⁰ *Persistierende Pulmonale Hypertension des Neugeborenen*

¹⁶¹ *Bronchopulmonale Dysplasie*

¹⁶² *CDH*

¹⁶³ mittlere Schicht der Gefäßwand (1)

¹⁶⁴ *extrakorporale Membranoxygenierung* (1)

¹⁶⁵ Fehlanlage bzw. Fehlentwicklung der Niere (1)

1.5.10. Primäre pulmonale Hypertension (PPH)

Die *primäre pulmonale Hypertension* ist eine seltene Erkrankung der Kindheit mit einer schlechten Prognose. Etwa sechs Prozent der Fälle treten familiär auf.

Nichols *et al.* konnten ein Gen auf *Chromosom 2q31-32* lokalisieren und dieses Gen zeigte offenbar bei machen familiären Fällen einer PPH eine genetische Antizipation [91,104].

1.5.11. Persistierende Pulmonale Hypertension des Neugeborenen (PPHN)

Die häufigste Ursache der pulmonalen Hypertension des Neugeborenen ist die PPHN, die durch ein Versagen der Adaption der pulmonalen Zirkulation charakterisiert ist. Es kommt dabei zu einem hohen Gefäßwiderstand und einer Labilität der Lungengefäße mit dem Auftreten eines *Rechts-Links-Shunts*¹⁶⁶ des Blutes und einer *Hypoxämie*¹⁶⁷. Die PPHN ist mit einer hohen Morbidität und Mortalität assoziiert. Sie kann auch *sekundär*, nach einer Aspiration von *Mekonium*¹⁶⁸, einer Sepsis oder einer Hypoxie, auftreten. Viele der Kinder mit einer PPHN, die auf eine Behandlung mit NO nicht ansprechen, weisen eine *idiopathische Lungenhypoplasie* mit dem Versagen der Entwicklung einer normalen alveolären Region auf.

Diese Kinder zeigen eine Reduktion der *eNOS*-mRNA- und cGMP-Levels, aber auch einen Mangel an Arginin, jedoch sind die Levels des vasokonstriktorischen ET-I häufig erhöht [91].

1.5.12. Die sekundäre pulmonale Hypertension

Die pulmonale Hypertension kann auch sekundär, aufgrund von kongenitalen Herzfehlern oder einer Hypoxie auftreten und wird bei Kindern mit chronischen Lungenerkrankungen nach Frühgeburt und künstlicher Beatmung beobachtet. Der klinische Verlauf hängt dabei von der jeweiligen Ursache ab [91].

1.5.13. Frühgeburt und pulmonale Zirkulation

Vorzeitig geborene Babies mit der Ausbildung von *hyalinen Membranen* in der Lunge, werden möglicherweise mit einer normalen pulmonalen Zirkulation geboren. Allerdings kommt es bei den Kindern, die im weiteren Verlauf eine chronische Lungenerkrankung ausbilden, aufgrund von Hypoxie, oder möglicherweise auch aufgrund einer Hyperoxie, verursacht durch künstliche Beatmung, zu einem Anstieg der arteriellen und venösen Anteile an glatter Muskulatur [91]. Die Kinder mit klinisch manifester pulmonaler Hypertension zeigten einen stärkeren Anstieg der glatten Muskulatur der Lungengefäße, als jene, die keine rechtsventrikuläre Hypertrophie aufwiesen [94].

Neugeborene, die während der *kanalikulären Phase* geboren werden (24. - 27. SSW), überleben, zeigen aber ein Versagen der normalen Entwicklung des Gefäßbettes innerhalb der alveolären Region. Die auftretenden Hypoplasien und Dysplasien können Langzeitfolgen haben. Über den Effekt der ante- oder postnatalen Anwendung von Glucocorticoiden auf die pulmonalen Arterien ist bisher noch zu wenig bekannt [91].

¹⁶⁶ Das venöse Blut wird nicht in der Lunge oxygeniert, sondern direkt in den Körperkreislauf umgelenkt (1).

¹⁶⁷ verringerter Sauerstoffgehalt des Blutes

¹⁶⁸ *Mekonium* ist im eigentlichen Sinne kein Verdauungsendprodukt des Fetus, sondern eine im noch funktionslosen fetalen Darm angesammelte zähe, dunkle Masse aus abgeschilferten Epithel der Schleimhäute, eingedickter Galle, sowie mit dem Fruchtwasser verschluckten Haaren und Hautzellen (14).

Glucocorticoide rufen eine Ausdünnung der Alveolenwand hervor und können damit den Zustand des vaskulären Bettes beeinflussen.

Allerdings beschrieb Coalson, dass weder die Behandlung mit Glucocorticoiden, noch mit Surfactant, die Entwicklung der Kapillaren bei vorzeitiger Geburt verbessern konnte [91,105].

1.5.14. Angeborene Herzfehler

Es gibt keine Evidenz für die Störung des Musters des Branchings der pulmonalen Zirkulation bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern. Eine Ausnahme stellen jene Kinder dar, die eine *pulmonale Atresie* aufweisen, bei welcher die Lungen durch die *systemische Zirkulation* versorgt werden [91].

Bei Kindern mit einem Anstieg des pulmonalen Blutflusses, oder bei denen die Lungen systemischen Drücken ausgesetzt sind, kommt es möglicherweise zu keiner normalen Adaption und damit entwickelt sich eine *obstruktive Lungengefäßkrankung* mit eventuellen Schäden der Intima¹⁶⁹ und Läsionen, die die Gefäß-Dilatation stören. Die Geschwindigkeit, mit der sich diese Erkrankung entwickelt, hängt vom Typus der Herzanomalie ab. Einige Fälle werden schon innerhalb von wenigen Monaten inoperabel, aber eine operative Behandlung kann, vor dem Auftreten von Schäden an der Intima, den Gefäßwiderstand wieder normalisieren [91,94].

Eine Hauptkomplikation nach chirurgischen Eingriffen am Herzen bei Babies (mit starkem Anstieg der Dicke der Media, aber ohne Veränderungen der Intima), stellt die *hypertensive Krise* dar. Es zeigt sich bei diesen Kindern ein sporadischer Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes über die Basiswerte, sogar bis hin zu systemischen Druckwerten.

Dabei manifestiert sich auch ein Anstieg der Levels des ET-I, des *Thromboxans*¹⁷⁰ und der Katecholamine. Heute werden diese Babies mit NO und anderen Vasodilatoren therapiert. Zukünftig könnte hierbei auch die Anwendung von *Phosphodiesterase-Hemmern*, die die Levels von cGMP verbessern, eine Behandlungsmöglichkeit darstellen [91].

1.5.15. Behandlung der pulmonalen Hypertension

Die Behandlung von Kindern mit pulmonaler Hypertension mittels intravenös oder inhalativ zugeführten Vasodilatoren, wie *Prostacyclin*, *Dipyridamol*¹⁷¹ und *NO*, macht große Fortschritte. Leider ist die Anwendung von Prostacyclin und Dipyridamol durch deren signifikanten systemischen, vasodilatorischen Effekt beschränkt [91].

Inhaliertes NO stellt einen selektiven Vasodilatator der Lunge dar. Mehrere randomisierte kontrollierte Studien, unter anderem auch jene von Clark *et al.*, berichteten über eine Verbesserung der Oxygenierung und eine Reduktion der Notwendigkeit der extrakorporalen Membranoxygenierung bei Neugeborenen mit PPHN oder *hypoxischem Atemversagen*, aber leider zeigte sich keine Reduktion der Mortalität [106]. Es sind wohl

¹⁶⁹ innere Schicht der Gefäßwand

¹⁷⁰ *Thromboxan-A2* ist ein *Prostaglandin*, das durch die *Thromboxan-Synthase* unter Vermittlung der *Cyclooxygenase* aus *Arachidonsäure* über *Prostaglandin H2* gebildet wird. Es vermittelt seine Wirkungen über den *Thromboxan-Rezeptor* (15).

¹⁷¹ Das *N,N'-4,8-Dipiperidinopyrimido[5,4-d]pyrimidin* ist ein Arzneistoff mit thrombozytenaggregationshemmender Wirkung, der zur *Thrombose-* und *Embolieprophylaxe* eingesetzt wird (16).

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Langzeit-Studien notwendig, um die Folgen der NO-Therapie auf die Entwicklung und die Neurologie zu erfahren [91].

Der primäre Mechanismus der Vasodilatation vollzieht sich über den Signaltransduktionsweg von NO und cGMP. Demnach werden Behandlungsmethoden mit *Sildenafil*, einem selektiven Hemmer der Phosphodiesterase, um dadurch die Levels von cGMP aufrecht zu erhalten, oder die Anwendung von Substraten des NO, dem L-Arginin, untersucht, die die Vasodilatation verbessern können.

Experimentelle Studien deuten auch auf einen möglichen Nutzen von Inhibitoren oder Blockern des ET-I-Rezeptors, *ET_A*, hin, um eine Vasodilatation zu unterstützen [91].

Die pulmonale Hypertension der Kindheit kann *primär*, *sekundär* (als Folge anderer Erkrankungen), oder auch in Form einer *persistierenden Hypertension des Neugeborenen (PPHN)*, auftreten [91]:

Primär

- Langzeitbehandlung und Hilfestellung notwendig
- eventuell Transplantation notwendig

Sekundär

- das Ziel ist die *Primärprävention*
- Langzeitbehandlung und Hilfestellung notwendig

PPHN

- das Ziel ist eine Hilfestellung, über die neonatale Periode hinaus, mit modernen intensivmedizinischen Techniken
- potentiell ist die Erkrankung voll reversibel

1.6. Molekulare Mechanismen der frühen Lungenentwicklung

Experimentelle Studien zeigten, dass dorso-ventrale, laterale und proximal-distale Entwicklungsmuster der Lunge durch Interaktionen mit dem umgebenden Mesenchym reguliert werden [107,108]. Diese Interaktionen beinhalten sowohl positive, als auch negative Signalmechanismen und diese führen letztlich zu normalem Wachstum und normaler Entwicklung der Lunge.

Eine experimentelle Entfernung des mesenchymalen Gewebes des embryonalen Endoderms führte zu einem Verzweigungs-Arrest *in vitro*, was die kritische Rolle des Mesenchyms bei der Bildung des Atmungstraktes betont [109,110].

Molekulare Mechanismen, die den Beginn der Knospung und die frühe Morphologie der Verzweigung der Lunge regulieren, beinhalten [111-113]:

- Expression der nukleären DNA-Bindungsproteine oder DNA-Transkriptionsfaktoren, die wichtig für die Beschaffenheit des Endoderms der Vorknospe und deren Derivate sind
- Endogene, sezernierte Polypeptide, oder Morphogene, die wichtig für die Ausbildung der Wachstums-Muster sind

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

- Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, die für die zelluläre Proliferation, Migration und Differenzierung wichtig sind
- Exogene Faktoren, wie Vitamin-A-Säure, die als *Morphogen*¹⁷² fungiert und für die frühe Knospung der Lunge benötigt wird

Transkriptionsfaktoren, die kritisch für die Entwicklung der Vorknospe und somit auch für die frühe Lungenentwicklung sind, beinhalten Mitglieder der FOX-, GATA- und GLI-Familie der Transkriptionsfaktoren.

FOXA2 (auch als HNF-3 β bekannt) ist ein Mitglied einer großen Familie von nukleären Transkriptionsfaktoren, der *Forkhead-Box-Familie*.

Diese Proteine sind in die Zelldifferenzierung und Gentranskription von zahlreichen Organen, wie dem zentralen Nervensystem und der Derivate des Endoderms der Vorknospen, involviert [114,115]. FOXA2 reguliert das Schicksal der Zellen und die Zellbildung im primitiven Endoderm der Vorknospe und kooperiert mit einem anderen Transkriptionsfaktor, dem TTF1¹⁷³, auch bekannt als T/EBP oder *Nkx2.1*, um die epitheliale Zell-Linie zu determinieren.

Die Expression von FOXA2 ist im Epithel der Lunge während der Lungenentwicklung detektierbar und seine Expression wird im Epithel der Lunge und der Alveolen der komplett differenzierten adulten Lunge weiterhin unterhalten. FOXA2 wird für die Bildung des Endoderms der Vorknospe und für die Organogenese und zelluläre Differenzierung der Lunge benötigt [71,116].

GATA-6 ist ein *Zinkfinger-Transkriptionsfaktor*, der die Differenzierung des Endoderms der primitiven Vorknospe in Zelllinien der respiratorischen Zellen über seine Interaktion mit TTF1 und FOXA2 induziert. GATA-6 wird im Endoderm der Vorknospe und im pulmonalen Epithel während der Lungenentwicklung exprimiert. Die genetische Ablation von FOXA2 oder GATA-6 an Mäusen, störte die Bildung des Endoderms der Vorknospe und somit die Entwicklung all seiner Derivate [117,118].

TTF1 ist ein nukleärer Transkriptionsfaktor oder ein Homeobox-Protein, das im Lungenepithel sowohl während der Entwicklung, als auch in der adulten Lunge exprimiert wird. TTF1 ist für die Morphogenese der Verzweigung, die epitheliale Zellproliferation, die Entwicklung der distalen Lungenstrukturen und die Expression der Surfactant-Proteine essentiell. Wenn TTF1 inaktiviert wurde, zeigte sich am Mausmodell eine Störung der Lungenentwicklung und es bildeten sich bilaterale sackförmige Strukturen, die von primitiven Epithelzellen ausgekleidet wurden und ihren Ursprung von einem kurzen gemeinsamen tracheo-ösophagealen Schlauch nahmen. Die Abwesenheit von TTF1 arretierte auch die dorso-ventrale Teilung von Trachea und Ösophagus, die Verzweigungs-Morphogenese der Lunge und die Differenzierung der Epithelzellen [71,119-121].

Mitglieder der GLI-Familie der Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren GLI-1, GLI-2 und GLI-3 werden im Mesoderm der Vorknospe exprimiert und sind *Transducer*¹⁷⁴ des *SHH*¹⁷⁵-Signalwegs [122]. SHH ist ein sezerniertes Polypeptid, das im Endoderm der Vorknospe

¹⁷² Gen, das die Gestalt und Beschaffenheit eines Gewebes beeinflusst (1)

¹⁷³ *Thyroid transcription factor-1*

¹⁷⁴ Signalübersetzer

¹⁷⁵ *Sonic hedgehog*-Gen

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

und in den primitiven Epithelzellen der Lunge, sowie auch im *Notochord*¹⁷⁶, der Neuralplatte und dem Gehirn vorkommt. Seine Rezeptoren, PTCH1¹⁷⁷ und PTCH2¹⁷⁸, werden in beiden, sowohl dem Mesoderm (PTCH1), als auch dem Endoderm (PTCH2) der Lunge exprimiert.

Wenn SHH an seinen Rezeptor bindet, wird ein anderes Transmembranprotein, genannt Smoothened¹⁷⁹, freigesetzt und in den Zellkern transloziert, wo es zur Aktivierung der Gene von Gli2 und Gli3 führt [122]. Diese modulieren wiederum die Expression anderer Gene, die eine Rolle in der Lungenentwicklung spielen, wie *Gli1*, *Ptch1*, *FOXA2* und *Fgf10* [122].

Die Mitglieder beider, sowohl die der SHH-, als auch jene der GLI-Familie, sind in die Induktion der Zellproliferation, sowie auch in die Entwicklung des dorso-lateralen Verzweigungsmusters der Lunge involviert. Die Expression von SHH ist an den Spitzen der wachsenden Bronchialschläuche nachweisbar, wo es als Mitogen für die primitiven mesenchymalen Zellen agiert [122].

Shh-Null-Mäuse-Mutanten¹⁸⁰ zeigten in Studien von Litingtung und Mitarbeitern Anomalitäten der Vorknospe. Die Verzweigungs-Morphogenese war schwer beeinträchtigt, was zu extrem hypoplastischen rudimentären Lungen, die von einem fusionierten tracheo-ösophagealen Schlauch ihren Ursprung nahmen, gekennzeichnet war [123]. Die genetische Ablation¹⁸¹ des *Gli2* (*Gli2*^{-/-}) an Mäusen, verursachte ebenfalls Defekte der Vorknospe, wie Stenosen des Ösophagus und der Trachea, pulmonale Hypoplasie und Defekte der Bildung der Lungenlappen (Fusion der vier rechten Lappen zu einem gemeinsamen Lappen) [123]. Dies koinzidierte mit Isoformen, in welchen die Expression von *Ptch1* und *Gli1* reduziert war [124].

Die genetische Inaktivierung der beiden Gene *Gli2* und *Gli3* führte bei Mäusen, mit der genetischen Konstellation *Gli2*^{-/-} und *Gli3*^{-/-} zu einer kompletten pulmonalen Agenesie, wobei diese Agenesie auch die Trachea und den Ösophagus betraf. Ösophageale Atresien und tracheo-ösophageale Fisteln mit Fusion der Lunge in der Mittellinie wurden bei Mäusen mit der genetischen Konstellation *Gli2*^{-/-} und *Gli3*^{+/-} gefunden [124].

Wachstumsfaktoren, die in der frühen Entwicklung der Lunge eine kritische Rolle spielen, beinhalten Mitglieder der Familie der FGFs¹⁸² und deren Rezeptoren, FGFR 1, 2, 3 und 4, die die zelluläre Proliferation, Migration und Differenzierung in der sich entwickelnden Lunge induzieren [9].

Eines der kritischsten Ereignisse der Induktion der frühen Verzweigungs-Morphogenese, stellt die Aktivierung der Expression von FGF10 im Mesoderm dar. FGF10 fungiert als chemotaktische Substanz und induziert das gerichtete Wachstum der bronchialen Knospen in Richtung der Regionen einer FGF10-Expression innerhalb des Mesoderms. Der Signalweg von FGF10 wird durch seinen Rezeptor, FGFR2, der ein Tyrosinkinase-Rezeptor ist, mediiert und dieser wird in der Vorknospe des Endoderms und des primitiven respiratorischen Epithels exprimiert [9].

Eine Unterbrechung der Protein-Expression von *Fgf10* oder *Fgfr2* an Mäuse-Mutanten führte zur Bildung einer Trachea, aber zum Fehlen der Lungen [125,126], hingegen führte

¹⁷⁶ Die *Chorda dorsalis* („Rückensaite“), auch *Notochord* oder *Achsenstab* genannt, ist das ursprüngliche, mesodermale, innere Achsenskelett (17).

¹⁷⁷ Patched 1

¹⁷⁸ Patched 2

¹⁷⁹ SMO

¹⁸⁰ Mäuse mit einer *Null-Mutation* für dieses Gen

¹⁸¹ Zerstörung/Inaktivierung eines Gens

¹⁸² *Fibroblast growth factors*

die Blockade des Fgfr2-Signalwegs bei mutierten Mäusen, die dominant negativ für den Rezeptor Fgfr2 (IIIb) waren, zu einer kompletten Blockade der Verzweigung aller luftleitenden Wege distal des Hauptbronchus [127]. Eine Exzision einer einzelnen Genkopie der Isoform von *Fgfr* (*IIIc*) (exprimiert im Mesenchym) führte zu einem Funktionsverlust mit gesteigerter Expression der Isoform des Fgfr2 (IIIb) an Mäusen [128]. Diese Mutation induzierte Defekte der Niere, Lunge, Tränendrüse und des Skeletts, die vergleichbar mit dem am Menschen beobachteten *Apert*¹⁸³- und *Pfeiffer*¹⁸⁴-Syndrom, die durch eine Missense-Mutation¹⁸⁵ im menschlichen *FGFR2*-Gen zustande kommen, waren [129].

Der *Vitamin-A-Säure-Signalweg* ist für eine normale Entwicklung viele verschiedener Organe, wie auch der Lunge, notwendig. Dieser Signalweg wird offenbar für die Bildung der Lungenknospen benötigt, denn ein akuter Vitamin-A-Mangel führte bei trächtigen Tieren zu einer trachealen Stenose und Lungenagenesie der Nachkommen [113].

Die Aktivität der Vitamin-A-Säure wird durch die Bindung an die Rezeptoren, RAR (α , β , γ) und RXR (α , β , γ), mediiert, wobei ein Komplex gebildet wird, der in den Zellkern transloziert wird, wo er die Transkription der Gene durch Bindung an *Vitamin-A-Säure-Response-Elements* in nichtcodierenden Regionen der *Targetgene*¹⁸⁶ moduliert. Diese Rezeptoren zeigen multiple Isoformen, die miteinander Heterodimere bilden und weit über das embryonale Stadium hinaus exprimiert werden, sowohl im pulmonalen Epithel, als auch im umgebenden Mesenchym [113].

Eine genetische Ablation des Vitamin-A-Säure-Rezeptors an Mäusen, führte zu Anomalitäten, die jenen glichen, die man bei Mäusen fand, die einem Vitamin-A-Mangel ausgesetzt waren. Es zeigten sich Fehlbildungen der Augen, des Skeletts, der Extremitäten, des Aortenbogens, des Urogenital-Traktes und der Lunge. Eine Disruption des Vitamin-A-Säure-Signalwegs bei Mäusen, mit der genetischen Compound¹⁸⁷-Konstellation *RAR α 1*^{-/-} und *RAR β 2*^{-/-}, führte zur Entstehung von tracheo-ösophagealen Fisteln, einer Agenesie der linken Lunge und einer Hypoplasie der rechten Lunge [130]. Die Entwicklung der Lunge ist während der Morphogenese der Verzweigung mit einer Herabregulierung des Vitamin-A-Säure-Signalwegs assoziiert, was zu einer gesteigerten *FGF10*-Genexpression führt und die Proliferation der distalen epithelialen Strukturen der Lunge limitiert [131]. Im Gegensatz dazu führt der Erhalt des Vitamin-A-Säure-Signalwegs in Kulturen der embryonalen Lunge zu einer Disruption der Bildung der distalen Lungenstrukturen,

¹⁸³ Das *Apert-Syndrom*, auch *Akrozephalosyndaktylie* genannt, ist eine genetisch bedingte Besonderheit auf der Grundlage einer Mutation des *FGFR2*-Gens auf dem Chromosom 10, die zu vielfältigen körperlichen Fehlbildungen führt. Benannt wurde das Syndrom 1896 nach dem französischen Kinderarzt Eugene Apert. Es gehört zur Gruppe der *kraniofazialen Fehlbildungen* (18).

¹⁸⁴ Das *Pfeiffer-Syndrom* ist eine seltene, autosomal-dominant vererbte Krankheit. Es gehört zusammen mit dem *Apert-Syndrom*, dem *Crouzon-Syndrom*, dem *Carpenter-Syndrom* und dem *Saethre-Chatzen-Syndrom* zu den *kraniofazialen Fehlbildungen*. Betroffen ist etwa eine von 100.000 Personen. Das Pfeiffer-Syndrom kann vorgeburtlich, durch den ultrasonographischen Nachweis einer *Kraniosynostose*, eines *Hypertelorismus* mit *Proptose* (Hervortreten des Augapfels) und breiten Daumen, erkannt werden. Es lässt sich auch durch molekulare Analysen feststellen, wenn ein Wiederholungsrisiko besteht und die ursächliche Mutation bekannt ist (19).

¹⁸⁵ Sinnverändernde Mutation: Codierung für eine andere Aminosäure.

Im Gegensatz dazu: „*Nonsense-Mutation*“ (sinnentstellende Mutation): Codierung für einen Stopp der Translation (20).

¹⁸⁶ Zielgene

¹⁸⁷ *Kombinierte* oder *Komplexe Heterozygotie* (auch *Compound-Heterozygotie*) ist ein Begriff aus der Genetik: als komplex heterozygot wird das Vorliegen zweier unterschiedlich mutierter *Allele* desselben Gens eines Chromosomenpaars bezeichnet, das bei einem autosomal rezessiven Erbgang durch diese besondere Konstellation zu einer Erkrankung führt (21).

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

während jene der proximalen Strukturen gefördert wird. Dies geschieht hauptsächlich durch eine Hochregulierung des SHH-Signalwegs, der den Signalweg von FGF10 hemmt (siehe hierzu **Abbildung 3**) [131].

Der Signalweg der Vitamin-A-Säure könnte auch durch Interaktionen mit der HOX-Familie der Transkriptionsfaktoren, die das antero-posteriore Entwicklungsmuster der Körperachse während der Entwicklung determiniert, mediiert werden. Die Expression der *HOX*¹⁸⁸-Gene wird während der Lungenentwicklung reguliert und ist mit der Morphogenese der Verzweigung assoziiert. An der Maus werden *Hoxb3*, *Hoxb4* und *Hoxb5* in der Vorknospe des Endoderms, wo sich die Lungenknospen formen, exprimiert. Eine *aberrante*¹⁸⁹ Expression von *Hoxb5* war mit der menschlichen *bronchopulmonalen Sequestration*¹⁹⁰ assoziiert. Dies suggeriert, dass die Dysregulation des *Hoxb5*-Gens, den Berichten von Volpe *et al.* folgend, in die Entwicklung der akzessorischen oder extrapulmonalen Lungen-Strukturen involviert sein könnte [132].

In der Lunge der Maus werden *Hoxb3* und *Hoxb4* im Mesenchym der Trachea, der Bronchien und der distalen Lunge exprimiert, wo hingegen *Hoxa5*, *Hoxb2* und *Hoxb5* auf das distale Mesenchym beschränkt sind [133]. Die Vitamin-A-Säure führt zu einer Hochregulierung von *Hoxb5* in Kulturen von embryonalen Lungen, was in anormal verlängerten bronchialen Schläuchen und reduzierter Verzweigung resultiert [134]. Im Gegensatz dazu führt die Hemmung der *Hoxb5*-Expression zu kurzer primärer und reduzierter sekundärer Verzweigung [134].

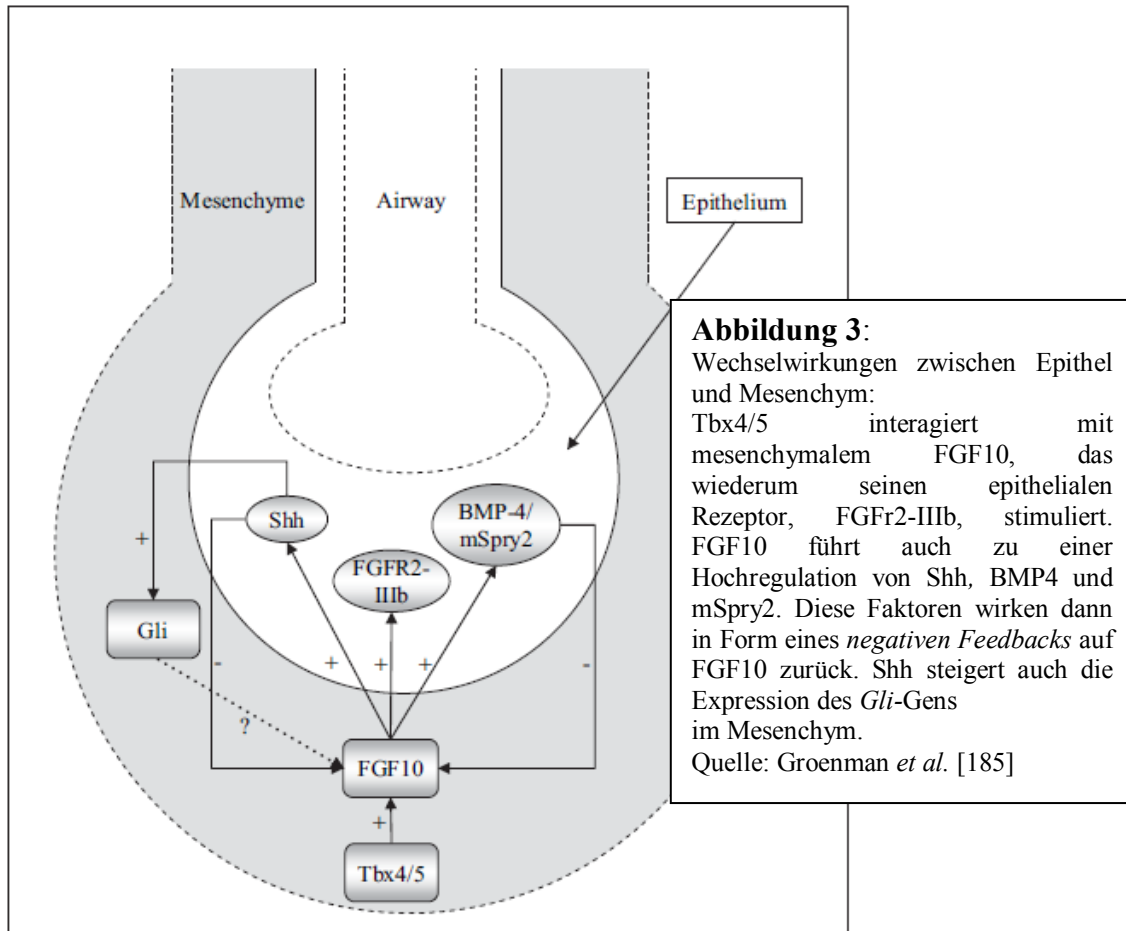
Eine von Aubin *et al.* durchgeführte, gezielte Deletion des *Hoxa5*-Gens bei Mäusen, führte zu laryngo-trachealer Malformation, reduzierte die Zahl an Knorpelringen der Trachea und der Bronchien, verursachte tracheale Stenosen, eine verschlechterte Morphogenese der Verzweigung und eine Verdickung der alveolären Wände. Der Verlust von *Hoxa5* wurde auch mit einer reduzierten Expression von *Ttf1* und *Foxa2*, sowie auch ihrer Target-Gene, den Surfactant-Proteinen, in Verbindung gebracht [135].

Die Expression von N-myc, einem Proto-Onkogen, das in die zelluläre Proliferation und Morphogenese der Verzweigung der Lunge involviert ist, war verstärkt [135,136].

¹⁸⁸ Die Homeobox ist eine DNA-Sequenz innerhalb von Genen, die an der Morphogenese beteiligt sind (1).

¹⁸⁹ abnormale

¹⁹⁰ Die bronchopulmonale Sequestration stellt einen, von der normalen Lunge abgegrenzten Bezirk dar, der aus alveolären und bronchialen Strukturelementen aufgebaut ist. Dabei fehlt in der Regel ein Anschluss an das normale Bronchialsystem (22).



1.6.1. Frühe Organogenese der Lunge

Shh ist ein sehr genau untersuchtes Morphogen und übt seinen Haupteinfluss auf die frühe Lungenentwicklung aus, wobei es in den Lungenepithelzellen exprimiert wird [137]. *Shh* bindet an den Membran-Rezeptor *Ptch1*¹⁹¹, es kann allerdings auch an einen anderen Oberflächenrezeptor binden, an *Hip1*¹⁹².

Die Aktivierung des *Ptch*-Rezeptors führt zu einer Freisetzung des zuvor inhibierten Rezeptors *Smo*¹⁹³ [138]. Damit kommt es zu einer Hochregulation des *downstream pathways*¹⁹⁴. Die Aktivierung von *Hip1* führt andererseits zu einer Abschwächung des *Shh*-Signalwegs. Die Aktivierung des *Shh*-Signalwegs modifiziert die Aktivität der Mitglieder der Familie der *Gli*-Transkriptionsfaktoren [137]. *Shh*-Null-Mutanten entwickeln zwar Lungenknospen, aber es kommt zu einem fast kompletten Versagen der Morphogenese der Verzweigung der Lunge [139]. Zusätzlich prägen Mäuse, mit der genetischen Konstellation *Shh*^{-/-}, den Beschreibungen von Miller und Kollegen folgend, eine Ösophagusatresie bzw. Ösophagusstenose, eine TEF¹⁹⁵ und eine reduzierte mesenchymale Proliferation aus [140].

¹⁹¹ Patched1

¹⁹² Hedgehog-interacting protein 1

¹⁹³ Smoothened

¹⁹⁴ *Downstream Signalweg*: *Downstream-Gene* zeigen eine Orientierung, die durch die Richtung ihrer Transkription (von 5' nach 3') festgelegt wird. *Downstream* bezeichnet auch die Richtung der Transkription eines Gens (auf sein Ende zu) (23).

¹⁹⁵ *tracheo-ösophageale Fistel*

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Im Gegensatz dazu zeigen Mäuse mit einer Überexpression von *Shh* einen Anstieg der Bildung von Mesenchym und Epithel [141]. Mäuse mit einer Mutation des Typs *Hip*^{-/-} zeigten einen Anstieg des Signalweges von Hedgehog und eine Reduktion der Morphogenese der Verzweigung der Lunge mit einer relativen Zunahme der Mesenchymzellen [138].

Miller *et al.* [142] kamen zu dem Ergebnis, dass *Shh*, neben der Regulation der Morphogenese der Verzweigung, auch die Differenzierung des peripheren Lungenmesenchyms in Richtung der Bildung der glattmuskulären Zelllinie beeinflusste. Ein anderer wichtiger Faktor der frühen Lungenentwicklung ist TTF1¹⁹⁶. Eine Disruption dieses Gens bei Mäusen führte zur Ausprägung einer schweren Lungen- und Schilddrüsenhypoplasie und zu einem Entwicklungsarrest in der pseudoglandulären Phase der Lungenentwicklung, sowie einem kompletten tracheo-ösophagealen Defekt [143]. Eine Deletion des *TTF1*-Gens wurde von Iwatani *et al.* auch am Menschen beschrieben. Die betroffenen Kinder litten unter einer Dysfunktion der Schilddrüse und unter Atemversagen [144].

Die zuvor genannten Faktoren scheinen sich auch alle gegenseitig zu beeinflussen. *Shh* stellt ein Ziel des *Fgf10*/*Fgfr2b*-Signalwegs dar. Das mesenchymale *Fgf10* führte zu einer Hochregulation der epithelialen Expression von *Shh*, was wiederum über den Gli-Signalweg auf das Mesenchym zurückwirkte und damit zu einer Herabregulierung der *Fgf10*-Expression führt [145]. Eine ähnliche Schleife des negativen Feedbacks wurde für das *Bmp4*¹⁹⁷ und das *mSpry2*¹⁹⁸ beschrieben [146]. Diese Faktoren werden gemeinsam mit *Shh* exprimiert und beide hemmen die Verzweigung und die Proliferation und werden durch *Fgf10* stimuliert. Wenn sie einmal stimuliert sind, wirken sie negativ auf *Fgf10* zurück [147]. *Fgf10* scheint also eine *negative Feedback-Schleife* zu aktivieren, über welche das Epithel den Grad seines Wachstums zu regulieren vermag. Diese Feedback-Schleife könnte durch die *T-Box*-Gene¹⁹⁹ 4 und 5 kontrolliert werden.

Wenn experimentell beide *T-Box*-Gene durch *antisense Oligonukleotide*²⁰⁰ in Lungenzellkulturen inaktiviert wurden, wurde die Expression von *Fgf10* unterdrückt und die Verzweigungsvorgänge der Lunge kamen zum Stillstand [147]. Dies deutete wiederum darauf hin, dass *Tbx4* und 5 die *Fgf10*-Expression stimulierten.

Es existieren auch Beobachtungen von Hiroi *et al.*, die besagen, dass *Nkx*-Moleküle in die Aktivierung von *Tbx*-Proteinen involviert sein könnten [148]. Die epithelialen Zellen, die die Luftwege auskleiden, differenzieren sich in mehr als 20 verschiedenen Zelltypen, die jeweils hochspezifische Funktionen ausüben. Die PNECs²⁰¹ sind die ersten Zellen, die beim Menschen eine Differenzierung zeigen. Die Entwicklung der PNECs wird durch *Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren* reguliert. Mäuse mit einem Mangel an *Mash* entwickeln keine PNECs [149], wo hingegen *Hes1*-defiziente Mäuse gesteigerte Zahlen von PNECs aufweisen [150]. Beide, sowohl *Hes1*, als auch *Mash1*, sind Komponenten des *Notch-Signalweges* [151].

¹⁹⁶ *Thyroid transcription factor-1*

¹⁹⁷ *Bone morphogenetic protein 4*

¹⁹⁸ *Sprouty 2*

¹⁹⁹ *Tbx*

²⁰⁰ *Antisense-Oligonukleotide* sind kurzkettige synthetische Nukleinsäuren. Der Name nimmt darauf Bezug, dass ihre Basensequenz entgegengesetzt (und damit „entgegen dem ursprünglichen Sinn“ = *anti sense*) zu einer funktionalen mRNA ist. Während dem Wirkmechanismus zahlreicher Arzneistoffe die Hemmung der Funktion von Proteinen zugrunde liegt, verhindern *Antisense-Oligonukleotide* bereits die *Biosynthese* von Proteinen (24).

²⁰¹ *pulmonale neuroendokrine Zellen*

Experimente haben Notch1 als wichtigen Faktor für die neuroendokrine Differenzierung der Lunge erkannt [152].

Einen anderen wichtigen Faktor stellt in dieser Beziehung Pod-1 dar und dieses *Helix-Loop-Helix-Protein* beeinflusst die Zelldifferenzierung und das Schicksal der Zellen. Mäuse mit einem Mangel dieses Faktors weisen eine schwere Lungenhypoplasie, einen Mangel an azinären Tubuli, eine gesteigerte Expression von CCSP²⁰² und eine reduzierte Expression des SP-C²⁰³ auf und versterben bei der Geburt [153].

Andere Transkriptionsfaktoren, die in die Differenzierung der Epithelzellen involviert sind, stellen TTF1, FOXa2 und GATA-6 dar. TTF1 scheint einen regulatorischen Einfluss auf die Transkription von SP-A, -B, -C und CCSP auszuüben [154], wo hingegen Foxa2 die Expression von SP-B und CCSP moduliert [155]. GATA-6 agiert synergistisch mit TTF1 und beeinflusst die Aktivität des SP-C-Promotors²⁰⁴ [156].

1.6.2. Angeborene Mutationen und Entwicklungsstörungen, die mit frühen Malformationen der Lunge assoziiert sind

Die Agenesie der Lunge, Defekte der Bildung der Lungenlappen, tracheale Stenose und die tracheo-ösophageale Fistel wurden an einigen Patienten mit dem *Pallister-Hall-Syndrom* beobachtet, das mit Mutationen im humanen *GLI3-Gen* assoziiert ist. Die Patienten mit diesen Mutationen zeigen auch Malformationen des zentralen Nervensystems (Aplasie oder Dysplasie der Hypophyse), des cranio-fazialen Bereiches, der Extremitäten (*Polydaktylie*²⁰⁵), der Niere (renale Dysplasie), der Nebenniere (Nebennieren-Hypoplasie) und des Herzens [157,158]. Eine Atresie des Ösophagus, tracheo-ösophageale Fisteln, Stenosen der Trachea und des Ösophagus, *Laryngo-*, *Tracheo-*, und *Bronchomalazie*, Atresie der Lungenlappen und Aplasie der Lunge wurden bei Patienten mit *Pfeiffer-*, *Apert-*, und *Crouzon-Syndrom* beobachtet und sie alle sind assoziiert mit Mutationen des menschlichen *FGFR2*-Gens. Es kommt bei diesen Patienten auch u. a. zum vorzeitigen Verschluss der Schädelnähte [157-160].

1.6.3. Molekulare Mechanismen, die die Morphogenese der Verzweigung regeln

Während der pseudoglandulären Phase der Lungenentwicklung erweist sich der Signalweg von FGF10 als kritisch für die Morphogenese der Verzweigung.

FGF7 (auch KGF genannt) wird im Mesenchym ebenfalls zu dieser Zeit exprimiert und bindet an die FGFR2-Rezeptoren im Epithel. FGF7 beeinflusst die Morphogenese der Verzweigung, indem es das epitheliale Wachstum und die Differenzierung fördert [9].

Eine Überexpression von Fgf7 in transgenen Mäusen resultierte in der Bildung von großen, flüssigkeits-gefüllten, zystenartigen Strukturen [161,162], während Null-Mutanten für Fgf7 keine Anomalitäten zeigten, was darauf hinweist, dass sich der Signalweg von Fgf7 offenbar mit dem anderer Wachstumsfaktoren überlagern könnte [163].

Auch FGF9 wird in hohen Levels während dieser Phase der Lungenentwicklung exprimiert, allerdings innerhalb des pulmonalen Epithels und nicht innerhalb des Mesenchyms. Der Signalweg von FGF9 wird über den FGFR1²⁰⁶ reguliert, der im

²⁰² Clara cell secretory protein

²⁰³ *Surfactant-Protein-C*

²⁰⁴ Eine DNA-Sequenz, die als Erkennungs- bzw. Bindungsregion für die *Polymerase* dient (1).

²⁰⁵ Vorkommen zusätzlicher Finger und/oder Zehen (1)

²⁰⁶ *Fibroblast growth factor receptor 1*

Mesenchym exprimiert wird. Eine gezielte Disruption an Mäusen (*Fgf9*-Null-Mutation) führte zu einer Lungenhypoplasie mit einer Reduktion des mesenchymalen Gewebes und der Verzweigung der Luftwege, wenngleich die Sacculationen der peripheren Luftwege und die Zytodifferenzierung der Alveolarepithelzellen davon nicht betroffen waren [164].

Zusätzliche Wachstumsfaktoren, die die Morphogenese der Verzweigung und das Wachstum der Lunge beeinflussen, sind: FGF1²⁰⁷ und FGF2²⁰⁸, die FGF7 hochregulieren; EGF²⁰⁹ und TGF- α ²¹⁰, die die Morphogenese der Verzweigung, Zelldifferenzierung und die Zellproliferation über den Rezeptor EGFR stimulieren; HGF²¹¹, der ein potentes Mitogen darstellt; IGF²¹², der die Wirkung anderer Wachstumsfaktoren mediiert; PDGF²¹³, der ein potentes Mitogen und eine chemoattraktive Substanz für Mesenchymzellen darstellt und der VEGF²¹⁴, der das Wachstum der Gefäße und ihr Verzweigungsmuster reguliert [165,166].

Faktoren, die den FGF-Signalweg limitieren oder antagonisieren, sind (abgesehen von SHH): TGF- β ²¹⁵, BMP4²¹⁶ sowie Spry2²¹⁷ und Spry4, die den Signalweg von EGF und TGF- β modulieren [165,166].

TGF- β moduliert die Morphogenese der Verzweigung in der Lunge durch die Limitierung der Knospenbildung. TGF- β akkumuliert innerhalb des, den proximalen Luftwegen benachbarten Mesenchyms und zwischen den sich verzweigenden Luftwegen, wo es die FGF10-Expression inhibiert und die Synthese und Ablagerung von Komponenten der ECM²¹⁸ fördert. Diese Ablagerung der Komponenten der ECM stabilisiert die proximalen Luftwege und verhindert eine weitere Verzweigung in diesem Bereich. Die Induktion von Mitgliedern der SMAD-Familie, den Mediatoren von TGF- β , hemmt ebenfalls die Zellproliferation und auch die Expression von FGF10 [165].

Die Mitglieder der TGF- β -Familie sind auch sehr wichtig für die proximal-distale Differenzierung und die Bildung des *links-rechts-Musters* in der Lunge.

Weaver *et al.* [167] beobachteten, dass eine Disruption des Bmp4-Signalwegs an Mäusen das proximal-distale Differenzierungsmuster im sich entwickelnden Lungenepithel veränderte. BMP4 wird in hohen Levels im distalen Epithel exprimiert und wirkt der durch FGF10 induzierten Knospenbildung entgegen. Eine Überexpression des Bmp-Antagonisten *Xnoggin*, oder eine Blockade des Signalwegs von Bmp4 an transgenen Mäusen (durch die Verwendung eines dominant-negativen Bmp-Rezeptors, *dnAlk6*), führte zu einer Reduktion der distalen Typen der Alveolarzellen bei einem begleitenden Anstieg der bronchiolären Zelltypen (Zilien-tragende Zellen und *Clara-Zellen*) [167]. Eine Überexpression von Gremlin, einem Protein, das an Bmp4 bindet und seine Interaktion mit dem Rezeptor verhindert, führte zu einem ähnlichen Phänotyp bei transgenen Mäusen [168], während eine Reduktion der Expression von Gremlin in Lungenzellkulturen die Morphogenese der Verzweigung, die Proliferation der Epithelzellen und die Zytodifferenzierung der Typ II-Alveolarepithelzellen steigerte [169].

²⁰⁷ *acidic FGF*

²⁰⁸ *basic FGF*

²⁰⁹ *Epidermal growth factor*

²¹⁰ *Transforming growth factor- α*

²¹¹ *Hepatocyte growth factor*

²¹² *Insulin-like growth factor*

²¹³ *Platelet derived growth factor*

²¹⁴ *Vascular endothelial growth factor*

²¹⁵ *Transforming growth factor- β*

²¹⁶ *Bone morphogenetic protein 4*

²¹⁷ codiert vom *Sprouty*-Gen

²¹⁸ Extrazelluläre Matrix

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Die Asymmetrie zwischen der linken und rechten Seite der Lunge wird durch eine Kaskade, in die vier andere Mitglieder der TGF- β -Familie involviert sind, bedingt: LEFTY-1, LEFTY-2, NODAL und GDF-1²¹⁹ [166]. LEFTY-1 beschränkt die Expression von LEFTY-2 und NODAL auf die linke Seite. Die Inaktivierung von *Lefty-1* an Mäusen führt zu bilateraler Expression von Lefty-2, was einen *linkspulmonalen Isomerismus*²²⁰ entstehen lässt. Unter diesen Bedingungen wird das Muster der Lappenbildung, das normalerweise auf der rechten Seite vorgefunden wird (vier Lappen), durch das Muster der linksseitigen Lappenbildung (ein Lappen) ersetzt, was zu bilateralen „linken“ Lungenlappen führt [170].

Im Gegensatz dazu, zeigt sich bei einer gezielten Deletion von *Nodal* oder *Gdf1* ein *rechter Isomerismus* der Lungenlappen [171,172].

Andere Faktoren, die die Ausprägung des rechts-links Musters beeinflussen, sind der Vitamin-A-Säure-Signalweg und die Expression von *Foxj1*²²¹. Eine gezielte Unterbrechung der Vitamin-A-Säure-Signalkaskade in Compound-Null-Mutanten-Mäusen (*Rara1*^{-/-}; *Rarb2*^{-/-}) führte zu einer Agenesie des linken Lungenlappens [130], während eine gezielte Disruption des Transkriptionsfaktors *Foxj1* zu zufälliger links-rechts-Asymmetrie und zur kompletten Abwesenheit von Zilien führte [173].

Dieser Phänotyp ist mit dem am Menschen beobachteten *Kartagener-Syndrom* vergleichbar, bei welchem ein Situs inversus²²², Bronchiektasien²²³ und unbewegliche Zilien auftreten [157].

1.6.4. Molekulare Mechanismen der Regulation der Gefäßentwicklung

Das vaskuläre Wachstum und das Muster der Gefäßbildung wird durch den VEGF²²⁴, der im Epithel synthetisiert und in das Mesenchym sezerniert wird, reguliert. Im Mesenchym bindet VEGF an seine Rezeptoren, VEGFR-1²²⁵, VEGFR-2²²⁶ und VEGFR-3, das auf primitiven Endothelzellen exprimiert wird [174]. Eine gezielte Inaktivierung des *Vegf*-Gens an Mäusen führte zu einer Verschlechterung der Angiogenese und erwies sich in der fetalen Periode als letal [175].

Ebenso hatte auch eine gezielte Mutation des *Vegf*-Rezeptors, *Flt-1*, aufgrund der Störung der Gefäßbildung am Embryo, letale Folgen [176]. Ruhrberg *et al.* [177] experimentierten mit Mäusen, die eine Isoform von *Vegfa-A* (*Vegf120/120*) exprimierten und einen Mangel an Heparin-Bindungs-, oder ECM-Bindungs-Domänen aufwiesen. Diese Mäuse überlebten die neonatale Periode und prägten eine spezifische Reduktion der Bildung der Gefäßäste aus. In den Lungen zeigten sich eine Verschlechterung der Entwicklung der Mikrogefäße und eine verzögerte Reifung der Luftwege [178]. Die Entwicklung der Gefäße ist auch von Interaktionen mit den Komponenten der umgebenden ECM abhängig. *Fibronectin*, das über Integrin-Rezeptoren an Endothelzellen bindet, ist eine Komponente der kapillären Basalmembran und ist für die frühe Bildung der kapillären Gefäßschläuche sehr wichtig. Es fördert auch die Migration und Proliferation der Zellen und verhindert die Apoptose und den Zelltod. Mäuse, denen das *Fibronectin*-Gen fehlt, können keine normalen Gefäße bilden und versterben bereits *in utero* [179].

²¹⁹ Growth/differentiation factor-1

²²⁰ beide Lungenflügel wachsen nach dem Muster des linken Flügels

²²¹ auch bekannt als HFH-4

²²² partielle oder totale spiegelbildliche Umkehrung der Lage der Eingeweide (1)

²²³ irreversible Erweiterung der Bronchien (1)

²²⁴ *Vascular endothelial growth factor*

²²⁵ auch bekannt als *Flt-1* bei der Maus

²²⁶ auch bekannt als *Flk-1* der Maus, oder *KDR* des Menschen

VEGF spielt eine Schlüsselrolle in der Entwicklung der Lungengefäße und führt zu einer Hochregulierung der eNOS²²⁷ [180]. Mäuse mit einem Mangel an eNOS zeigen keinen Anstieg des Körpergewichtes und Volumens der Lunge und die Lungen dieser Mäuse zeigen eine *Hypoperfusion*²²⁸ der Kapillaren und eine Abnahme der Anzahl der arteriellen Gefäßäste [181].

Eine weitere wichtige Gruppe stellen die HIFs²²⁹ dar, eine Familie von Regulatoren der Transkription, die unter hypoxischen Bedingungen hochreguliert werden [182]. Der HIF-Transkriptionskomplex ist ein Heterodimer, das aus einer von drei *Alpha-Untereinheiten* (HIF-1 α , HIF-2 α oder HIF-3 α) und einer *Beta-Untereinheit* (HIF-1 β), auch bekannt als *aryl hydrocarbon nuclear translocator*, zusammengesetzt ist.

Die Regulation von HIF durch Sauerstoff vollzieht sich über die Modifikation der Alpha-Untereinheit, während die Beta-Untereinheit ein nukleäres Protein darstellt, dessen Aktivität von Hypoxie nicht beeinflusst wird.

Unter hypoxischen Bedingungen ist die Alpha-Untereinheit stabil und kann dadurch im Zellkern akkumulieren, wo sie, über die Bindung an HIF-1 β , HIF-responsive Elemente innerhalb der Promotorregion von Hypoxie-responsiven Target-Genen erkennt, zu welchen auch VEGF gehört [183]. Mäuse mit der genetischen Konstellation *Hif-1 α -/-* zeigten schwere kardiovaskuläre Defekte und verstarben bereits *in utero*, was wiederum den Einfluss von Hif auf die Vaskularisierung betonte [184]. Groenman *et al.* demonstrierten in einer Studie, dass eine Umgebung mit geringem Sauerstoffgehalt die Vaskularisierung der Lunge steigerte [185]. Eine Hemmung der Neovaskularisierung unter Anwendung des EMAPII²³⁰, führte in einer Studie von Schwarz *et al.* zu einem Arrest der Lungenentwicklung in der kanalikulären Phase, was darauf hindeutet, dass die vaskuläre Entwicklung und die Verzweigung in der Lunge Hand in Hand gehen [186].

Laminin, ein großes Glykoprotein, stellt eine andere wichtige Komponente der Basalmembran dar und beeinflusst das Wachstum, die Differenzierung und die Migration der Zellen, sowie die Bildung der Gefäßschläuche [187]. Typ IV-Kollagen, das die Hauptstrukturkomponente der reifen Basalmembran darstellt, bindet ebenfalls an Endothelzellen und verwendet dabei spezielle *Integrin-Rezeptoren*. Es fördert die Zytodifferenzierung und die Bildung von Zellverbindungen. Typ IV-Kollagen wird später als Fibronectin und Laminin exprimiert und sein Auftreten geht mit einer Reduktion der endothelialen Zelldivision, Förderung der Gefäßschlauch-Bildung und Stabilisierung der Struktur der neu geformten Gefäße einher. Adhäsions-Moleküle, wie Selektin-E, fördern ebenfalls die Bildung der Gefäßschläuche [187].

Andere Wachstumsfaktoren, die die Gefäßentwicklung modulieren, sind PDGF-A und PDGF-B, die als Mitogene und *chemoattraktive Stoffe*²³¹ für andere Mesenchymzellen, die in die Gefäßwand inkorporiert werden, wirken. Wenn diese Zellen einmal mit dem Endothel Kontakt aufnehmen, differenzieren sie in glatte Muskelzellen, was hauptsächlich durch die Aktivierung von TGF- β , das die weitere Proliferation der Endothelzellen hemmt und die Ablagerung von ECM (Elastin und Kollagen) fördert, bewirkt wird. Ein ähnliches Phänomen tritt beim *Recruitment*²³² der glatten Muskelzellen durch die sich entwickelnden bronchialen Schläuche auf. Zusätzlich zu TGF- β und PDGF, sezernieren Endothelzellen

²²⁷ *Endothelial nitric oxide-Synthase*

²²⁸ mangelnde Durchblutung

²²⁹ *Hypoxia-inducible factors*

²³⁰ *Endothelial monocyte-activating polypeptide*

²³¹ Lockstoffe (1)

²³² Wiedereintritt von ruhenden Zellen in den Zellzyklus (1)

verschiedene und zahlreiche andere Wachstumsfaktoren und Inhibitoren, die für die Differenzierung und Proliferation der Zellen wichtig sind. Diese beinhalten EGF/TGF- α ²³³, FGF1, FGF2, IGF-1 und IGF-2, die alle die Zellproliferation stimulieren, und TNF- α ²³⁴ und Heparan-Sulfat, die die Zellproliferation hemmen. Die Ablagerung von ECM-Komponenten (Kollagen und Elastin) scheint sowohl durch PDGF, als auch durch TGF- β , aber auch durch IGF-1 und IGF-2, stimuliert zu werden [91,187].

Einige Gene wie *VEGF* und *MK*²³⁵ sind dafür bekannt, eine Rolle bei der vaskulären Entwicklung zu spielen und sie tragen HIF-responsive Elemente²³⁶, was darauf hindeutet, dass die Sauerstoff-Homöostase in der postnatalen Lunge eine Rolle bezüglich der Reifung der Mikrogefäße spielen könnte [91].

Die Expression von VEGF wird durch Dehnung der Lunge in den Lungenzellen hochreguliert, was die Rolle der Wirkung des dehnungsinduzierten Lungenwachstums auf die Vaskularisierung betont. Demnach scheint VEGF künftig eine vielversprechende Rolle bei der Therapie von Patienten mit Lungenhypoplasie einnehmen zu können. Trotzdem sollte man hierbei vorsichtig vorgehen, denn eine postnatale Überexpression von Vegf führte, aufgrund von gesteigertem vaskulären Leak²³⁷ und pulmonalen Hämorrhagien²³⁸, zu gesteigerter neonataler Mortalität bei Mäusen. Die Mäuse, die trotzdem bis zum Erreichen des Erwachsenenalters überlebten, zeigten eine Häm siderose²³⁹ der Lunge und ein Emphysem²⁴⁰ [188,189].

Das MK stellt einen RA²⁴¹-responsiven Wachstumsfaktor dar, der die Angiogenese, das Zellwachstum und die Zellmigration beeinflusst.

Hohe Levels von MK werden während der Alveolarisierung und der Reifung der Gefäße beobachtet, was die wichtige Rolle von MK bei diesen Prozessen betont [190]. Mäuse, die nach der Geburt hypoxischen Bedingungen²⁴² ausgesetzt wurden, prägten gesteigerte Levels von Mk und ein Remodeling der peripheren Gefäße aus. Die Produktion von MK innerhalb des Epithels wird durch Hypoxie, in Abhängigkeit von HIF-1 α , reguliert [190].

Bei Mäusen, die eine reduzierte Expression von Foxf1²⁴³ aufwiesen, kam es zu einer Disruption der epithelial-mesenchymalen Schnittstelle mit gesteigerter Apoptose und reduzierter Expression von Sp-b. Dies führte zu Defekten der Alveolarisierung und Vasculogenese und zu pulmonaler Hämorrhagie [191].

1.6.5. Molekulare Mechanismen der Regulation der alveolären Entwicklung

Faktoren, die die Bildung von Elastin in der sich entwickelnden Lunge fördern, spielen eine wichtige Rolle im Prozess der Alveologenese²⁴⁴.

Die Alveologenese wird als Prozess beschrieben, der durch die Bildung sekundärer Septen, die die terminalen Sacculi in definitive Alveolen unterteilen, charakterisiert ist. Dieser Prozess wird durch die Synthese und Ablagerung von Elastin durch die alveolären

²³³ Transforming growth factor- α

²³⁴ Tumornekrosefaktor- α

²³⁵ Midkine: ein RA-responsiver Wachstumsfaktor [91]

²³⁶ Elemente, die durch HIF beeinflusst bzw. reguliert werden

²³⁷ Durchlässigkeit der Lungengefäße

²³⁸ Blutungen

²³⁹ vermehrte Eisenablagerung (1)

²⁴⁰ Lungenemphysem: Überblähung der Lunge (1)

²⁴¹ Vitamin A-Säure

²⁴² Sauerstoffmangel-Bedingungen

²⁴³ Forkhead box protein F1

²⁴⁴ Bildung der Lungenalveolen

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Myofibroblasten bewirkt, die sich an den Spitzen der sich entwickelnden Septen befinden. PDGF, ein potentes Mitogen und eine chemotaktische Substanz für Mesenchymzellen, wird im Lungenepithel exprimiert, wo hingegen der zugehörige Rezeptor, PDGFR- α , an zukünftigen glatten Muskelzellen der Alveolen oder an Myofibroblasten gefunden wird [185].

Mäuse, die eine gezielte Deletion des *Pdgf-a*-Gens aufwiesen, zeigten eine Störung der Myofibroblasten bezüglich ihrer Vermehrung und der Migration in die primären alveolären Septen. Dies führte zum postnatalen Auftreten von Emphysemen oder zu vergrößerten alveolären Sacculi²⁴⁵, aufgrund eines vollständigen Versagens der Alveologenese, sowie auch einer reduzierten Ablagerung von Elastin im Lungenparenchym. Mäuse, die eine gezielte Deletion des Elastin-Gens aufwiesen (*Eln*-/-), entwickelten in der postnatalen Periode ebenfalls ein Emphysem, weil auch hier die Störung der Elastinsynthese und dessen Ablagerung zu einem kompletten Versagen der Alveologenese führte [192,193].

Vitamin-A-Säure übt eine verstärkende Wirkung auf die Alveologenese aus, indem sie die Transkription von *Tropoelastin*, dem löslichen Vorläufer von Elastin, steigert.

An Mäusen, die eine compound-null-Deletion der Vitamin-A-Säure-Rezeptoren, *Rar- γ* -/- und *Rxr- α* -/-, trugen, fiel eine Abnahme der Genexpression von Elastin und des elastischen Gewebes und eine Reduktion der Alveolenbildung in der postnatalen Lunge auf [194,195]. Auch der Signalweg von FGF ist in die Alveologenese involviert.

Die Lungen von compound-null-mutierten Mäusen, die homozygot für die Deletion der Gene von *Fgfr-3*²⁴⁶ und *Fgfr-4* waren, zeigten eine komplette Blockierung der Alveologenese und bildeten folglich keine definitiven Alveolen aus [196].

Im Gegensatz zu den *Pdgf-a*- und *Eln*-Nullmutanten, wurden an diesen Mäusen keine Anomalitäten der Zellpopulation der alveolären Myofibroblasten oder der Elastinsynthese und dessen Ablagerung während der Alveologenese beobachtet. Eine gesteigerte Elastin-Ablagerung wurde in der späteren postnatalen Periode beobachtet (Tag 21), was somit auch auf eine gesteigerte Elastin-Synthese hindeutete.

Die doppelt mutierten Mäuse waren um etwa 50% kleiner als normale Mäuse, waren krank und verstarben innerhalb der ersten fünf Lebensmonate, aber es zeigten sich keine Unterschiede bezüglich der Zellproliferation, des Zelltodes, oder der Produktion der Surfactant-Proteine in ihren Lungen [196].

Der nukleäre Transkriptionsfaktor GATA-6 erwies sich als sehr wichtig für die Entwicklung des Endoderms des Vorderdarms. Eine gezielte Deletion des *Gata-6*-Gens an Mäusen führte zu einer Störung der Entwicklung des Vorderdarms und seiner Derivate, also auch der Lunge (siehe **Tabelle 3**) [117,197].

GATA-6 nimmt auch Einfluss auf die Genexpression in der Lunge. So verstärkt GATA-6 die Transkription von *TTF1*, sowie auch jene von *SP-A* und *SP-C* [198,199].

Die lungenspezifische Expression des dominant negativen Gata-6-Engrailed²⁴⁷-Fusionsproteins an transgenen Mäusen hemmte, wie von Yang und Kollegen berichtet, die Reifung des Alveolarepithels während der alveolären und sakkulären Phase [200]. Die transgenen Mäuse zeigten einen Mangel an Alveolarepithelzellen vom Typ I, was sich in einer reduzierten Expression der Typ I-Marker Aquaporin-5 und T1 α manifestierte.

Obwohl die distalen Luftwege erweitert waren, war die squamöse Differenzierung des Alveolarepithels gestört. Stattdessen waren die distalen Luftwege mit kubischen Alveolarepithelzellen vom Typ II ausgekleidet. Die alveolaren Septen waren verdickt und

²⁴⁵ alveolären Säckchen

²⁴⁶ *Fibroblast growth factor-receptor 3*

²⁴⁷ *Engrailed* stellt einen Transkriptionsfaktor dar

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

zeigten ein relativ unterentwickeltes Gefäßnetzwerk. Die Expression von Sp-b, Sp-c, Ccsp²⁴⁸ und Foxj1 war hierbei ebenfalls reduziert [200].

Tabelle 3: Übersicht über Transkriptions- und Wachstumsfaktoren, die die Lungenentwicklung regulieren. Quelle: Van Tuyl *et al.* [197]

Auswachsen des Vorderdarmes	Bildung der primären Bronchien	Morphogenese des Branchings	Alveolarisierung
Foxa2	Fgfl0	Shh	Pdgf-a
Gli2/Gli3	Fgfr-IIIb	Gli2	Pdgfr- α
		Ra	Ra
		Rar	Rar/Rxr
		Hox	Fgfr3/4
		Ttfl	Ttfl
		Gata-6	
		N-myc	
		Fgf -1, -7, -9, -10	
		Tgf- β (1 und 3)	

1.7. Anormale Entwicklung der Lunge und der leitenden Luftwege

Die meisten Fehlbildungen der Lunge entstehen in der embryonalen und pseudoglandulären Phase. Diese Malformationen zeigen ein Spektrum von eng miteinander verbundenen Anomalitäten, die mit der Bildung der Lungenknospen, der Morphogenese der Verzweigung, der Separation der Trachea vom Ösophagus und Verschlussdefekten der pleuro-peritonealen Höhle assoziiert sind [9].

Anomalien anderer Organsysteme, wie renale Agenesie, Nierendysplasie oder CDH, können im frühen Stadium der Lungenentwicklung ebenfalls die Morphogenese der Verzweigung beeinträchtigen. Während der kanalikulären und sakkulären Stadien der Lungenentwicklung dominieren die Anomalitäten des Wachstums und der Reifung des respiratorischen Parenchyms und der Gefäße, was zu Störungen der Entwicklung der Azini, Dysplasie der Lungenkapillaren, pulmonaler Hypoplasie und respiratorischer Insuffizienz führen kann.

Frühgeborene Kinder, die während der frühen alveolären oder sakkulären Phase geboren werden, zeigen klinische Symptome und Komplikationen, die in erster Linie auf die mangelnde biochemische Reife der Lunge, oder auf den Mangel an Surfactant zurückzuführen sind. Der Mangel an Surfactant führt zum RDS in der postnatalen Periode und wird mit der Entstehung hyaliner Membranen in der Lunge in Verbindung gebracht.

Eine akute Schädigung der Lunge in der neonatalen Periode kann das anschließende Wachstum und die Differenzierung der Alveolen verändern, was wiederum die Entstehung einer bronchopulmonalen Dysplasie oder einer chronischen interstitiellen Lungenerkrankung fördert [9]. Mutationen des *SP-B*-Gens sind mit dem RDS assoziiert

²⁴⁸ *Clara cell secretory protein*

[49,50], wo hingegen solche des *SP-C*-Gens innerhalb der ersten Lebensjahre zu chronischer, interstitieller Lungenerkrankung führen [201].

1.7.1. Die tracheo-ösophageale Fistel

Die meisten Fehlbildungen des tracheo-bronchialen Baumes entstehen während der Bildung des respiratorischen Divertikulums und der Morphogenese der Verzweigung. Eines der kritischsten Ereignisse stellt hier die Unterteilung des primitiven Vorderdarms in den *respiratorischen*²⁴⁹ und *alimentären*²⁵⁰ Trakt dar. Dieser Prozess beginnt während der dritten und wird in der sechsten SSW beendet. Störungen dieses Prozesses führen zur Entstehung der TEF²⁵¹. Gewöhnlich werden diese Fisteln gemeinsam mit verschiedenen Formen der ösophagealen Atresie vorgefunden.

Die häufigste Kombination stellt eine Ösophagusatresie mit einer distalen tracheo-ösophagealen Fistel dar: das obere Segment des Ösophagus endet dabei blind, während das untere Segment von der Trachea, knapp oberhalb der Bifurkation, entspringt. Diese Kombination tritt in etwa 80 bis 90% aller Fälle auf. Die TEF, die gemeinsam mit geringem Geburtsgewicht vorkommt, ist häufig mit anderen Malformationen assoziiert und zeigt eine schlechte Prognose. Im Vergleich dazu, beträgt das Überleben bei Neugeborenen mit isolierter TEF nahezu 100% [9,202].

Die TEF kommt auch beim *VACTERL-Syndrom*²⁵² vor, das zusätzlich auch vertebrale Anomalien, Analatresie, kongenitale Herzfehler, Nieren- und Extremitäten-Fehlbildungen aufweist [202].

Weibel *et al.* beobachteten, dass Defekte des Shh-Signalwegs an Mäusen zu einer Reihe von Fehlbildungen führten, die dem VACTERL-Syndrom des Menschen sehr ähnlich waren. Diese Forschergruppe folgerte daraus, dass Störungen des SHH-Signalwegs während der menschlichen Embryogenese für die Entstehung des VACTERL-Syndroms verursachend sein könnten [203,204].

Es scheint eine beachtliche Reihe von Signalmechanismen in die Entstehung einer TEF involviert zu sein.

Zu diesen Signalen gehören: *Fgf10*, *Shh*, *Foxf1*, *Gli2*, *Gli3*, die *Rars* und *Ttf1*.

Mäuse mit einem Mangel dieser Faktoren, zeigen eine große Bandbreite von tracheo-ösophagealen Defekten. An Mäusen mit der genetischen Konstellation *Fgf10*^{-/-}, ließen sich Defekte der Separation der Trachea und des Ösophagus, sowie eine blind-endende Trachea erkennen. Mäuse der Konstellation *Shh*^{-/-}, prägten einen Defekt des tracheo-ösophagealen Septums aus. Mäuse, die Mutationen vom Typ *Foxf1*^{+/-} aufwiesen, wiesen eine Verengung der Trachea und des Ösophagus mit einer Ösophagusatresie und einer fistelartigen Verbindung zwischen Ösophagus und Trachea auf. Mäuse, die die Mutation *Gli2*^{-/-} trugen, zeigten Defekte der Separation des Ösophagus und der Trachea, die fallweise auch mit dem Auftreten von Stenosen dieser Strukturen kombiniert waren.

Jene Mäuse der genetischen Konstellation *Gli2*^{-/-} und *Gli3*^{-/-} entwickelten keinen Ösophagus, keine Trachea und auch keine Lunge, wo hingegen Mäuse der Konstellation *Gli2*^{-/-} und *Gli3*^{+/-} einen einzelnen trachealen Schlauch mit Verbindung zum Magen und eine Ösophagusatresie aufwiesen [9,185].

²⁴⁹ der Atmung dienend

²⁵⁰ der Ernährung dienend

²⁵¹ tracheo-ösophageale Fistel

²⁵² Kombination von Fehlbildungen des Neugeborenen. Es setzt sich aus vertebrealen, analen, cardialen, trachealen, ösophagealen, renalen und Extremitäten-Fehlbildungen zusammen (1).

An *Rar- α -/-*; *Rar- β 2-/-* und *Rar- α 1-/-*; *Rar- β -/-* Mäusen ließen sich tracheo-ösophageale Septumdefekte und Fehlbildungen des trachealen Knorpels beobachten, während *Ttf1-/-* Mäuse einen tracheo-ösophagealen Septumdefekt ausprägten [9]. Die Beobachtungen von Mäusen mit Mutationen von *Shh* und *Gli* deuten darauf hin, dass der Shh-Signalweg eine Hauptrolle bei der Entstehung der TEF spielen könnte. Tatsächlich führte eine Störung des Signalwegs von Shh zum Auftreten kongenitaler Syndrome mit TEF und einer Atresie des Ösophagus und der Trachea [185].

Andere Studien, die sich auf das *Adriamycin*²⁵³-Rattenmodell bezogen, zeigten einen defekten Fgf-Signalweg, der zum Auftreten einer TEF und einer Ösophagusatresie führte. Hierbei war ein Fehlen von *Fgf1*, *Fgf7* und ihres Rezeptor *Fgfr2-IIIb* zu bemerken [205].

Das Zusetzen von FGF1 zu kulturellen Zellen aus Lungenknospen von Adriamycin-behandelten Rattenfetten, führte zum Auftreten von Verzweigungsvorgängen, aber diese Lungenknospen antworteten nicht auf die Behandlung mit FGF7 oder FGF10. Letzteres war offensichtlich auf den Mangel ihres gemeinsamen Rezeptors, *FGFr2-IIIb*, zurückzuführen [206].

Am Menschen zeigten TEF-Samples ein Fehlen des SHH-Signalwegs in der sich entwickelnden Fistel. Allerdings wurden TTF1 und FOXa2 im Fistelgewebe exprimiert, was darauf hindeutete, dass sie von respiratorischen Präkursoren abstammen könnten [185].

1.7.2. Tracheale Agenesie, tracheale Stenose und Tracheomalazie

Die tracheale Agenesie ist eine seltene, aber fatale Anomalie, die durch Störungen der Entwicklung des tracheo-ösophagealen Septums verursacht wird. Die häufigste Form stellt das komplette Fehlen der Trachea unterhalb des Larynx, mit einer Fistel, die die fusionierten Hauptstamm-Bronchi mit dem Ösophagus verbindet, dar. Andere Variationen zeigen: eine tracheale Agenesie mit Fisteln, die jeden Hauptstamm-Bronchus mit dem Ösophagus verbinden; eine Agenesie der proximalen Trachea und Formung der distalen Trachea durch fusionierte Hauptstamm-Bronchi (mit oder ohne Fistel zum Ösophagus) und ein kurzes Segment trachealer Agenesie zwischen den proximalen und distalen Segmenten der Trachea, die durch ein fibröses Band miteinander verbunden sind [207].

Die *tracheale Stenose* ist eine seltene Malformation, die sich als Verengung der Trachea darstellt. Sie kann entweder durch eine Anomalität der Knorpelbildung, oder durch eine externe Kompression durch anormale Gefäßbildung oder vaskuläre Ringe bedingt sein.

Die Kompression der Trachea führt zu lokaler Obstruktion der Luftwege, wo hingegen der Defekt der Knorpelbildung Obstruktionen sowohl bei Inspiration, als auch bei Expiration, hervorrufen kann. Die häufigsten Gründe für eine tracheale Stenose sind Störungen der Bildung der ringförmigen Knorpel, entweder durch die Fusion der posterioren, C-förmigen Ringe, oder durch Bildung einer kompletten knorpeligen Manschette [9,207].

Letztere Fehlbildung wurde vermehrt an Kindern mit *Cranio-Synostose-Syndromen*, wie dem *Crouzon*²⁵⁴-, *Apert*- und *Pfeiffer*²⁵⁵-*Syndrom*, gefunden (Erklärung: siehe **Kapitel 1.6**) [115, 116].

²⁵³ *Doxorubicin* (syn.) ist ein Fermentationsprodukt von *Streptomyces peuceticus* mit antineoplastischen und zytostatischen Eigenschaften. Verwendung findet es z. B. bei Leukämie und Mammakarzinom (1).

²⁵⁴ *Dysostosis craniofacialis* (1)

²⁵⁵ *Akrocephalosyndaktylie-Syndrom* (1)

Diese Syndrome zeigen auch anormale Fusionen der skelettalen Strukturen und sind mit Mutationen des *FGFR2* assoziiert. Es handelt sich hierbei um mesenchymale Defekte, bei welchen die Zellen nicht auf den normalen FGF-Signalweg antworten [208].

Eine externe Stenose der Trachea wird durch äußere Kompression verursacht und ist häufig mit anormal situierten Blutgefäßen vergesellschaftet [9].

Die *Tracheomalazie* wird durch ein Fehlen oder eine Erweichung der knorpeligen Ringe hervorgerufen, was zum Kollaps der Trachea und zur Bildung einer Obstruktion führt.

In der normalen Trachea beträgt das Verhältnis zwischen Knorpel- und Weichgewebe 4,5:1, ein Verhältnis, das während der Kindheit konstant bleibt. Bei der *Tracheomalazie* zeigt sich eine Reduktion dieses Verhältnisses, in manchen Fällen sogar bis auf Werte von 2:1. Diese Malformation kann segmental oder diffus auftreten. In den meisten Fällen ist die *Tracheomalazie* wie bereits gesagt mit anderen Fehlbildungen, wie der TEF und vaskulären Ringen assoziiert [9,207].

1.7.3. Bronchiale Atresie, bronchiale Stenose und Bronchomalazie

Die bronchiale Atresie ist eine seltene Anomalie. Die häufigste Form betrifft den linken oberen Lappen der Lunge, aber auch Atresien des rechten oberen und der unteren Lappen wurden beschrieben [9].

Die Segmentbronchi sind am häufigsten beteiligt, aber auch die Subsegmentbronchi und die Lappenbronchi sind betroffen. Die distale Lunge ist hypoplastisch, emphysematös oder *hyperinflatiert*²⁵⁶. Häufig zeigen die betroffenen Lappen einen Mangel an Bronchien und Gefäßen, sowie auch einen Mangel der Segmentierung und an interlobulären Septen. Wie die tracheale Stenose, so kann auch die bronchiale Stenose intrinsischen Ursprungs sein, oder durch extrinsische Kompression hervorgerufen werden. Die intrinsische Stenose ist selten und normalerweise mit anormaler Knorpelablagerung vergesellschaftet. Die extrinsische Form ist häufig mit kongenitalen Defekten des Herzens assoziiert [207].

Eine Kompression tritt dann auf, wenn die durch pulmonale Hypertension vergrößerten Arterien den linken oberen Lappenbronchus komprimieren. Ein vergrößertes linkes Atrium, eine bronchogene Zyste, oder ein *Teratom*²⁵⁷ können auch zur Kompression des linken Hauptbronchus führen.

Die *Bronchomalazie* wird durch Anomalien des Knorpels verursacht, die für den Kollaps oder die Bronchiektasie des defekten Luftweges während der Atmung verantwortlich sind. Auch die *Bronchomalazie* kann mit anderen Fehlbildungen assoziiert sein, wie beispielsweise mit verschiedenen skelettalen Dysplasien [207].

1.7.4. Die Bronchopulmonale Sequestrierung

Die bronchopulmonale Sequestrierung entwickelt sich als Masse anormalen Lungengewebes, das keinen Kontakt zum tracheobronchialen Baum hat und seine Blutversorgung aus anomalen systemischen Arterien, die aus der Aorta entspringen, erhält [207,209].

Es sind zwei Formen dieser Sequestrierung bekannt [9]:

Die *intralobäre Sequestrierung* wird am häufigsten im postero-basalen Segment des linken unteren Lappens gefunden. Die Blutversorgung kommt entweder aus der thorakalen, oder

²⁵⁶ überbläht

²⁵⁷ Ein *Teratom* ist ein von *pluripotenten Zellen* gebildeter und daher aus verschiedenen Geweben zusammengesetzter Tumor (1).

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

der abdominalen Aorta, während der venöse Abfluss zur pulmonalen Vene des betroffenen Segmentes erfolgt.

Es scheint ein Versagen der pulmonalen Arterie in Bezug auf die Versorgung eines peripheren Bereiches der Lunge vorzuliegen. Stattdessen wird die arterielle Blutversorgung von einem persistierenden²⁵⁸ ventralen Ast der primitiven dorsalen Aorta übernommen. Mindestens die Hälfte der Patienten ist bei Diagnosestellung 20 Jahre alt. Klinisch präsentieren sich diese Patienten mit rezidivierenden pulmonalen Infekten oder auch Brustschmerzen. Das betroffene Gewebe ist häufig zystisch, mit hochprismatischem oder kubischem Epithel ausgekleidet und mit *Mucus*²⁵⁹ gefüllt. Diese Schleimansammlung ist häufig der Ausgangspunkt für akute und chronische Infektionen der Lunge [9].

Die *extralobäre Sequestrierung* entwickelt sich in Form eines kompletten separaten Segments pulmonalen Gewebes oder als akzessorischer Lappen, der in seinem eigenen *pleuralen Sack*²⁶⁰ eingeschlossen ist. Der embryologische Ursprung dieser Malformation ist nicht bekannt. Sie könnte sich aus einer, dem primitiven Darm entstammenden, separaten, distal gelegenen Lungenknospe entwickeln, die sich dann abgrenzt. Die extralobäre Sequestrierung tritt häufig im Bereich des unteren linksseitigen Thorax auf, häufig zwischen dem linken Unterlappen und dem Zwerchfell [9].

Die Sequestrierung kommt auch *extrapulmonal*, in der präösophagealen, mediastinalen oder parakardialen Region vor [9].

Die extralobäre Sequestrierung kann auch im muskulären Anteil des Diaphragmas und unterhalb des Diaphragmas im *Retroperitoneum* vorkommen. Die arterielle Versorgung nimmt ihren Ursprung aus der abdominalen Aorta oder ihren Ästen, während die venöse Drainage in das systemische venöse System erfolgt, was zu der Entstehung eines Links-Rechts-Shunts führt [9].

In mehr als der Hälfte der Fälle treten zusätzliche kongenitale Fehlbildungen, wie beispielsweise Zwerchfelldefekte, auf. Die extralobäre Sequestrierung ist häufig asymptomatisch und wird oft zufällig, während der Reparatur eines Zwerchfelldefektes, bemerkt. Wenn sich die Sequestrierung in der Wand des Ösophagus befindet, kann sie eine *Dysphagie*²⁶¹ und *Hämatemesis*²⁶² hervorrufen [9].

Die Lokalisation der Sequestrierung im Bereich des Mediastinums oder der *Hili*²⁶³ der Lunge, kann durch bronchiale Obstruktion und Lungenüberblähung des Lappens, oder durch Kompression des normalen Lungenparenchyms symptomatisch werden. Wenn der sequestrierte Lappen infiziert wird, kann ein chronischer Lungenabszess entstehen, der von Fieber, Brustschmerzen, Husten und *blutigem Sputum*²⁶⁴ begleitet wird. Die Läsion kann histologisch aus normalem, unreifem oder dysplastischem Lungenparenchym zusammengesetzt sein, mit fehlenden oder reduzierten knorpeligen Bronchien und einem irregulären Muster bronchiolenartiger Strukturen, die an eine *zystisch-adenomatoide Malformation* erinnern [9].

²⁵⁸ anhaltenden

²⁵⁹ Schleim

²⁶⁰ Sack des Lungenfells

²⁶¹ Schluckstörung

²⁶² Erbrechen von Blut (1)

²⁶³ Der *Hilus* ist eine Vertiefung an der Oberfläche eines Organs, wo strangförmig Gefäße, Nerven und Ausführungsgänge ein- bzw. austreten (1).

²⁶⁴ Auswurf, *Expektorat* (1)

1.7.5. Kongenitale bronchogene Zysten

Durch anormales Budding²⁶⁵ und anormale Verzweigung des tracheo-bronchialen Baumes werden bronchogene Zysten gebildet [207].

Die meisten werden in den *paratrachealen*²⁶⁶, *carinalen*²⁶⁷, *hilären* oder *paraösophagealen*²⁶⁸ Regionen gefunden (mittleres Mediastinum), aber sie können auch innerhalb der Lungen als pulmonale Zysten vorkommen, die mit dem tracheo-bronchialen Baum kommunizieren [9].

Bei Neugeborenen kann diese Kommunikation zwischen der Zyste und dem tracheo-bronchialen Baum zur Entstehung eines Ventilmechanismus führen, der eine rasche Expansion der Zyste hervorrufen und diese dadurch so vergrößern kann, dass sie das Mediastinum komprimieren, dabei auch das Herz beengen und somit zum Tod führen kann [9].

Andererseits kommunizieren mediastinale Zysten selten mit dem tracheo-bronchialen Baum. Sie sind häufig von Flimmerepithel ausgekleidet und mit einer klaren serösen Flüssigkeit gefüllt, außer, wenn sie infiziert werden. Die Wände dieser Zysten enthalten gewöhnlich glatte Muskulatur, Knorpel und Schleimdrüsen [9].

1.7.6. Kongenitales Emphysem (Lungenüberblähung, Hyperinflation)

Das kongenitale Lappenemphysem kann in *zwei Typen* unterteilt werden:

die *kongenitale lobäre Lungenüberblähung* und die *regionale* oder *segmentale Lungenüberblähung* [207,209].

Bei der *kongenitalen lobären Lungenüberblähung* handelt es sich um eine, den Ober- oder Mittellappen betreffende Überblähung, die die verbleibende *ipsilaterale*²⁶⁹ Lunge, oder den verbleibenden ipsilateralen Lungenlappen, komprimiert. Wenn ein *Mediastinalshift*²⁷⁰ zur Gegenseite auftritt, kann eine *ventilatorische Krise* mit *Dyspnoe*²⁷¹, *Zyanose*²⁷² und einem Versagen der Zirkulation entstehen. Die meisten Fälle werden durch partielle Obstruktion der Bronchien hervorgerufen [9].

Eine extrinsische bronchiale Obstruktion kann durch dilatierte Lungengefäße und Herzfehler verursacht werden, die zu einem Anstieg des pulmonalen Blutflusses führen.

Intrathorakale Massen, wie bronchogene Zysten, extralobäre Sequestrierung, vergrößerte Lymphknoten und Neoplasien können ebenfalls zu einer Kompression der Bronchien führen [9].

Die intrinsische bronchiale Obstruktion wird meist durch Defekte der bronchialen Knorpel, mit fehlenden oder inkompletten Knorpelringen, hervorgerufen. Diese Bronchien kollabieren während der Expiration und es entsteht dadurch ein distales „air trapping“²⁷³ mit einer Überblähung des betroffenen Lappens. Bei der regionalen oder segmentalen Überblähung ist nur ein kleines Segment der Lunge hyperinflatiert [9].

²⁶⁵ Bildung von Knospen

²⁶⁶ der Trachea benachbart

²⁶⁷ nahe der *Carina* der Trachea

²⁶⁸ der Speiseröhre benachbart

²⁶⁹ gleichseitig

²⁷⁰ Verschiebung des Mediastinums (1)

²⁷¹ Als *Dyspnoe* wird eine als unangenehm empfundene, erschwerte Atemtätigkeit bezeichnet, wobei Ursachen, Wahrnehmung und Folgen dieses Symptoms sehr unterschiedlich sein können (25).

²⁷² Die Ursache einer *Zyanose* ist in der Regel eine Unterversorgung des Blutes mit Sauerstoff, sei es durch zu geringe Aufnahmemöglichkeit, wie bei einer zu geringen Sauerstoffkonzentration in der Atemluft, oder durch zu lange Diffusionsstrecken bei krankhaften Veränderungen der Lunge. Die bläuliche Färbung der Haut und Schleimhäute resultiert aus der sauerstoffabhängigen Färbung des Hämoglobins (26).

²⁷³ Bezeichnung für „gefangene Luft“ in den Bronchien bei COPD oder Asthma bronchiale (27)

1.7.7. Kongenitale Malformationen des distalen Lungenparenchyms

1.7.7.1. Pulmonale Agenesie und Aplasie

Die pulmonale Agenesie und Aplasie stellen zwei verschiedene Formen der gestörten Lungenentwicklung dar, die zu einem Fehlen des distalen Lungenparenchyms führen [9].

Unter der pulmonalen Agenesie versteht man das komplette Fehlen einer oder beider Lungen, inklusive der Bronchi, Bronchioli, Gefäße und des Parenchyms [9].

Bei der pulmonalen Aplasie sind nur rudimentäre Bronchi vorhanden, die alle blind enden. Das respiratorische Parenchym und die Gefäße fehlen. Diese Fehlbildungen sind selten und entstehen durch ein Versagen der Entwicklung der Äste des primitiven Vorderdarms während des frühen embryonalen Stadiums der Lungenentwicklung. Ein Arrest der Entwicklung in einem späteren Stadium führt zu Agenesie der Lappen oder zu pulmonaler Dysplasie. Einige bronchiale Elemente sind vorhanden, aber es fehlen die Alveolen [9].

Die bilaterale pulmonale Agenesie ist sehr selten und wird durch einen Wachstumsarrest des respiratorischen Primordiums während des embryonalen Stadiums der Lungenentwicklung verursacht. In der Literatur finden sich Beschreibungen zu dieser Fehlbildung.

In einem Fall war eine Trachea, bestehend aus zehn knorpeligen Ringen, über die gesamte Länge mit dem Ösophagus verbunden. Die Lungenknospen und die Pleurahöhlen fehlten [9,207].

Die einseitige pulmonale Agenesie tritt häufiger auf, als die bilaterale Form. Sie könnte eine Störung der Balance im Wachstum der Lungenknospen darstellen. Wenn kein balanciertes Wachstum zwischen der rechten und der linken Lungenknospe möglich ist, wird sich eine Seite normal entwickeln, während die andere im Wachstum komplett versagen (*Aplasie*), oder sich nur beschränkt entwickeln wird (*Dysplasie* oder *Hypoplasie*). Diese Defekte entstehen früh während der Lungenentwicklung²⁷⁴, wenn das respiratorische Primordium sich in eine linke und rechte primitive Lungenknospe teilt. Diese Malformationen kommen durch ein Fehlen oder eine gestörte Balance der Zahl der *Progenitorzellen*²⁷⁵ der zwei primitiven Lungenknospen zustande und führen zu unterschiedlichem Wachstum oder Wachstumsarrest der Lungenentwicklung. Die unilaterale pulmonale Agenesie kann beide Lungen betreffen, auch wenn die rechte Seite häufiger betroffen ist [9].

Normalerweise führen kompensatorisches Wachstum oder eine Hyperplasie der kontralateralen Lunge zu keinen ernsten klinischen Konsequenzen. Die Agenesie der Lunge ist normalerweise mit anderen Anomalien, wie trachealer Stenose, Ösophagusatresie, TEF, bronchogenen Zysten, *Fallot-Tetralogie*²⁷⁶ und Anomalien der großen Gefäße assoziiert [207].

1.7.7.2. Pulmonale Hypoplasie

Die pulmonale Hypoplasie entwickelt sich als Resultat anderer Anomalitäten des sich entwickelnden Fetus. Sie tritt bei Kindern mit renaler Agenesie oder Dysplasie, Harnwegsobstruktionen, Verlust amniotischer Flüssigkeit durch prämatüre Ruptur der Membranen, Zwerchfellhernie, kongenitalen Anomalien des neuromuskulären Systems und chromosomalen Anomalien, wie den Trisomien 13, 18 und 21, auf [207].

²⁷⁴ am Ende der vierten SSW

²⁷⁵ Vorläuferzellen

²⁷⁶ Die *Fallot-Tetralogie* ist eine angeborene Herzfehlbildung mit *Pulmonalstenose*, *Ventrikelseptumdefekt (VSD)*, einer über dem VSD *reitenden Aorta* und *Rechtsherzhypertrophie* (1).

Viele dieser Anomalitäten reduzieren das Volumen der Pleurahöhle und schränken damit das Wachstum und die Ausdehnung der peripheren Lunge ein.

Bei der *kongenitalen diaphragmatischen Hernie* (CDH) (**siehe Kapitel 1.8**) schließt sich die pleuroperitoneale Höhle nicht. Dies erlaubt den sich entwickelnden Baueingeweiden ein Vorwölben in die Pleurahöhle und dadurch wird das Lungenwachstum durch Kompression und Beengung gehemmt.

Auf der linken Seite des Zwerchfells kommt dies häufiger vor, als auf der rechten Seite, vermutlich, weil der linke *pleuro-peritoneale Kanal* größer ist und sich später verschließt, als der rechte.

Der Schweregrad der sich entwickelnden pulmonalen Hypoplasie differiert und hängt vom Zeitpunkt des Anfangs der Kompression der Lunge ab. Bei früher und schwerer Kompression kommt es zu schwerer Hypoplasie. Diese wird von einer Reduktion der Alveolenzahl und Alveolengröße, einer reduzierten Gasaustauschoberfläche und einer proportionalen Abnahme der pulmonalen Gefäße begleitet. Häufig findet man auch Anzeichen einer pulmonalen Hypertension, verursacht durch eine Zunahme der muskulären Arterien in der Peripherie der Lunge, die zu einer Zunahme des pulmonalen Gefäßwiderstandes führt. Ein Oligohydramnion oder eine unzureichende Menge amniotischer Flüssigkeit kann ebenfalls eine pulmonale Hypoplasie auslösen, weil dadurch die Wand des Uterus den fetalen Thorax komprimieren kann.

Ab der 16. SSW trägt die fetale Niere zur Bildung einer Fraktion des fetalen Fruchtwassers bei. Deshalb führt eine renale Agenesie, oder eine andere Ursache für eine Reduktion der fetalen Urinabgabe, zur Entstehung eines Oligohydramnions²⁷⁷ und später zu einer Lungenhypoplasie. Auch eine Ruptur der amniotischen Membranen und die daraus resultierende Reduktion des Fruchtwassers sind mit einer Lungenhypoplasie assoziiert [9,207].

1.7.7.3. Pulmonale Hyperplasie

Die pulmonale Hyperplasie ist ein wesentlich weniger häufiges Phänomen, als die pulmonale Hypoplasie, aber die betroffenen Neugeborenen zeigen eine hohe Morbidität und Mortalität. Der häufigste Initiator einer pulmonalen Hyperplasie ist die tracheale Obstruktion, die zu einem deutlich übersteigerten Wachstum der Lunge führt [185].

Die Pathogenese dieses übersteigerten Wachstums ist noch nicht ausreichend bekannt, sie wird allerdings vermutlich durch kompliziertere Faktoren, als nur durch die Unmöglichkeit des Abflusses der Lungenflüssigkeit aus der Lunge, bedingt [185].

In einer Studie an fetalen Schafen demonstrierten Moessinger *et al.* [80], dass eine Drainage der rechten Lunge, durch den daraus resultierenden Abfluss der Lungenflüssigkeit, zu einer Reduktion des rechten Lungenvolumens führte, während das Volumen der linken Lunge, nach Ligatur des linken Hauptstammbronchus, und die dadurch hervorgerufene Flüssigkeitsretention, deutlich gesteigert war. Durch diese Prozedur entstanden eine unilaterale²⁷⁸ pulmonale Hyperplasie und eine kontralaterale pulmonale Hypoplasie. Interessanterweise zeigten sich im Vergleich der hypoplastischen, hyperplastischen Lungen und Lungen der Kontrollgruppe keine Unterschiede bezüglich der biochemischen Indizes der Lungenreife, wie dem totalen *Phospholipidgehalt* und dem *gesättigten* und *ungesättigten Phosphatidylcholin-Gehalt* pro Unit der Gewebe-DNA. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Proliferation der fetalen Lungenzellen durch

²⁷⁷ Fruchtwassermangel (1)

²⁷⁸ einseitig

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

eine lokale Dehnung über die Lungenflüssigkeit, aber die Reifung des Alveolarepithels durch eine systemische Kontrolle reguliert wird [185].

Die *tracheale Obstruktion* wurde sowohl am Menschen [210], als auch am Tier [211] als mögliche *antenatale*²⁷⁹ Therapieform der CDH untersucht.

Die Lungen von Patienten mit einer CDH, die diese fetale Behandlung erhielten, zeigten sonographisch²⁸⁰ eine Vergrößerung, aber histologisch eine geringere Anzahl an Alveolen bei gesteigerter Alveolengröße [185]. Flecknoe *et al.* beobachteten bei einer prolongierten trachealen Okklusion einen fast vollständigen Verlust der Typ II-Alveolarepithelzellen und folglich einen Verlust der Surfactant-Produktion [212].

Am Tiermodell konnte allerdings durch eine Entfernung des zuvor operativ angebrachten *trachealen Clips*²⁸¹, eine Woche vor dem Geburtstermin, eine Umkehrung des zuletzt genannten Effektes auf die Typ II-Alveolarepithelzellen erreicht werden [213].

Allerdings besteht bei der Entfernung des Clips ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Frühgeburten und Infektionen. Um dieses Risiko zu reduzieren, wurden der Mutter Corticosteroide injiziert und gemeinsam mit der Entfernung des Clips, zwei Tage vor der Geburt, kam es, wie im wissenschaftlichen Bericht von Kay und Kollegen nachzulesen ist, zu einer fast kompletten Erholung der Zahl der Typ-II-Zellen [214].

Am Tiermodell ließ sich eine Hochregulation von Fgf7, nach der Durchführung einer trachealen Okklusion, nachweisen [215]. Lämmer mit einer chirurgisch erzeugten CDH wiesen geringere Igf-1-Levels, als jene der Kontrollgruppe auf. Hier führte die tracheale Okklusion zum Wiederanstieg der Igf-1-Levels auf Normalwerte [216]. Eine tracheale Okklusion am fetalen Lamm mit chirurgisch induzierter CDH führte auch zu einer Hochregulation von Tgf- β 2 [217].

1.7.7.4. Kongenitale Zysten der Lunge

Anders als bronchogene Zysten, stehen bronchioläre Zysten mit den proximalen Anteilen des Bronchialbaumes in Verbindung, sowie auch mit distalen alveolären Ductuli und Alveolen, auch wenn diese Verbindungen klein sind. Die bronchiolären Zysten sind von Flimmerepithel ausgekleidet und können muköse Drüsen, glatte Muskulatur und Knorpel in ihren Wänden aufweisen. Diese Zysten kommen normalerweise multipel vor und sind auf einen einzelnen Lappen beschränkt. Sie können mit Luft, Flüssigkeit oder beidem gefüllt sein. Alveoläre Zysten sind von kubischem Epithel oder Plattenepithel ausgekleidet. In der Wand findet man keinen Knorpel und keine Muskulatur, aber es kann eine Hyperplasie des Bindegewebes vorhanden sein.

Beide Arten von Zysten betreffen eher die rechte, als die linke Lunge und die Unterlappen häufiger als die Oberlappen. Kongenitale Lungenzysten sind oft nur schwer von erworbenen Zysten zu unterscheiden [9,207].

1.7.7.5. Kongenitale zystisch-adenomatoide Malformation (CCAM)

CCAMs findet man häufig in Lungen von Kindern, die Anzeichen von Unreife und Malformationen der kleinen Luftwege und des distalen Lungenparenchyms aufweisen [209].

Es existieren fünf Typen von CCAMs, die nach dem Erscheinungsbild und den histologischen Gegebenheiten unterteilt werden [9]:

²⁷⁹ vorgeburtlich

²⁸⁰ im Ultraschall-Bild

²⁸¹ Spange, mit der die Trachea operativ abgeklemmt wird

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

- *Typ-0-Läsionen* sind selten und aus 0,5 cm großen, bronchienartigen, zystischen Strukturen mit reichlich Knorpel in den Wänden aufgebaut.
- *Typ-1-Läsionen* sind die häufigsten (über 50% der Fälle) und aus einer oder mehreren großen Zysten zusammengesetzt, die einen Durchmesser von drei bis zehn Zentimetern erreichen. Diese Läsionen enthalten fibröse Septen, die von Zilien-tragenden, kubischen bis hochprismatischen Zellen ausgekleidet werden. Auch Cluster von schleimgefüllten Zellen²⁸² sind darunter. Knorpelige Foci sind in 5 bis 10% dieser Läsionen vorhanden.
- *Typ-2-Läsionen* stellen die zweithäufigsten Läsionen dar und sind durch gleichmäßige uniforme Zysten charakterisiert, die normalerweise weniger als 2 cm Durchmesser aufweisen. Sie sind von kubischen oder Zilien-tragenden Zellen ausgekleidet. Quergestreifte Muskulatur kann in den Septen oder angrenzend an die Zysten vorkommen.
- *Typ-3-Läsionen* sind aus einer soliden Gewebemasse mit multiplen mikroskopischen Zysten aufgebaut, die weniger als 2 cm groß und von kubischem oder Säulenepithel ausgekleidet sind.
- *Typ-4-Läsionen* werden in der peripheren Lunge gefunden und sind durch große (mehr als 7 cm im Durchmesser) dünnwandige Zysten, die von Alveolarepithel ausgekleidet sind, gekennzeichnet.

Die immunhistochemische Untersuchung der Differenzierungsmarker spezifischer Lungenepithelzellen ergab, dass die CCAM-Typen 1, 2 und 3 Cluster von GRP²⁸³-positiven *neuroendokrinen Zellen* und CCSP-positiven Clara-Zellen enthielten, was einen bronchogenen Ursprung dieser Zysten andeutete. Die epitheliale Auskleidung der Zysten der CCAM vom Typ 4 zeigte eine Immunopositivität bezüglich des mit Typ I-Zellen assoziierten Oberflächenantigens und mit den Surfactant-assoziierten Proteinen der Typ II-Zellen, SP-A, SP-B und SP-C. Diese Entdeckungen deuten darauf hin, dass die CCAM-Typen 1, 2 und 3 während der pseudoglandulären Phase der Morphogenese der Verzweigung entstehen, während der CCAM-Typ 1 in der kanalikulären oder sakkulären Phase seinen Ursprung nimmt [9,218].

1.7.7.6. Dysplasie der alveolären Kapillaren

Die Dysplasie der alveolären Kapillaren, mit Falschausrichtung der Lungenvenen, ist durch eine inadäquate Vaskularisierung des alveolären Parenchyms charakterisiert, was zu einer Reduktion der Zahl der Kapillaren in der Wand der Alveolen führt. Zusätzlich kommt es zu einer Malformation der pulmonalen Lappen, die Lungenvenen sind disloziert oder falsch ausgerichtet und sie verlaufen mit den Lungenarterien innerhalb des peribronchiolären Bindegewebes, anstelle des normalen Verlaufes in den interlobulären Septen. Diese Konstellation führt zu pulmonaler Hypertension beim Neugeborenen und hat fatale Folgen [9,209].

²⁸² *Becherzellen*

²⁸³ *Gastrin-releasing-peptide*

1.7.7.7. Kongenitale Lymphangiektasie der Lunge

Die kongenitale pulmonale Lymphangiektasie ist eine äußerst seltene Malformation, bei welcher die Lunge ausgesprochen dilatierte Lymphgefäße aufweist, die sich innerhalb des bronchovaskulären Bindegewebes, entlang der interlobulären Septen und innerhalb der Pleura, befinden. Diese Lymphgefäße sind dünnwandig und werden von Endothelzellen ausgekleidet und bilden ein Netzwerk von kommunizierenden Kanälen.

Diese Malformation ist häufig mit dem Noonan²⁸⁴-, Ulrich-Turner²⁸⁵- und dem Down-Syndrom²⁸⁶ assoziiert. Männer sind häufiger betroffen, als Frauen (2:1) [9].

Die Lymphangiektasie der Lunge kann in drei Hauptkategorien unterteilt werden: die primäre, die sekundäre und die generalisierte Lymphangiektasie [218].

Die primäre Form stellt einen fatalen Entwicklungsdefekt dar, bei welchem die Lymphgefäße der Lunge nicht mit den systemischen Lymphgefäßen kommunizieren. Die betroffenen Kinder zeigen ein RDS und Pleuraergüsse und versterben bereits kurz nach der Geburt [9].

Die sekundäre Lymphangiektasie ist mit kardiovaskulären Malformationen, wie AV-Klappen-Defekt²⁸⁷, Ostium-secundum-Defekt²⁸⁸, pulmonaler Stenose, VSD²⁸⁹, Mitralatresie²⁹⁰, hypoplastischem linken Herz, Cor triatriatum²⁹¹ und Atresie der gemeinsamen pulmonalen Venen assoziiert [207]. Die generalisierte Form zeigt eine Proliferation der lymphatischen Räume und tritt in der Lunge als Teil einer systemischen Malformation auf, bei welcher multiple Lymphangiome²⁹² in den Knochen, Eingeweiden und dem Weichgewebe gefunden werden [9].

1.7.8. Regulation der Alveolarisierung

Das Wachstum der Alveolen bietet eine enorme Oberfläche für den Gasaustausch in der Lunge [219]. Das Blut in den alveolären Kapillaren und die eingeatmete Luft sind durch die dünne Wand der Endothelzellen der Kapillaren, die fusionierte Basalmembran und das attenuierte Zytoplasma der Typ I-Alveolarepithelzellen voneinander getrennt [220]. Das

²⁸⁴ Das Noonan-Syndrom ist ein komplexes Syndrom, das durch eine Vielzahl von genetischen Entwicklungsbesonderheiten gekennzeichnet ist. Die Fehlbildungen können das äußere Erscheinungsbild betreffen, aber auch innere Organe. So sind angeborene Herzfehler typisch. Da die feststellbaren Symptome denen des Ullrich-Turner-Syndroms sehr ähnlich sind, bezeichnet man das Noonan-Syndrom auch als „Pseudo-Turner-Syndrom“. Im Gegensatz zum Ullrich-Turner-Syndrom sind jedoch keine Besonderheiten der Chromosomen (in Bezug auf Anzahl und Struktur) nachweisbar (28).

²⁸⁵ Das Turner-Syndrom, auch unter den Synonymen Ullrich-Turner-Syndrom (UTS) oder Monosomie X bekannt, ist eine Chromosomenbesonderheit, genauer gesagt eine gonosomale Genommutation bzw. gonosomale Monosomie, die von Henry H. Turner 1938 erstmals unter wissenschaftlichen Gesichtspunkten beschrieben wurde. Menschen mit dieser Besonderheit haben nur ein funktionsfähiges X-Chromosom, statt der üblichen zwei X-Chromosomen oder der Kombination aus einem X- und einem Y-Chromosom (Monosomie X) (29).

²⁸⁶ Als Down-Syndrom bezeichnet man ein Syndrom, das durch eine spezielle Genommutation beim Menschen hervorgerufen wird, bei der das gesamte 21. Chromosom, oder Teile davon, dreifach vorliegt bzw. vorliegen (Trisomie). Daher lautet eine weitere übliche Bezeichnung Trisomie 21 (30).

²⁸⁷ Atrio-ventrikulärer Klappendefekt des Herzens (1)

²⁸⁸ Vorhofseptumdefekt vom sekundären Typ (ASD II) (1)

²⁸⁹ Ventrikelseptumdefekt (1)

²⁹⁰ Atresie der Mitralklappe (Bikuspidalklappe)

²⁹¹ Das Cor triatriatum ist eine seltene Herzfehlbildung, bei der der linke Vorhof durch eine fibromuskuläre Membran in einen proximalen und distalen Anteil geteilt wird (1).

²⁹² Lymphangiome sind benigne, aber selten auch maligne-entartete Neubildungen von Lymphkapillaren (1).

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

weitere Wachstum und die Entwicklung des distalen Lungenparenchyms führen zur Ausdünnung der Alveolenwand, zu einem Anstieg der Dichte der Kapillaren und einem mäßigen Anstieg des Durchmessers der Alveolen [221,222].

Die postnatale Bildung der Alveolen ist bei der *BPD*²⁹³, einer Erkrankung bei Frühgeborenen, die durch mechanische Beatmung, Hyperoxie und Entzündungsprozesse entstehen kann, deutlich beeinträchtigt [223,224].

Husain und seine Kollegen [223] beschrieben eine Form der „*new BPD*“ als chronische Lungenerkrankung, die häufig bei Neugeborenen auftritt, die ein sehr geringes Geburtsgewicht aufweisen und mit Surfactant-Ersatztherapie behandelt werden. Diese Form der „*new BPD*“ ist durch eine Verschlechterung der Alveolarisierung charakterisiert [224].

Auch an neugeborenen Pavianen zeigte sich bei Experimenten, dass eine mechanische Beatmung mit erhöhten Sauerstoff-Levels zu einer Verringerung der Zahl der Lungenalveolen und zu einer Zunahme ihrer Größe führte [225]. Es wird angenommen, dass die mechanische Beatmung, oder eine hohe Sauerstoff-Exposition der Lunge im frühen Entwicklungsstadium, zu einer Verschlechterung der Alveolarisierung und zu chronischer Lungenerkrankung führen könnte [226]. Obwohl die Surfactant-Therapie den Einfluss einiger Charakteristika von Lungenschäden (*Fibrose* und Entzündung) verringerte, zeigte sich kein Einfluss auf die Verschlechterung der Alveolarisierung [226].

Bei der Entfernung einer Lunge können sich in der verbleibenden Lunge neue Alveolen bilden [227,228]. In Antwort auf die physiologischen Stimuli, wie Alter, Sauerstoffspannung, hormoneller Status und Ernährung, kann sich die Zahl der Alveolen in der Lunge verändern [229]. Zusätzlich wurde von Massaro *et al.* auch darüber berichtet, dass die Behandlung mit Vitamin-A-Säure die Zahl der Alveolen an neugeborenen und erwachsenen Ratten steigern konnte [230].

1.7.8.1. Struktur der alveolären Wand

Die Wand der Alveolen setzt sich aus einem Kern von Bindegewebe zusammen, in welchem viele Gefäße verlaufen [220]. Das Gefäßnetzwerk in den Alveolen der Lunge ist vermutlich das Größte im menschlichen Körper. Die Zellen in der alveolären Wand produzieren eine extrazelluläre Matrix, die relativ reich an Elastin und Kollagen ist und *Proteoglykane* und *Glykosaminoglykane* enthält [231]. Die Oberfläche dieser Wand wird von zwei Typen von Epithelzellen ausgekleidet, den *Alveolarepithelzellen vom Typ I* und *II* [232].

Die *Typ I-Zellen* sind stark attenuierte squamöse Zellen, deren Zytoplasma einen Teil der Gasaustauschbarriere darstellt. Etwa 90% der alveolären Oberfläche werden von Alveolarepithelzellen vom Typ I ausgekleidet [233]. Die *Typ II-Zellen* sind kubische sekretorische Zellen, die häufig in den Ecken eines Alveolus lokalisiert sind und den Surfactant, eine Lipoprotein-Substanz, die die Oberflächenspannung in den Alveolen reduziert und eine wichtige Rolle bei Abwehrmechanismen der Lunge spielt, bilden [234]. Obwohl die Alveolarepithelzellen vom Typ II nur einen kleinen Anteil der alveolären Oberfläche auskleiden, sind annähernd gleiche Zahlen von Zellen vom Typ I und Typ II in den Alveolen vorhanden [234].

²⁹³ bronchopulmonalen Dysplasie

1.7.8.2. Bildung von Alveolen in der sich entwickelnden Lunge

Beim Menschen bilden sich einige Alveolen (etwa 20%) vor der Geburt, aber die meisten erst danach [221]. Laut Studien werden die meisten menschlichen Alveolen innerhalb der ersten 18 Lebensmonate gebildet [235,236]. Die meisten Erkenntnisse bezüglich der Bildung von Alveolen stammen von Studien an Nagetieren, vor allem an Ratten und Mäusen [229].

In diesen Spezies tritt die Bildung der Alveolen während der ersten beiden Wochen des postnatalen Lebens auf [229].

Frühgeborene Kinder, die mit strukturell unreifen Lungen zur Welt kommen (zwischen der 24. und 28. Woche) können immer noch ausreichend atmen, um ihre Lebensfähigkeit dadurch sicherzustellen [226]. Bei Meerschweinchen, Kühen, Schafen und Schweinen vollzieht sich fast die gesamte Alveolarisierung *in utero* [229]. Bei Nagern, wie Ratten oder Mäusen, werden die Alveolen während der ersten Wochen nach der Geburt gebildet [237].

Während der Entwicklung erhöht die Bildung der Alveolen die pulmonale Gasaustauschoberfläche proportional zum Wachstum des gesamten Organismus. Die Mechanismen, durch welche dieses proportionale Wachstum reguliert wird, sind noch nicht ausreichend bekannt [229].

Am Ende der menschlichen Schwangerschaft, sowie postnatal bei Ratten und Mäusen, formen die terminalen Sacculi durch eine Septierung die echten, zukünftigen Alveolen [229]. Das luftleitende System endet auf dem Level der *Bronchioli respiratorii*, die durch das Auftreten von Alveolen, die die Wand der Luftwege unterbrechen, charakterisiert sind [204]. Das Epithel der *Bronchioli respiratorii* ist proximal säulenartig und zeigt Übergänge zum typischen Alveolarepithel, das die *Ductuli alveolares*, *alveolären Sacculi* und *Alveolen* auskleidet. Die gesamte funktionelle Einheit (der *respiratorische Azinus*) besteht, der Reihe nach, aus einer *respiratorischen Bronchiole* (mehrere Reihen sind möglich), den *Ductuli alveolares* (auch hier sind mehrere Reihen oder Äste möglich) und den *alveolären Sacculi* [204].

Die *Ductuli alveolares* können einen großen Teil des Gasaustauschgewebes der Lunge enthalten, in manchen Spezies sogar bis zu 30% [238]. Die Alveolen verzweigen sich aus den *alveolären Ductuli*, entweder einzeln oder als Cluster *alveolärer Sacculi*, die das Ende der *Ductuli alveolares* darstellen. Alveolen sind auf jedem Level des *respiratorischen Azinus*, der *respiratorischen Bronchiole*, des *alveolären Ductus* oder des *alveolären Sacculus* vorhanden. Man nimmt an, dass all diese Alveolen funktionell gleichwertig sind [203].

In der pränatalen menschlichen Lunge und der postnatalen Lunge der Maus bilden sich die Alveolen durch die Entstehung von sekundären Septen, die sich aus der Wand der terminalen Sacculi bilden [229]. Die sekundären Septen werden in den Bereich der Sacculi erweitert.

Das Wachstum der sekundären Septen in das Lumen der terminalen Sacculi wird, zumindest teilweise, durch die Proliferation der Fibroblasten mediiert [239]. Eine Untergruppe der interstitiellen Fibroblasten ist durch das Vorkommen zytoplasmatischer *Lipid-Droplets*²⁹⁴ charakterisiert [240]. Die Funktion dieser Zellen ist nicht vollständig bekannt, aber sie spielen möglicherweise eine wichtige Rolle in der Morphogenese der Alveolenwand [240].

²⁹⁴ Einlagerungen von Lipiden

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

An der Spitze der sekundären Septen befindet sich der *Myofibroblast*, ein Zelltyp, der Elastin und andere wichtige Komponenten der extrazellulären Matrix in der alveolären Wand bildet und abgelagert [241].

Der bindegewebige Kern der sekundären alveolären Septen ist durch das Vorkommen von Elastin, das vermutlich durch Myofibroblasten dort abgelagert wird, charakterisiert [242]. Die Elastin-Fasern sind auf eine, einer Ordnung folgenden und vorhersagbaren Weise, innerhalb der alveolären Septen angeordnet [243]. Die Genexpression von Elastin zeigt während der Periode der postnatalen Alveolarisierung einen *Peak*²⁹⁵ [244].

Die Vernetzung der Elastin-Monomere ist ein kritischer Prozess der Alveolarisierung, denn eine Hemmung dieses Prozesses führt zu einer reduzierten Oberfläche der Lunge [245]. Die Ablagerung von Elastin-Fasern bezieht auch die koordinierte Expression von Fibrillin²⁹⁶, Fibulin²⁹⁷, und der Glycoproteine der Mikrofibrillen mit ein [242].

Zusätzlich werden die Kollagene vom Typ I, III und IX von Zellen des Bindegewebes produziert und in der Wand der Alveolen während der Bildung der sekundären Septen abgelagert, wo sie mechanische Festigkeit bewirken [16].

Glykosaminoglykane, wie *Hyaluronsäure*, *Chondroitinsulfat*, und *Heparinsulfat* sind in der Wand der Alveolen ebenfalls vorhanden und tragen zu deren mechanischer Eigenschaft bei [246]. Proteoglykane, adhäsive Glykoproteine wie Fibronectin und Komponenten der Basallamina wie Laminin und Typ IV-Kollagen, werden ebenfalls in regulierter Weise während der Alveolarisierung gebildet und abgelagert [247].

1.7.8.3. Regulation der Alveolarisierung

Der Prozess der Alveolarisierung beinhaltet die Entstehung eines pulmonalen Gefäßbettes in der distalen Lunge, das sich im Zusammenspiel mit der Differenzierung des Alveolarepithels und der Bildung der sekundären Septen bilden muss. Das Wachstum und die Differenzierung der pulmonalen Gefäße beginnen in der fetalen Lunge gleichzeitig mit dem kanalikulären und sakkulären Stadium der Lungenentwicklung [248]. Anfänglich gehören die Kapillaren in den Wänden der Alveolen einem doppelten System an. Dies bedeutet, dass jeweils eine Kapillare mit jeder Oberfläche des sich bildenden Septums der Alveole assoziiert ist. Mit Fortschreiten der Alveolarisierung werden die alveolären Wände dünner und es bildet sich innerhalb der Wand ein einzelnes kapilläres System, das sehr oberflächlich in der Wand der Alveole zu liegen kommt [249].

Der VEGF²⁹⁸ übt eine mitogene Wirkung auf die Endothelzellen aus. Dieser Faktor stimuliert die *Angio-* und *Vasculogenese* und reguliert die Permeabilität des Endothels.

VEGF bindet an mindestens zwei Rezeptoren: Flk-1²⁹⁹ und Flt-1³⁰⁰.

VEGF und seine Rezeptoren werden in koordinierter Weise in der sich entwickelnden Lunge exprimiert und erreichen ihre Peaks am Ende der Schwangerschaft und während des frühen neonatalen Lebens.

Es existieren mehrere Isoformen des VEGF mit unterschiedlichen Molekulargewichten und VEGF 188 ist in der fetalen Lunge davon der dominierende Faktor [250,251].

²⁹⁵ Anstieg bis zu einem Spitzenwert

²⁹⁶ Fibrillin ist ein Glykoprotein, das essentiell für die Bildung elastischer Fasern ist (31).

²⁹⁷ Fibulin-1 ist ein Calcium-bindendes Glycoprotein (32).

²⁹⁸ *Vascular endothelial growth factor*

²⁹⁹ *VEGF-Rezeptor 2*

³⁰⁰ *VEGF-Rezeptor 1*

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Transgene Mäuse, die eine Überexpression von Vegf in den Alveolarepithelzellen aufweisen, zeigen eine gestörte Lungenentwicklung in Form einer gestörten Verzweigungs-Morphogenese, Hypertrophie der Blutgefäße, einer reduzierten Anzahl von terminalen Sacculi und einem reduzierten Anteil an Bindegewebe. VEGF erhöht außerdem die Zellteilungsrate von fetalen menschlichen Alveolarepithelzellen vom Typ II [252,253]. Compernolle *et al.* demonstrierten, dass Antikörper gegen den Vegf-Rezeptor 2, die *in utero* verabreicht wurden, die Lungenentwicklung bei fetalen Mäusen verzögerten. Andererseits zeigte sich dabei auch, dass durch die pränatale oder postnatale Verabreichung von Vegf eine Beschleunigung der Lungenentwicklung bei Mäusen hervorgerufen wurde, was anhand der Produktion von Surfactant, der strukturellen Veränderungen und des Überlebens der Mäuse belegt werden konnte [254].

In einer Studie von Kasahara *et al.* [255] an adulten Ratten, führte eine Behandlung mit dem Vegf-Rezeptor-Blocker, *SU5416*, zu einer Vergrößerung der Alveolen und einer Reduktion ihrer Oberfläche und somit erinnerten diese Veränderungen an jene, die auch beim Emphysem beobachtet werden konnten. Wenn der gleiche Blocker neugeborenen Ratten verabreicht wurde, war die Bildung der Alveolen deutlich verschlechtert [256]. Der inhibitorische Effekt von *SU5416*, verabreicht am zweiten Tag nach der Geburt für 24 Stunden, hielt über drei bis vier Monate an [257].

Andere Hemmstoffe der Angiogenese, wie beispielsweise *Thalidomid*³⁰¹ und *Fumagillin*³⁰², führten ebenfalls zu einer Hemmung der Alveolenbildung, wenn sie neugeborenen Ratten während der Periode der Alveolarisierung verabreicht wurden [256]. Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass VEGF offenbar eine Schlüsselrolle im Prozess der Alveolarisierung spielen könnte [203].

Das Wachstum der Lungenkapillaren und die Bildung der Alveolen während der Periode der Alveolarisierung sind in der postnatalen Lunge eng miteinander verbunden. Die funktionelle Verbindung zwischen diesen Prozessen ist bisher unbekannt, aber Defekte der Bildung von Blutgefäßen und der Alveolen sind Charakteristika der *BPD*³⁰³ [258].

Am Primatenmodell an Pavianen mit einer BPD zeigten sich eine reduzierte Anzahl an Epithelzellen und eine Störung der Mikrogefäße in der distalen Lunge [224].

Maniscalco und Mitarbeiter [259] beobachteten an Lungen von Patienten mit BPD sowohl eine anormale Verteilung der Kapillaren in den alveolären Septen, als auch eine reduzierte Zahl dieser Blutgefäße. Das Lungengewebe von Kindern mit einer BPD zeigte dabei auch eine reduzierte Genexpression für den VEGF und den VEGF-2-Rezeptor.

Andere Tiermodelle mit einer Verschlechterung der Alveolarisierung sind auch durch eine reduzierte Anzahl der alveolären Kapillaren charakterisiert. Dies zeigte sich beispielsweise an Ratten, die hohen Sauerstoffmengen ausgesetzt wurden, und bei frühgeborenen und künstlich beatmeten Lämmern [260]. Die Rolle des VEGF bei der Schädigung der sich entwickelnden Lunge durch Hyperoxie wurde von D'Angi *et al.* beschrieben [261].

1.7.8.4. Andere Regulatoren der Angiogenese

Neben VEGF gibt es noch eine Reihe anderer Wachstumsfaktoren, deren Rolle in der Lungenentwicklung immer noch ziemlich unerforscht ist. Zum Beispiel spielen *Angiopoietin*, *Ephrin* und *Semaphorin* (siehe Folgetext), die in der Angiogenese anderer

³⁰¹ *Thalidomid* (α -*Phthalimidoglutaramid*) ist ein Arzneistoff, der als Schlaf- und Beruhigungsmittel unter den Markennamen *Contergan*® und *Softenon*® verkauft wurde und Ende der 1950er-/Anfang der 1960er-Jahre zu zahlreichen schweren Schädigungen an ungeborenem Leben (*Dysmelien*, etc.) und damit zum *Contergan-Skandal* führte (33).

³⁰² *Fumagillin* ist ein komplexes Biomolekül. In der Natur kommt es in *Aspergillus fumigatus* vor (34).

³⁰³ *bronchopulmonale Dysplasie*

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Systeme eine wichtige Rolle spielen, möglicherweise auch in der sich entwickelnden Lunge während der Alveolarisierung eine solche Rolle, da sie in diesen Stadien in der Lunge nachgewiesen werden konnten [262].

Die *Angiopoietine 1* bis *4* binden an Tie 2-Rezeptoren der Endothelzellen und üben, gemeinsam mit VEGF und seinen Rezeptoren, einen Einfluss auf die Angiogenese aus [262].

Angiopoietin 1 wird in der sich entwickelnden Lunge exprimiert, allerdings ändert sich seine Konzentration während der Entwicklung nicht [263]. *Ephrin* gehört zu einer Gruppe von Wachstumsfaktoren, die an Tyrosinkinase-Rezeptoren binden und in die Vasculo- und Angiogenese involviert sind [264]. Allerdings ist die Rolle dieser Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren bisher unbekannt. Die *Semaphorine* gehören zu einer Gruppe von Wachstumsfaktoren, die erstmals im zentralen Nervensystem beschrieben wurden und an *Neuropilin-Rezeptoren* binden [265]. *Neuropilin* agiert als eine Art Co-Rezeptor des VEGF-Rezeptors 2 und beeinflusst auf diese Weise die Angiogenese. Sowohl die Semaphorine, als auch Neuropilin wurden in der sich entwickelnden Lunge nachgewiesen [265].

Die experimentelle Blockade von Neuropilin an der neugeborenen Ratte führte in einer Studie von Ito und Mitarbeitern zu Defekten der Alveolarisierung [266].

1.7.8.5. Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)

Die PDGFs sind Dimere aus *A*- und/oder *B*-Polypeptidketten, die an zwei Rezeptortyrosinkinasen, PDGF-R α und PDGF-R β , binden [267].

PDGF stellt einen potenten mitogenen Faktor für Bindegewebszellen dar [267]. PDGF-A wird von Epithelzellen der sich entwickelnden Lunge exprimiert [268].

Mäuse, die in einer Studie von Boström *et al.* [269] eine homozygote Gendelektion des *Pdgf-a* aufwiesen, verstarben nach der Geburt aufgrund von unzureichender Alveolarisierung.

Diese Knockout-Mäuse zeigten einen Mangel an alveolären Myofibroblasten, die *Pdgf-r α* in ihren primären Septen exprimierten. Auffallend war dabei, dass es zu einem anormalen Muster der Elastin-Ablagerung in ihren Lungen kam und dass sekundäre Septen fehlten.

Diese Fakten deuten darauf hin, dass die Myofibroblasten, die positiv für PDGF-R α sind, in der sich entwickelnden postnatalen Lunge eine Schlüsselrolle bei der Bildung der alveolären Septen spielen und dass PDGF-A ein wichtiger Regulator der Alveolarisierung sein könnte [270].

1.7.8.6. Glucocorticoide

Glucocorticoide sind Steroidhormone, die von der Nebenniere in Antwort auf die Sekretion des aus der Hypophyse freigesetzten *adrenocorticotropen Hormons*³⁰⁴ sezerniert werden. Die Freisetzung von ACTH aus der Hypophyse wird durch das Peptid *Corticotropin-Releasing Hormon*³⁰⁵ reguliert, das aus dem Hypothalamus stammt. Die Glucocorticoide binden an *Glucocorticoid-Rezeptoren*³⁰⁶, die Mitglieder der Familie der *Steroid-Hormon-Rezeptoren* darstellen. Die Verabreichung von Glucocorticoiden bei drohender Frühgeburt an die Mutter, kann die fetale Lungenentwicklung beschleunigen und das Risiko für die Entstehung eines RDS senken. Das RDS wird durch einen Mangel an Surfactant verursacht und Glucocorticoide steigern die Surfactant-Produktion in den Typ II-Alveolarepithelzellen.

³⁰⁴ ACTH

³⁰⁵ CRH

³⁰⁶ GR

Die Glucocorticoide üben auch viele andere Effekte auf die Lunge aus [271,272]. Vorgeburtliche Verabreichung von Glucocorticoiden beschleunigt die Reifung der Lunge und dabei insbesondere die Ausdünnung der Alveolarwände [273]. Bei Ratten, die erst nach der Geburt alveolarisieren, hemmen Glucocorticoide diese Alveolarisierung [274]. Die Bildung der sekundären alveolären Septen zeigte eine Verschlechterung in den Lungen von neugeborenen Ratten, die mit Glucocorticoiden behandelt wurden, was sich in dieser Studie von Massaro und Massaro unter anderem durch das Auftreten einer geringeren Anzahl vergrößerter Alveolen zeigte. Gleiche Ereignisse ließen sich auch bei Ratten beobachten, die mit Glucocorticoiden in der postnatalen Periode behandelt wurden, wie dies bei Massaro *et al.* nachzulesen ist. Die Effekte von Glucocorticoiden scheinen demnach, zumindest in der Rattenlunge, permanent zu sein [275].

Gleiche Effekte von Glucocorticoiden zeigten sich auch in Lungen von Primaten, denn auch hier war eine Verschlechterung der Alveolarisierung zu beobachten [276]. Die Schlüsselrolle der Glucocorticoide in der Lungenentwicklung wurde durch die Beobachtung von Muglia *et al.* untermauert, dass Mäuse mit einer Deletion des *Crh*-Gens an Lungenversagen, verursacht durch eine inadäquate Lungenentwicklung, verstarben. Es handelte sich hierbei offenbar um einen strukturellen Effekt, da die Surfactant-Komponenten durch diese Deletion nicht so stark beeinträchtigt wurden [277].

Cole *et al.* machten eine ähnliche Beobachtung an Mäusen mit einer Defizienz des Glucocorticoidrezeptors. Hier zeigte sich eine unzureichende strukturelle Entwicklung der Lunge, jedoch waren die Komponenten des Surfactant-Systems davon ebenfalls nicht so stark betroffen [278].

Die BPD wird durch multiple Faktoren verursacht. In der Pathogenese spielen vor allem die mechanische Beatmung, die Sauerstoff-Toxizität und die Entzündung eine wichtige Rolle [279]. Mit Glucocorticoiden lässt sich die BPD effektiv behandeln, vermutlich aufgrund ihrer anti-inflammatorischen Effekte [280]. Die Langzeiteffekte der Glucocorticoidbehandlung von Kindern mit einer BPD sind bisher noch unzureichend untersucht.

Es ist bekannt, dass die Lungen von Kindern mit einer BPD eine geringere Anzahl größerer Alveolen aufweisen und dies stellt ein Problem bei der Behandlung dieser Kinder mit Glucocorticoiden dar, die die Alveolarisierung beeinträchtigen [281].

1.7.8.7. Die Wirkung der Vitamin-A-Säure

Die Vitamin-A-Säure³⁰⁷ spielt eine wichtige Rolle bei der Differenzierung und Aufrechterhaltung der Differenzierung aller respiratorischen Epithelien, von der Trachea bis zum Alveolus [282]. Die *All-Trans-Retinsäure*, die das am besten charakterisierte, biologisch aktive *Retinoid* darstellt, bindet an die Rezeptoren, RAR³⁰⁸ und RXR³⁰⁹ [283]. Diese stellen Mitglieder der Familie der Steroidhormon-Rezeptoren der Transkriptionsfaktoren dar.

Es existieren drei *RAR*-Gene (*RAR α* , β und γ) und drei *RXR*-Gene (*RXR α* , β und γ), von denen jedes mehrere Isoformen produziert [283]. Die RARs bilden mit den RXRs Heterodimere und binden an die *cis-acting elements* in den Genen mit *retinoic acid-responsiven Elementen*³¹⁰ [283].

³⁰⁷ *Tretinoin*, auch *Vitamin-A-Säure (VAS)* bzw. *all-trans-Retinsäure* (1)

³⁰⁸ *Retinoic acid receptors*

³⁰⁹ *Retinoid-X receptors*

³¹⁰ *Retinoic acid response elements* (RAREs)

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Massaro *et al.* [284] beschreiben in ihrer Publikation, dass die All-Trans-Retinsäure eine Schlüsselrolle in der Regulation der Alveolarisierung von Mäusen und Ratten spielt. In ihrem Bericht wurden die Effekte der Behandlung von postnatalen Ratten mit All-Trans-Retinsäure oder *Dexamethason* beschrieben. Die Behandlung mit Dexamethason führte zu einer Hemmung der Alveolarisierung.

In einer früheren Studie von Massaro und Kollegen war zu lesen, dass die alleinige Behandlung mit Vitamin-A-Säure zu einem Anstieg der Zahl der Alveolen führte, aber keinen Effekt auf die Gasaustauschoberfläche der Lunge im Vergleich zur Kontrollgruppe hatte. Außerdem führte diese Behandlung zu einer Beseitigung vieler Effekte der Glucocorticoide auf die Alveolarisierung. Speziell die Behandlung mit einer Kombination aus Glucocorticoiden und Dexamethason führte zu einer Steigerung der Gasaustauschoberfläche und Zahl der Alveolen in der Lunge, im Gegensatz zu einer alleinigen Behandlung mit Glucocorticoiden [285].

In einer anderen Studie derselben Forschergruppe, die aus dem Jahr 1997 stammt [286], wurden adulte Ratten mit intratrachealer *Elastase*³¹¹ behandelt, um ein Emphysem zu erzeugen. Durch die folgende Behandlung dieser Ratten mit All-Trans-Retinsäure, wurden diese, durch Elastase erzeugten Effekte, bezüglich der Zahl der Alveolen und der Gasaustauschoberfläche wieder aufgehoben.

Es wurde auch über den Effekt der Behandlung neugeborener Ratten mit Vitamin-A-Säure während einer Hyperoxie-Exposition berichtet. Die Vitamin-A-Säure schützte die Lungen vor dem zerstörerischen Effekt, den die Hyperoxie auf die Alveolen ausübte [287].

Die erwähnte Studie von Massaro *et al.* brachte hervor, dass die Lungen von Mäusen mit einer Deletion des *Rarβ*-Gens, zwar eine größere Anzahl, aber dafür größenreduzierte Alveolen aufwiesen. Die Gasaustauschoberfläche war bei diesen allerdings gleich, wie bei den *Wildtyp*³¹²-Mäusen. Im gleichen Artikel wurde beschrieben, dass die Behandlung von postnatalen Ratten mit einem *Rarβ*-Agonisten zu einer Beeinträchtigung der Bildung der Alveolen führte.

Zusammenfassend deuten diese Beobachtungen darauf hin, dass *Rarβ* ein endogener Inhibitor der Alveolarisierung sein könnte [286].

McGowan und Mitarbeiter beschrieben in ihrem wissenschaftlichen Artikel, dass *Rary* möglicherweise einige der Effekte von Vitamin-A-Säure auf die Alveolarisierung medieren könnte. Mäuse mit einer Gendeletion des *Rary* zeigten im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen Lungen mit einer geringeren Anzahl größerer Alveolen. Die Effekte der Deletion des *Rary*-Gens zeigten sich bei Mäusen in einer verstärkten Weise, die heterozygot für die Deletion von *Rxra* waren. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass Heterodimere von *Rary/Rxra* bei der Regulation der Alveolarisierung eine Rolle spielen [288].

Elastin stellt eine wichtige Komponente der Wand der Alveolen dar, die in den Vorgang der Alveolarisierung involviert ist und durch All-Trans-Retinsäure reguliert wird.

Die Levels von *Retinylestern*³¹³ stiegen in einer Studie von McGowan *et al.* während der Phase der Lungenentwicklung an und fielen danach wieder ab. Retinylester sind in Lipid-beladenen Fibroblasten konzentriert. Diese stellen einen prominenten Zelltyp der

³¹¹ Enzym, das Peptidbindungen spalten kann (1)

³¹² Der *Wildtyp* ist die Bezeichnung für die als *normal* klassifizierte Ausprägung eines Gens, die in der Mehrzahl der Individuen einer Art (*Species*) vorkommt. Abweichungen von der Norm entstehen durch *Mutationen* (1).

³¹³ *Fettsäureester des Retinols* (1)

Bindegewebskomponente der primären Septen der sich entwickelnden Lunge dar [289,290].

McGowan und Mitarbeiter beschreiben auch, dass die endogene Verabreichung von Retinoiden in der sich entwickelnden Lunge die Elastin-Genexpression steigerte. Retinoide steigern auch *in vitro* die Genexpression von Elastin, wie sich in Kulturen von Lipid-beladenen Fibroblasten zeigte [289].

Bei Mäusen mit einer Deletion des *Rary*-Gens, wurde von McGowan *et al.* ein Abfall der mRNA-Expression von *Elastin* in Lipid-beladenen Fibroblasten beobachtet, die aus postnatalem Lungengewebe isoliert wurden (im Vergleich zur *Elastin*-mRNA-Expression der Fibroblasten von Wildtyp-Mäusen). Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich hierbei auch eine deutliche Abnahme der Anzahl der Elastinfasern in den Alveolarwänden von Mäusen mit *Rary*-Gendeletion [288]. Der Ansicht der Autoren folgend, lässt sich annehmen, dass die Vitamin-A-Säure die *Elastin*-Genexpression und die Zusammensetzung der Elastin-Fasern bei der Alveolarisierung der postnatalen Lunge beeinflussen könnte [288].

Die Plasmakonzentration von Vitamin A³¹⁴ ist bei frühgeborenen Kindern mit geringem Geburtsgewicht deutlich niedriger, wie dies von Shenai *et al.* [291] beschrieben wurde. Manche histologischen Charakteristika des Lungengewebes bei BPD zeigen eine große Ähnlichkeit zu jenen der Modelle mit Vitamin-A-Mangel [282].

Kennedy und Mitarbeiter [292] erstellten eine Metaanalyse von vier klinischen Studien, in welchen die Supplementation von Vitamin A bei Kindern mit sehr geringem Geburtsgewicht zu einer Reduktion der Mortalität und der Inzidenz der BPD führte. Die Ergebnisse einer größeren klinischen Studie besagten, dass der Ersatz von Vitamin A, bei Kindern mit sehr niedrigem Geburtsgewicht, deren Risiko der Entstehung einer chronischen Lungenerkrankung reduzierte. Somit zeigt sich die Nützlichkeit von Retinoiden bei der Beschleunigung der Lungenentwicklung und der Reduktion der Inzidenz der BPD bei Neugeborenen. Der günstige Effekt der Retinoide auf die Alveolarisierung muss allerdings noch genauer erforscht werden [293].

Der Verlust der Zahl an Alveolen in der adulten Lunge führt zu einer inadäquaten Gasaustauschoberfläche und zur Entstehung des Emphysems, wie es Walter *et al.* [294] beschrieben. Bisher ist keine klinische Behandlung bekannt, die die Regeneration von Alveolen fördert. Beobachtungen an Ratten zeigten, dass die Behandlung mit Vitamin-A-Säure zu einer *de novo*-Alveolarisierung in der Lunge führen kann [295]. Eine Behandlung mit Vitamin-A-Säure wurde gut toleriert und verursachte nur wenige Nebeneffekte.

Leider zeigten Pilotstudien bisher keine Effekte der Behandlung mit Retinoiden auf die Lungenfunktion oder die Lungenstruktur [295].

Eine genauere Schilderung des Metabolismus und der Wirkung von Vitamin A und seinen Derivaten erfolgt im Zuge der Beschreibung des Vitamin A-Mangels am Tiermodell im **Kapitel 1.14**.

1.7.8.8. Östrogen und Testosteron

Die Lungenentwicklung wird durch das Geschlecht des Fetus beeinflusst. Die Reifung der Lunge ist bei männlichen, im Vergleich zu weiblichen Feten, verzögert [296]. Männliche Feten zeigen eine höhere Inzidenz für die Ausprägung eines RDS und eine höhere

³¹⁴ *Retinol* ist der metabolische Vorläufer der *All-Trans-Retinsäure* (1).

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Mortalität. Es wird angenommen, dass Androgene, die beim männlichen Fetus in höheren Mengen vorhanden sind, die Lungenentwicklung verzögern könnten [297].

Allerdings entdeckten Massaro *et al.* [298] im Zuge ihrer Untersuchungen, dass die Lungen von männlichen Mäusen, die negativ für den Androgen-Rezeptor waren, die gleiche Oberfläche (adjustiert auf das Körpergewicht), wie die männlichen Wildtyp-Mäuse aufwiesen. Es schien auch geschlechtsspezifische Unterschiede bezüglich der Bildung der Alveolen in der neonatalen Lunge zu geben [299], denn Massaro und Mitarbeiter berichteten auch, dass weibliche Ratten und Mäuse (60 Tage alt) kleinere und zahlreichere Lungenalveolen aufwiesen und dass die körperrgewichtsspezifische Lungenoberfläche signifikant größer war, als bei den männlichen Artgenossen.

In einer anderen Studie beschrieb diese Forschergruppe, dass Östrogen die geschlechtsspezifischen Effekte auf die Lungenstruktur von Ratten mediierte. Die Behandlung von weiblichen neugeborenen Ratten mit Androgenen führte zu keiner Veränderung der Lungenstruktur. Diese Daten deuteten darauf hin, dass Östrogen die Alveolarisierung in der postnatalen Lunge regulieren könnte [298].

Während der Schwangerschaft sind sowohl der männliche, als auch der weibliche Fetus hohen Levels von Östrogenen ausgesetzt, die nach der Geburt sehr stark abfallen. Kliniker vermuten, dass Frühgeborene von einer Östrogen-Ersatztherapie profitieren könnten [300]. Tatsächlich profitieren, den Beobachtungen von Trotter *et al.* [301] folgend, manche Neugeborenen von einer Östrogentherapie bei chronischen Lungenkrankheiten. Es ist allerdings nicht bekannt, ob diese Effekte auf Unterschiede in der Bildung der Alveolen zurückzuführen sind.

1.7.8.9. Ernährung

Die Restriktion der Nahrung reduziert den Stoffwechsel und den physiologischen Sauerstoffbedarf [302]. Studien an adulten Ratten, die von Sahebami und Mitarbeitern [303] durchgeführt wurden, brachten hervor, dass eine Reduktion der Nahrung die Größe der Alveolen der Lungen steigerte und die Gasaustauschoberfläche reduzierte. Anhand einer an adulten Mäusen durchgeführte Untersuchung von Massaro *et al.* [304] ließ sich erkennen, dass eine Beendigung dieser Nahrungsrestriktion die Veränderungen in der Lunge wieder aufhob.

Beobachtungen der Einwohner des Warschauer Ghettos während des zweiten Weltkriegs zeigten einen ähnlichen Effekt am Menschen: Lungen von schwer unterernährten Menschen zeigten eine Emphysem-artige Morphologie [304].

Massaro und Mitarbeiter kamen zur Annahme, dass in Perioden von geringem Sauerstoffbedarf (beispielsweise bei Nahrungsrestriktion), Alveolen abgebaut werden, während sich diese bei Wiederaufnahme der Ernährung, im Zuge des erhöhten Sauerstoffbedarfs, wieder regenerieren können [229].

1.7.8.10. Sauerstoff

Die Oberfläche der Lungenalveolen hat die Funktion einer Einheit für den Gasaustausch und Sauerstoff hat einen potenten Einfluss auf die Bildung von Alveolen in der sich entwickelnden Lunge [229]. Die Dimension der Gasaustauschoberfläche ist direkt vom Sauerstoffbedarf des Körpers abhängig [305]. An neugeborenen Ratten zeigte sich, dass Hyperoxie zu einer Abnahme der Oberfläche der Alveolen führte [229].

Burri und Weibel beschrieben in ihrer Studie [306], dass neugeborene Ratten, die in 40%igem Sauerstoff aufgezogen wurden, eine reduzierte Oberfläche der Alveolen im Vergleich zu den Ratten der Kontrollgruppe, die normale Luft atmeten, aufwiesen.

Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Randell *et al.* [307] gemacht, die neugeborene Ratten, während der ersten sieben Tage nach der Geburt, in 95%igem Sauerstoff und anschließend, für die nächsten 40 Tage, bei Raumluft aufzogen. Dies führte zu einer Verschlechterung der Alveolarisierung und Reduktion der Gasaustauschoberfläche der Ratten, die sauerstoffexponiert waren, im Vergleich zur Kontrollgruppe, die in Raumluft aufgezogen wurden.

Der Signalweg in der sich entwickelnden Lunge, der die Sauerstofflevels misst und die Veränderung der alveolären Oberfläche reguliert, ist bisher unbekannt. Es wurde aber gezeigt, dass Hyperoxie die Expression von Vegf an neonatalen Hasen hemmte [308]. Sie führte auch zu einer gesteigerten Apoptose in der distalen Lunge von neugeborenen Mäusen [309].

Die Hypoxie ist ebenfalls ein potenter Regulator der Alveolenbildung [229]. Massaro und Kollegen [310] beschrieben im Jahr 1990, dass neugeborene Ratten, die in 13%igem Sauerstoff aufgezogen wurden, weniger Alveolen und eine reduzierte Gasaustauschoberfläche aufwiesen.

1.7.8.11. Entzündung

Die Alveolarisierung bei frühgeborenen Kindern wird durch viele Faktoren, wie mechanische Beatmung, Sauerstoff, inadäquate Ernährung, Glucocorticoide und möglicherweise auch durch Infektionen gehemmt. Alle diese Stimuli können zu einer Entzündung führen. Demnach nehmen viele Forscher an, dass Entzündungsmediatoren die Alveolarisierung verschlechtern könnten. Intrauterine Infektionen sind eine häufige Ursache für Frühgeburten und es ist mittlerweile bekannt, dass solche Infektionen auch die Lungenentwicklung nach der Geburt beeinflussen können [311,312].

Eine häufig auftretende Aktivierung der entzündlichen Endstrecke kommt durch *Metalloproteinasen* in Gang und dies führt zu einer Zerstörung der extrazellulären Matrix und damit zu Veränderungen der Lungenstruktur und Lungenfunktion [313].

Eine wichtige Funktion der SP-A³¹⁵ und -D³¹⁶ könnte, laut Crouch und Wright [314], die Regulierung der Entzündung in den Alveolen sein. In diesem Zusammenhang entwickelten Mäuse mit einer Deletion des *Sp-d*-Gens und Mäuse mit einer doppelten Deletion der Gene *Sp-a* und *Sp-d*, bei den Untersuchungen, die von Wert *et al.* [315] durchgeführt wurden, ein postnatales Lungenemphysem.

Entzündliche Vorgänge sind mit der Destruktion der Alveolen in adulten Lungen eng verbunden und dieser Zusammenhang wird häufig bei der *COPD*³¹⁷ beobachtet [316].

1.7.8.12. Andere Mediatoren der Alveolarisierung

Die Behandlung neugeborener Ratten mit Schilddrüsenhormonen beschleunigte die Bildung der Lungenalveolen, führte zur Bildung kleinerer Alveolen und zu einem Anstieg der Gasaustauschoberfläche. Im Gegensatz dazu, führte der Wirkstoff *Propylthiouracil*, der

³¹⁵ *Surfactant-Protein A*

³¹⁶ *Surfactant-Protein D*

³¹⁷ *chronisch obstruktive Lungenerkrankheit*

*Thyroxin*³¹⁸ hemmt, zu einer Verschlechterung der Alveolarisierung und einer Verkleinerung der Gasaustauschoberfläche. Das Schilddrüsenhormon übt somit einen Einfluss auf die sich entwickelnde Lunge aus [317].

Die Mitglieder der Familie der FGFs³¹⁹ spielen, den Schilderungen von Ware und Manhay [318] zufolge, eine bedeutende Rolle bei vielen Aspekten der Lungenentwicklung. Diese Faktoren binden an einen von zahlreichen Tyrosinkinase-Rezeptoren (FGFR).

Mäuse, die einen Mangel des Fgfr-3 und Fgfr-4 aufwiesen, bildeten keine Alveolen während des postnatalen Lebens. Viele andere Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktor-Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren regulieren verschiedene Aspekte der Lungenentwicklung. Viele dieser Faktoren beeinflussen die Lungenentwicklung an verschiedenen Stellen und in verschiedenen Stadien der Entwicklung. Im Speziellen wird auch die Bildung der Alveolen durch sie beeinflusst [319,320].

1.8. Die kongenitale Zwerchfellhernie (CDH)

Die CDH stellt einen Defekt im kindlichen Zwerchfell dar, der zu einer Fehlentwicklung der Lunge führt und eine schwerwiegende Lungenhypoplasie hervorruft. Die Mortalitätsraten, die mit dieser Fehlbildung assoziiert sind, variieren je nach medizinischem Standard breit, liegen aber gewöhnlich bei 30-50% [566].

Die CDH stellt das Resultat des Versagens des Verschlusses des embryonalen Zwerchfells (etwa in der 12. Schwangerschaftswoche) dar, der es Bauchorganen wie Magen, Darm, Milz oder auch Leber ermöglicht, sich in den Thorax zu verlagern [321].

Eine CDH tritt meist *unilateral* auf und betrifft in rund 84% die linke und in 13% die rechte Seite, während *bilaterale* Defekte selten sind. Auf der betroffenen Seite kann sich die Lunge nicht ausreichend entfalten und es kommt zu einer Behinderung des Wachstums und der Entwicklung der Lunge. Die Bauchorgane komprimieren auch die kontralaterale Lunge und verursachen häufig einen *Mediastinalshift*³²⁰. Weil dieser Defekt früh im fetalen Leben auftritt, kommt es dabei häufig zu schwerer pulmonaler Hypoplasie und einer schweren Beeinträchtigung der Struktur und Funktion der Luftwege und des pulmonalen Gefäßbaums [439].

Die kongenitale Zwerchfellhernie ist ein relativ häufiger Defekt der kindlichen Entwicklung, der bei einer von 2000 bis 5000 Lebendgeburten auftritt und in rund 40% mit anderen strukturellen oder genetischen Anomalien assoziiert ist [185]. Studien von Keijzer und Kollegen am Nitrofen-induzierten Nagetier-Modell führten zur Aufstellung der Hypothese, dass das primäre Problem die Lungenhypoplasie darstellen und der Diaphragma-Defekt eher sekundärer Genese sein könnte [322].

Die CDH kann auch das vaskuläre Bett beeinflussen und in seiner Entwicklung beeinträchtigen, was zur *pulmonalen Hypertension*³²¹ führen kann [323]. Die Beeinträchtigung einer ausreichenden Oxygenierung aufgrund der Lungenhypoplasie und -hypertonie ist die Hauptursache von Morbidität und Mortalität in diesen Fällen.

³¹⁸ *Thyroxin (3,3',5,5'-Tetraiod-L-Thyronin)* ist ein Hormon, das in der Schilddrüse von Säugetieren gebildet wird (35).

³¹⁹ *Fibroblast growth factors*

³²⁰ Verschiebung des Mediastinums (1)

³²¹ Lungenhochdruck

Chang *et al.* [324] beschrieben in einer Studie eine Downregulation der *Vegf*-Genexpression am Nitrofen-induzierten Rattenmodell mit CDH.

Teramoto und Mitarbeiter beobachteten am selben Modell eine Downregulation der Expression von *Fgf7* und *Fgf10* [325]. Zusätzlich war eine Verzögerung der pulmonalen Expression von SHH bei menschlichen Lungen mit einer CDH zu verzeichnen, und SHH erlangte seinen *Peak*³²² erst in der kanalikulären oder sakkulären Phase, wo hingegen es diesen in normalen Lungen schon in der pseudoglandulären Phase erreichte [326].

Laut Leinwand und Kollegen, scheint *Tgf-β* am Nitrofen-induzierten Modell der CDH der Maus keine Rolle zu spielen [327]. Andere Wachstumsfaktoren, wie IGF, EGF und *TGF-α* zeigten eine Fehlexpression bei menschlichen hypoplastischen Lungen mit CDH [328].

Die Veränderungen der Expression von regulatorischen Signalmolekülen deuten auf eine Persistenz des fetalen Stadiums der Lungenentwicklung beim Auftreten einer CDH hin [328].

Eine weitere interessante Rolle wird vom *RA*³²³-Signalweg übernommen. *RA* führt, den Berichten von Babiuk *et al.* folgend, zu einer Reduktion des Prozentsatzes der CDH, wenn es Nitrofen-exponierten Ratten verabreicht wird [329]. Die Plasmalevels von *Retinol*³²⁴ und dem *Retinol-Binding-Protein* zeigten sich bei einer kleineren Gruppe von Kindern mit einer CDH reduziert [330]. Am Nitrofen-induzierten Modell der CDH ergab sich eine Persistenz von *Hoxb5* in späteren Stadien der Entwicklung, was auch auf eine verzögerte Entwicklung und Reifung, im Vergleich zu normalen Lungen, hindeutete [331].

Solari *et al.* [332] beschrieben in den untersuchten Fällen einer menschlichen CDH eine gesteigerte Expression des *Glucocorticoidrezeptors*, was auf die Rolle der *Glucocorticoide* in der hypoplastischen Lunge hinweisen könnte. Die *Ttfl*-Expression war im Nitrofen-induzierten Rattenmodell der CDH verringert, allerdings zeigte sich dieser Aspekt bei der menschlichen CDH nicht [333].

1.8.1. Pränatale Diagnose und Therapie der CDH

Die frühzeitige Erkennung einer CDH sollte zur genauen Abklärung eventuell assoziierter genetischer und struktureller Anomalien führen und kann im besten Fall durch Einsatz pränataler Therapien oder die Durchführung einer geplanten Entbindung in einem Tertiärzentrum zu einer Verbesserung des kindlichen Outcome führen. Wesentlich für das Management betroffener Schwangerschaften ist eine adäquate Prognoseerhebung, die vor allem vom Grad der erwarteten Lungenhypoplasie und auch der Position der Leber abhängt [334]. Meist wird die Diagnostik mittels Ultraschall betrieben, der ggf. durch den Einsatz der fetalen Magnetresonanztomographie ergänzt wird.

Einer der heute am besten evaluierten Prognoseindikatoren ist die lung-to-head ratio (*LHR*)³²⁵, das Verhältnismaß zwischen geschätzter Lungengröße (basierend auf der sonographischen Messung der Größe der kotalateralen Lunge) und dem fetalen Kopfumfang.

Das Ergebnis der Ultraschalluntersuchung wird dann als Verhältnis der beobachteten (*observed*) zur erwarteten (*expected*) *LHR* ausgedrückt (*O/E LHR*).

Bei einer *O/E LHR* von <25% befinden sich die Überlebenschancen unter 15%. Eine pränatale Intervention zur Förderung des Lungenwachstums ist die *FETO*³²⁶. Dabei wird

³²² Spitzenwert

³²³ Vitamin A-Säure

³²⁴ Vitamin A

³²⁵ *Lung Area to Head Circumference Ratio* (engl.)

³²⁶ *Fetal Endoscopic Tracheal Occlusion* (engl.)

im Stadium von 26-28 Wochen ein Ballon in die fetale Trachea eingesetzt und dieser wird dann in der 34. SSW wieder entfernt [334].

In etwa 40% der Fälle sind andere Anomalien mit der CDH assoziiert, mit weniger als 15% überlebenden Feten in dieser Gruppe. Die Mehrheit hat allerdings einen isolierten Zwerchfelldefekt. Obwohl der Name CDH initial auf den Zwerchfelldefekt hindeutet, so ist es doch die anormale Lungenentwicklung, die der Erkrankung ihre klinische Relevanz verleiht.

Die Veränderungen in der Lunge sind, wie in diesem Kapitel bereits beschrieben, oft die direkte Folge einer Kompression durch die sich vorwölbenden Bauchorgane, aber auch das stellt offenbar nur einen Teilaspekt bei der Entstehung der Lungenhypoplasie dar [334,335].

Manche Veränderungen entstehen allerdings auch direkt in der Lunge.

Feten mit einer CDH weisen eine verringerte Zahl von leitenden Luftwegen und auch von Gefäßen auf. Es kommt somit zur Reduktion der Zahl an Alveolen, Verdickung der alveolären Wände, Vermehrung des interstitiellen Gewebes, Verringerung der alveolären Räume und Reduktion der Oberfläche für den Gasaustausch. Zusätzlich beobachtet man eine reduzierte Anzahl an Gefäßen, Verdickung der Adventitia, Hyperplasie der Media³²⁷ und periphere Erweiterungen der Muskelschicht. Beide Lungen sind betroffen, wobei die ipsilaterale Lunge eine stärkere Beteiligung zeigt. Es können auch andere Aberrationen hinzukommen, die die Position der Leber, des unteren Ösophagus und des Magens betreffen [334].

1.8.2. Pränatale Ultraschall-Diagnostik und assoziierte Anomalien

Die Diagnose der CDH wird oft in der pränatalen Periode mittels einer Ultraschall-Untersuchung gestellt. Das Zwerchfell kann dabei mit hochauflösender Technik dargestellt werden. Wenn es fehlt, lassen sich Bauchorgane bzw. deren herniierte Anteile im Thoraxbereich visualisieren. Die LCDH ist die häufigste Hernie und zeigt einen „Shift“³²⁸ des Herzens und Mediastinums nach rechts, der durch den herniierten Magen und die Eingeweide hervorgerufen wird. Der Magen ist dabei im Ultraschallbild aufgrund seines Flüssigkeitsgehaltes und der Darm häufig an seiner Peristaltik zu erkennen. Auch die Leber kann durch die Hernie hindurchtreten, doch ist sie durch ihre ähnliche Echogenität³²⁹ schwerer von der Lunge abzugrenzen. Vor allem RCDHs sind schwieriger zu erkennen, weil die herniierte Leber von der Lunge nur schwer abzugrenzen ist und weil sich der Magen in seiner normalen Position befindet. Der rechte Leberlappen kann das Mediastinum nach rechts verlagern [334].

Die wichtigsten Differentialdiagnosen der CDH sind andere pulmonale Pathologien, wie die *zystische adenomatoide Malformation*, *bronchogene*, *enterische* und *neuroenterische Zysten*, ein *mediastinales Teratom* und *thymische Zysten* (siehe Beginn dieser Einleitung). In einem solchen Fall sind die Bauchorgane nicht deplatziert. Es ist also sehr wichtig, immer auch nach assoziierten Anomalien zu suchen. Diese sind (in absteigender Reihenfolge ihrer Häufigkeiten): Anomalien des Herzens, der Niere, des zentralen Nervensystems und des Gastrointestinaltraktes [334,336].

³²⁷ Mittelschicht der Gefäßwand

³²⁸ Verschiebung, Verdrängung

³²⁹ Die *Ultraschall-Sonde* sendet kurze, gerichtete Schallwellenimpulse aus, die in den Gewebeschichten unterschiedlich stark reflektiert und gestreut werden, was als *Echogenität* bezeichnet wird. Aus der Laufzeit der reflektierten Signale kann die Tiefe der reflektierenden Struktur rekonstruiert werden (71).

1.8.3. Prognose-Parameter bei CDH

Zur Erstellung einer Prognose wurden indirekte Parameter, wie: die Größe der Herzventrikel³³⁰, das Volumen der Amnionflüssigkeit³³¹, der Grad des Mediastinalshifts und die Position des Magens herangezogen. Allerdings sind alle diese Parameter in Bezug auf die Prognose derzeit noch zu wenig erforscht. Das schwerwiegendste Problem bleibt weiterhin die mit der CDH assoziierte Lungenhypoplasie [334,337].

1.8.4. Untersuchungen der kontralateralen Lunge

Die Messung der Lungengröße und/oder des Flusswiderstandes in der Lungenzirkulation soll als Maß für die *pulmonale Hypertension* und *Hypoplasie* dienen. Die Messung erfolgt zumeist über den 2D-Ultraschall³³² und am besten etabliert ist die Erhebung der LHR³³³. Dazu werden der kontralaterale Lungenbereich und dann der Kopfumfang (standard biparietale³³⁴ Ansicht) vermessen und mit einem *biometrischen Index* verglichen. Sowohl die LHR, als auch die Position der Leber im Thorax waren unabhängige prognostische Faktoren bezüglich des Outcomes. Zwischen einem Alter von 12 und 32 Wochen, wächst die normale Lunge etwa viermal mehr, als dies der Kopfumfang tut. Folglich steigt die LHR während der Schwangerschaft, wie man dies in den *Nomogrammen*³³⁵ nachvollziehen kann. Dem Effekt des Schwangerschaftsalters auf das Lungenwachstum kann Rechnung getragen werden, indem die Daten der Beobachtung (*observed*³³⁶) zum normalen Durchschnitt der gleichseitigen Lunge (*expected*³³⁷) in Beziehung gesetzt werden (*O/E LHR*).

Grundsätzlich lässt sich daraus schließen, dass die Überlebenschancen mit steigender O/E LHR zunehmen [334,338,339].

Es ergeben sich daraus folgende prognostische Werte [334]:

- Feten mit einer O/E LHR <15% leiden unter extremer pulmonaler Hypoplasie und es sind bisher keine Überlebenden in dieser Gruppe bekannt
- Feten mit einer O/E LHR zwischen 15 und 25% leiden unter schwererer pulmonaler Hypoplasie und die Überlebensrate liegt um 15%
- Feten mit einer O/E LHR zwischen 26 und 45% leiden unter einer moderaten Hypoplasie und die Überlebensrate liegt zwischen 30 und 60% (abhängig von der Lungengröße)
- Feten mit einer O/E LHR über 45% leiden unter einer milden Hypoplasie und haben gute Überlebenschancen

³³⁰ Herzkammern

³³¹ Fruchtwasser

³³² Im 2D-Echtzeitmodus, der derzeit häufigsten Anwendung des Ultraschalls, wird ein zweidimensionales Schnittbild des untersuchten Gewebes durch automatische Verschwenkung des Messstrahls und Synchronisierung der B-mode-Darstellung in Echtzeit erzeugt. Das Schnittbild wird dabei aus einzelnen Linien zusammengesetzt, wobei für jede Linie ein Strahl ausgesendet und empfangen werden muss (73).

³³³ Lung Area to Head Circumference Ratio (engl.)

³³⁴ Os parietale (lat.): Scheitelbein

³³⁵ Nomogramm: graphische Darstellung eines funktionellen Zusammenhanges mehrerer voneinander abhängiger Größen in einem Skalensystem. Mittels einfacher oder bekannter Merkmale können damit unbekannte oder schwierig messbare Merkmale ermittelt werden (1).

³³⁶ observed (engl.): beobachtet

³³⁷ expected (engl.): erwartet

Es wird über die Bedeutung der Leberposition als unabhängiger prognostischer Wert diskutiert. Eine höhere Leberposition führt, laut den Untersuchungen von Cannie *et al.*, zu einer Verschlechterung der Prognose. Liegt eine CDH rechtsseitig, ist dies ein unabhängiger Vorhersagewert für eine schlechte Prognose. Die Beobachtungen zeigten hier eine Überlebensrate von nur 44% und es gab keine Überlebenden bei einer O/E LHR von unter 45% [334,340-342].

Das fetale MRI³³⁸ ist gut für Untersuchungen geeignet, da die fetale Lunge zu einem großen Anteil aus Wasser besteht und somit eine morphologische und volumetrische Diagnostik erlaubt. Beide, sowohl die ipsi- als auch die kontralaterale Lunge, können dargestellt werden, man erreicht eine hohe Auflösung und die Untersuchung kann auch bei *adipösen* Patientinnen angewendet werden [334,340].

1.8.5. Neonatale Behandlung der CDH

Die Veränderungen der Lungenentwicklung machen sich klinisch erst zum Zeitpunkt der Geburt bemerkbar. Meistens beobachtet man eine *Ateminsuffizienz* und einen *PAH*³³⁹. Durch das reduzierte Gefäßbett der Lunge und den ebenfalls reduzierten Luftraum entstehen *Hypoxie*, *Hyperkapnie* und *PAH*. Die veränderten Gefäße reagieren mit stärkerer Vasokonstriktion, was wiederum die *PAH* verschlechtert und damit auch den *rechts-links Shunt*. Dies wird in der Publikation von Doné *et al.* als ein „*Circulus vitiosus*“ beschrieben, der den Gasaustausch einschränkt und damit die Hypoxie und Azidose verstärkt [334].

Vor den 90er Jahren wurde die massive *Hyperventilation* und *Hyperoxygenation*, kombiniert mit anderen Maßnahmen und Notfalloperationen, zur Defektreparatur eingesetzt. Heute wurde dies teilweise in Frage gestellt und nun werden mittels „*gemäßigter Ventilation*“³⁴⁰ und späteren chirurgischen Eingriffen, bessere Ergebnisse erzielt, was zu einer Reduktion des *Baro-* und *Volutraumas*³⁴¹ führt [334,343,344].

Als primäre Therapie bei Lungenhypoplasie wurde, laut Smith *et al.*, die *HFOV*³⁴² etabliert, die an manchen Zentren Vorrang gegenüber einer *ECMO*³⁴³ hat [345]. Die *PAH* wird mittels der Verabreichung von *iNO*³⁴⁴ behandelt [346]. Auch das bereits erwähnte Offenhalten des *Ductus arteriosus botalli*, durch Verabreichung von *PGE1*³⁴⁵, kann einen Vorteil bringen [347]. Allerdings hat die Verwendung von *Surfactant* zur Therapie der CDH bisher keine Vorteile gebracht [334,348].

Durch die Veränderungen der neonatalen Therapievarianten, sollte man eigentlich zunehmende Überlebensraten der Neugeborenen erwarten. Allerdings variieren diese aus

³³⁸ *Magnetresonanztomographie* (MRT, kurz auch MR) ist ein bildgebendes Verfahren, das vor allem in der medizinischen Diagnostik zur Darstellung von Struktur und Funktion der Gewebe und Organe im Körper eingesetzt wird. Es basiert physikalisch auf den Prinzipien der *Kernspinresonanz* und wird daher auch als *Kernspintomographie* bezeichnet (74).

³³⁹ *pulmonaler arterieller Hochdruck*

³⁴⁰ *gemäßigte maschinelle Beatmung*

³⁴¹ Traumen der Lunge, die durch den *Druck* und das *Volumen* der Beatmung hervorgerufen werden.

³⁴² Bei der *Hochfrequenzbeatmung* (*High Frequency Oscillation Ventilation*, HFOV) wird ein hoher kontinuierlicher alveolärer *Distensionsdruck* (ähnlich der *CPAP-Beatmung*) mit Hilfe eines hohen Gasflusses im Beatmungssystem (nicht zum Patienten) aufgebaut. Der Mechanismus des Gastransports zum Patienten unterscheidet sich grundlegend von anderen Beatmungsformen (72).

³⁴³ Die *Extracorporal Membrane Oxygenation* ist eine maschinelle extrakorporale Sauerstoffbeladung und *CO₂-Elimination* des Blutes im *Membranoxygenator* (1).

³⁴⁴ *inhalatives Stickstoffmonoxid*

³⁴⁵ *Prostaglandin E1*

den verschiedensten Gründen ziemlich weit. Eine umfassende Beratung in Bezug auf einen Schwangerschaftsabbruch stellt einen wichtigen Aspekt dar. Den Ergebnissen der Studie von Tonks *et al.* folgend, liegen die Raten für den Schwangerschaftsabbruch in England zwischen 9% bei isolierter CDH und bis zu 51% im Falle von mit der CDH assoziierten Anomalien. Es ist von großer Wichtigkeit, eine Beratung und Therapie an einem dafür spezialisierten Zentrum durchführen zu lassen, denn dies kann die Überlebensrate steigern. Zentralisiertes Management und größere Erfahrung in Bezug auf die Behandlung sind die wichtigsten Gründe dafür. Dies wurde durch das *Canadian Neonatal Network* bestätigt und es war zu beobachten, dass Zentren mit höherer Zahl von Behandlungsfällen (>12 CDH Behandlungen in der 22-Montasperiode) eine bis zu 13% höhere Überlebensrate verzeichnen konnten, als Zentren mit geringerer Zahl von Behandlungsfällen [334,349,350].

In Europa liegen die optimistischsten Überlebensraten von Zentren mit einer Fallzahl von über 25 Fällen pro Jahr (unter zusätzlicher Verwendung der ECMO) bei 70-75%. Man darf dabei allerdings nicht vergessen, dass ein Teil der Überlebenden im weiteren Verlauf eine Morbidität durch pulmonale, gastrointestinale Komplikationen (*gastroösophagealer Reflux*³⁴⁶ und Probleme der Nahrungsaufnahme), sowie Störungen des Gehörs und der Nervenentwicklung zeigen, die lange, oft auch auf die gesamte weitere Lebensspanne erweiterte Beobachtungen, im Sinne eines „*Follow ups*“, notwendig machen [334,351-353].

1.8.6. Vorhersage der PAH

Ein anderes große Problem der neonatalen Periode ist das Auftreten der PAH, die offenbar ihren Ursprung von den strukturellen Gefäßveränderungen nimmt.

Es lassen sich mit dem 2D- und 3D-Ultraschall³⁴⁷ sowohl Messungen der Gefäßdurchmesser, als auch der Fließgeschwindigkeit und des Volumens durchführen. Eine kanadische Arbeitsgruppe demonstrierte, dass der *Diameter*³⁴⁸ des ipsilateralen Lungengefäßhauptstammes mit der Schwere der Hypoplasie der Lunge, sowohl prä-, als auch postnatal, in Zusammenhang steht.

Ruano *et al.* etablierten hierzu Nomogramme für den Pulmonalarterienhauptstamm-Durchmesser, die eine Validation dieses Konzeptes ermöglichten [334,354-356].

Eine weitere diagnostische Methode ist der *Hyperoxygenierungs-Test*, der Veränderungen der fetalen Hämodynamik, wie sie nach der Geburt auftreten, imitiert. Bei diesem Test wird der Wert des *PI*³⁴⁹, im ersten Ast der kontralateralen Pulmonalarterie, vor und nach mütterlicher Applikation von 60% O₂ gemessen. Ein Abfall von >20% des *PI-Wertes* nach O₂-Exposition ist als reaktiv zu werten. In einer Studie an 22 Feten mit schwerer CDH, wurde, nach einer Evaluierung über 30 Wochen, festgestellt, dass ein reaktiver Test prognostische Aussagekraft bezüglich des Überlebens zeigte, während ein negativer Test ein gesteigertes Risiko für eine PAH und einen neonatalen Tod bedeutete.

³⁴⁶ Rückfluss von Magenflüssigkeit in die Speiseröhre (1)

³⁴⁷ Als *3D-Ultraschall*, auch *3D-Sonografie* genannt, wird die um eine Dimension erweiterte zweidimensionale Darstellung, beispielsweise bei Ultraschall-Untersuchungen im Rahmen der Pränataldiagnostik in der Schwangerschaft, bezeichnet. Die dreidimensionale Betrachtung (3D) ermöglicht eine *räumliche Darstellung* des ungeborenen Kindes bzw. einzelner Organe und Körperpartien (75).

³⁴⁸ Durchmesser

³⁴⁹ *Pulsatility Index*: Index der Pulswelle

Den Ausführungen von Doné *et al.* folgend, kann dieser Test leider nur in der späten Schwangerschaft durchgeführt werden [334,357,358].

1.8.7. Konsequenzen einer CDH und Interventionsmöglichkeiten

In milden Fällen einer CDH sind Überlebensraten von >60% zu verzeichnen und die Geburt sollte in einem entsprechenden medizinischen Zentrum geplant und durchgeführt werden.

Während bei Feten mit extremer Lungenhypoplasie (O/E LHR<15%) oder zusätzlichen Anomalien aufgrund der überaus schlechten Prognose ein Schwangerschaftsabbruch zu diskutieren ist, bestehen für Feten mit schwerer Hypoplasie (O/E LHR<25%) noch andere Optionen [334,340].

Di Fiore und Wilson brachten das Konzept der Förderung des Lungenwachstums durch die Anwendung der Methode der TO³⁵⁰ (Beschreibung: siehe **Kapitel 1.9**) hervor. Die Idee wurde durch eine Beobachtung an Feten mit angeborenem Verschluss der hohen Luftwege (*CHAOS*³⁵¹) geboren, die ein beeindruckendes Lungenwachstum zeigten. Wie in dieser Einleitung beschrieben, sezernieren die fetalen Lungen während der Schwangerschaft Flüssigkeit in die Luftwege, die einen positiven Druck unterhalb der Glottis hervorruft.

Die fetalen Atembewegungen erlauben dieser Flüssigkeit, aus den Luftwegen auszutreten und den Druck zu kontrollieren. Diese periodische Gewebedehnung ist wichtig für eine ausreichende Balance zwischen Wachstum und Differenzierung [391,334,359]. Die chirurgische TO macht sich dieses Prinzip zunutze, seine Effekte sind eine Funktion der Zeit und Dauer. Das bedeutet, dass es bei Anwendung der TO bis zur Geburt, trotz Lungenwachstums zu einer Beeinträchtigung der Reifung der Luftwegsepithelien kommt. Wird die TO noch *in utero* wieder entfernt (auch als „*plug-unplug-Sequenz*“ bezeichnet), erreicht man bessere morphologische Ergebnisse [334,360].

Nelson *et al.* beschrieben die besten morphologischen Ergebnisse bei einer 47-stündigen Okklusion, abwechselnd mit einem einstündigen offenen Intervall, zwischen dem 110. und dem 138. Tag der Gestation. Dieses „ideale Szenario“ ist allerdings am Menschen noch nicht zu erreichen. Bei der Durchführung der TO wird ein Ballon verwendet, der während der Phasen der Lungenentwicklung inseriert und dann wieder entfernt wird. Der Verschluss, die sogenannte TO, wird am menschlichen Fetus während der 26.-28. SSW durchgeführt und in der 34. Woche wieder entfernt (siehe **Abbildung 18**) [391,334,361].

1.8.7.1. Klinische Intervention

Die tracheale Okklusion (TO) wurde, wie beschrieben, ursprünglich über eine *Laparotomie*³⁵², *Hysterotomie*³⁵³, eine fetale *Neck Dissection*³⁵⁴ und ein *tracheales Clipping*³⁵⁵ durchgeführt, aber später über *fetoskopische*³⁵⁶ *tracheale Dissektion* und *Clipping* [210,334,362].

³⁵⁰ *Tracheal Occlusion*

³⁵¹ *Congenital High Airway Obstruction Syndrome*

³⁵² Die *Laparotomie* (Bauchschnitt) bezeichnet das Öffnen der Bauchhöhle zur Durchführung eines abdominal-chirurgischen Eingriffs an den inneren Organen (76).

³⁵³ Die *Hysterotomie* ist ein Schnitt zur Eröffnung der Gebärmutter (1).

³⁵⁴ operative Eröffnung des fetalen Nackens mit Darstellung der Trachea

³⁵⁵ Anbringung einer Spange oder Klammer (*Clip*) an der fetalen Luftröhre

³⁵⁶ Die *Fetoskopie* ist ein endoskopisches Verfahren zur Untersuchung des ungeborenen Kindes. Auf diesem Wege können dann auch operative Eingriffe vorgenommen werden (77).

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Ein *endotrachealer*³⁵⁷ Ballon, der am Schafsmodell zum ersten Mal angewendet wurde, eröffnete die Möglichkeit, die Trachea zu verschließen.

Der Ballon begleitete das Wachstum der Trachea, ohne dabei eine *Tracheomalazie*³⁵⁸ zu verursachen. Die Entfernung kann dann entweder über eine *Fetoskopie*, oder mittels ultraschall-geführter Punktion erfolgen. Anfangs wurden diese Eingriffe unter Allgemeinnarkose durchgeführt, doch man kann sie nun unter *Regional-* oder *Lokalanästhesie*³⁵⁹ und fetaler Sedierung bzw. Immobilisation durchführen.

Im Zuge der Anwendung der FETO³⁶⁰ kam es zu keinen mütterlichen Komplikationen, aber es trat in einem von vier Fällen eine *iPPROM*³⁶¹ mit *Amniorrhexis*³⁶² auf, die eine Erschwernis darstellte. Es wird weiterhin an einer Verbesserung der Therapie gearbeitet [380,334,363,364].

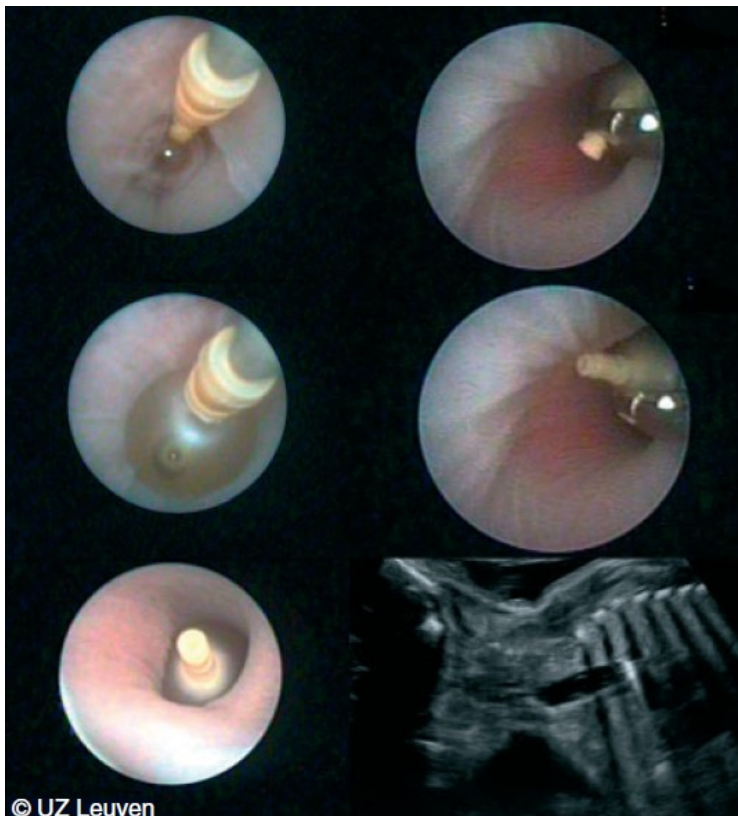


Abbildung 18:

Fetoskopische Darstellung der Platzierung des Ballons. Ein mit dem Ballon beladener Katheter wird zwischen der *Carina* (Knorpelstück der Trachea) und den *Stimmbändern* aufgeblasen und dann abgesetzt.

Das letzte Bild zeigt die Ultraschall-Aufnahme des platzierten Ballons.

Quelle: © Doné *et al.* [334]

Die Überlebensrate von Neugeborenen war im Vergleich der *pränatalen*³⁶³ zur *perinatalen*³⁶⁴ Entfernung des Ballons, bei pränataler Entfernung deutlich höher (83,3% vs. 33,3%). Hauptkriterien der Prognose sind hierbei Schwangerschaftsdauer bei Geburt und Lungengröße vor der Durchführung der FETO. Das bedeutet, dass Feten mit kleineren

³⁵⁷ innerhalb der Trachea (Lufttröhre)

³⁵⁸ Die *Tracheomalazie* ist eine Erkrankung, welche durch eine Erschlaffung der Lufttröhre gekennzeichnet ist. Die Ursache hierfür liegt in einer ungenügenden Stabilität der in der Lufttröhre befindlichen *Knorpelspannen*, was zu einem Kollaps der Lufttröhre, typischerweise zum Zeitpunkt der Einatemphase (fallweise aber auch der Ausatemphase), führt (78).

³⁵⁹ regionale oder örtliche Betäubung

³⁶⁰ *Fetal Tracheal Occlusion*

³⁶¹ Die *Iatrogenic Preterm Premature Rupture of the Membranes* ist eine *iatrogen* (durch eine medizinische Behandlung hervorgerufene) vorzeitige Ruptur der Fruchtblase (79).

³⁶² Verlust von Fruchtwasser (1)

³⁶³ vor der Geburt

³⁶⁴ während/im Zuge der Geburt

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Lungen schlechter auf die Therapie ansprechen, als solche mit größeren Lungen. Abgesehen davon ist die Zunahme des Lungenwachstums und Lungenvolumens ein unabhängiger prognostischer Faktor des Überlebens.

Die mangelnde Fähigkeit der Lunge, auf eine FETO-Therapie anzusprechen, führt beim Neugeborenen zu einer persistierenden pulmonalen Hypoplasie, die dann die Hauptursache des fetalen Todes darstellt [334,365,366].

Wie bei Doné *et al.* nachgelesen werden kann, haben Feten mit einer moderaten Hypoplasie der Lunge heute eine gute Prognose, wenn sie unter optimalen Bedingungen behandelt werden können. Für Feten mit schwerer oder schwerster Hypoplasie kann die minimal invasive fetale Therapie als Alternative zum Schwangerschaftsabbruch angeboten werden.

Kommt die FETO zur Anwendung, ist dies für die Mutter mit Konsequenzen verbunden. Sie muss sich in einem medizinischen Zentrum einfinden, in welchem diese Therapie angeboten wird und muss das Risiko einer möglichen *iPPROM* eingehen. Es ist notwendig, die Patientinnen stationär zu behandeln und zu beobachten um eine Balance zwischen den Vorteilen eines Verbleibs der Okklusion, und der Notwendigkeit einer Entfernung zu finden.

Im idealen Fall sollte der Ballon vor der Geburt entfernt werden, und das setzt viel Erfahrung und entsprechende Kenntnisse des medizinischen Fachpersonals voraus.

Diskutiert wird über das schlechtere Ansprechen der Lungenentwicklung bei Durchführung der FETO in der sakkulären Phase der Lungenentwicklung (>30. Woche), was aber den Vorteil bringt, das Risiko für eine *iPPROM* zu reduzieren [429,334].

1.9. Überblick über Behandlungsmöglichkeiten der CDH-bedingten Lungenhypoplasie und deren Erforschung an den verschiedenen Tiermodellen

Wie in dieser Einleitung schon angedeutet, sind das fetale Lungenwachstum und die Lungenreife stark von einer Dehnung des Lungengewebes durch die Flüssigkeit, die die zukünftigen Lufträume füllt, abhängig. Fetale Lungen von Säugetieren sezernieren während der Periode der Schwangerschaft Flüssigkeit, die, in Kombination mit den fetalen Atembewegungen, für eine normale Lungenentwicklung notwendig ist. Sowohl durch die tonische, als auch zyklische mechanische Dehnung, die durch den hydrostatischen Druck der Lungenflüssigkeit und durch die fetalen Atembewegungen ausgeübt werden, kommt es zur Stimulation der Proliferation von Zellen und damit zum Wachstum und zur Reifung des Lungengewebes [367].

Ein Verlust der fetalen Flüssigkeit, sei es durch ein Oligohydramnion oder eine Drainage bedingt, resultiert in einer geringeren Lungenreife und einem verringerten Lungenwachstum. Eine von Adzick *et al.* vorgenommene experimentelle Durchtrennung des zervikalen Rückenmarkes über dem Zentrum des N. phrenicus, verursachte ein Sistieren der fetalen Atembewegungen und führte damit zu einer pulmonalen Hypoplasie an fetalen Hasen und Schafen [80,368].

An der menschlichen Lunge mit komplettem Verschluss der Luftwege (bedingt durch laryngeale oder tracheale Atresie oder Agenesie), konnte das Auftreten einer starken Hyperplasie beobachtet werden. Die pulmonale Hyperplasie kann dabei so stark

ausgeprägt sein, dass sie zu *Inversion des Diaphragmas*³⁶⁵, *Mediastinalshift*, *Hydrops*³⁶⁶ und sogar zum fetalen Tod führt. Weiters zeigten diese hyperplastischen Lungen ein höheres Trockengewicht, wie auch eine höhere Zahl der Alveolen und Luftwege, als man in normalen Lungen des gleichen Stadiums erwarten würde [369].

Fast von Beginn der Lungenentwicklung an, wird vom pulmonalen Epithel Flüssigkeit produziert und diese Produktion prädominiert dann von der Mitte der Schwangerschaft an. Im letzten Drittel des fetalen Lebens von Schafen variierte diese Produktion von 2,7 bis 5,5 ml/kg/h. Diese Flüssigkeit hält das Lungenlumen frei von Amnionflüssigkeit und unterhält die Lungendehnung, die für die Entwicklung so wichtig ist [52,370].

In der Tat zeigten experimentelle und klinische Beobachtungen, dass die *TO*³⁶⁷ zu einem Anstieg des Trockengewichtes der Lunge, der Verzweigung der Luftwege und des pulmonalen Gefäßwachstums führte [455,371,372]. Als erste beschrieben Carmel *et al.* diese Methode und demonstrierten eine verbesserte Lungenfunktion in Tiermodellen mit CDH und Lungenhypoplasie [373]. In der Tat ist die intrauterine TO heute der potenteste und am weitesten verbreitete Stimulator des Lungenwachstums [374,375].

Die TO beeinflusst das Lungenwachstum vor allem während der kanalikulären und sakkulären Phase, einer Periode, in der die funktionellen Gasaustauscheinheiten erstmals erscheinen. Diese Periode wird nicht nur durch eine signifikante Zunahme des Lungenvolumens, sondern auch durch eine deutliche Zunahme der Zahl der pseudoalveolären Septen, der Ausdünnung des interstitiellen Gewebes und gesteigerten Entwicklung der Mikrogefäße, repräsentiert. Die sich entwickelnde Lunge vollzieht einen Wandel vom dichten zellulären Gewebe hin zu den flüssigkeitsgefüllten zukünftigen Lufträumen [375,376].

Intrauterine Experimente, die die Lunge mittels trachealer Blockade³⁶⁸ dehnten, demonstrierten einen Anstieg sowohl der alveolären Oberfläche und des Luftraum-Volumens, als auch eine stimulierte Bildung von Alveolen und von sekundäre Septen und führten zu Apoptose von interstitiellem Mesenchym und Typ-II-Alveolarzellen. Zusätzlich zeigte sich die Expression des Tropoelastins erhöht. Dies deutet darauf hin, dass die gesteigerte Elastin-Synthese in Reaktion auf die Dehnung, nicht nur die Lungengröße, sondern auch die Differenzierung der funktionellen Gasaustausch-Einheiten (Alveolen) fördert [458,377,378].

1.9.1. Das Schafsmodell

Das fetale Schafsmodell ist das bisher am häufigsten verwendete Modell zur Erforschung der Effekte der TO auf die Lungenentwicklung. In der Tat wurden die frühesten Experimente auf diesem Gebiet von Alcorn *et al.* [457] durchgeführt. Viele weitere Studien und Experimente sollten folgen [379,380]. Eine bemerkenswerte Anzahl von wissenschaftlichen Arbeiten hat zu einem gesteigerten Verständnis des Mechanismus, durch welchen mechanische Manipulation die Dehnung des Lungengewebes und damit das Lungenwachstum *in vivo* fördert, geführt.

³⁶⁵ Das Zwerchfell wird in die Bauchhöhle vorgewölbt

³⁶⁶ Beim *Hydrops fetalis* treten *generalisierte Ödeme*, *Pleuraerguss*, *Aszites* und häufig auch eine *Herzinsuffizienz* auf (1).

³⁶⁷ *Tracheal occlusion* (engl.): chirurgischer Verschluss der Trachea mittels einer Ligatur oder eines Clips [457].

³⁶⁸ durch Obstruktion, Verschluss oder Ligatur

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Speziell wurde die Aufmerksamkeit auf die Zeit der Okklusion gelenkt. Eine fetale TO in der mittleren Schwangerschaftsperiode (75-90 Schwangerschaftstage; Term=144 Schwangerschaftstage) führte zu einer stärkeren Steigerung des Wachstums des Lungengewebes, als wenn diese später in der Schwangerschaft durchgeführt wurde (114-128 Schwangerschaftstage), aber verursachte auch *fetalen Hydrops* und Veränderungen im Lungengewebe, die für den Gasaustausch hinderlich waren [465].

Bei einer Durchführung einer TO zwischen dem 112.-114. Schwangerschaftstag, im Vergleich zur TO am 125.-127. Schwangerschaftstag, zeigte letztere einen größeren Effekt auf die DNA-Synthese und den DNA-Gehalt der Lunge [463]. Dies könnte durch eine größere Sekretions-Rate der Lungenflüssigkeit zum späteren Zeitpunkt bedingt gewesen sein [463].

Die Kinetik des Lungenwachstums wurde von Harding und Hooper untersucht. Dabei wurden alle Tiere am 128. Schwangerschaftstag geopfert und die Länge der TO variierte bezüglich ihrer Dauer von zwei bis zu zehn Tagen (die TO wurde vom 118. bis zum 126. Schwangerschaftstag durchgeführt) [463,464].

Die maximale DNA-Syntheserate wurde zwei Tage nach der TO mit einem Anstieg von 777% gegenüber den Kontrolllevels gemessen [463]. Dieser Anstieg war vor allem auf die gesteigerten Mitoseraten der Typ II-Alveolarzellen, interstitiellen Fibroblasten und der Endothelzellen zurückzuführen [461]. Die DNA-Syntheseraten fielen vier Tage nach der TO ab, aber blieben signifikant über den Kontrollwerten erhöht [464]. Zehn Tage nach der TO erreichte die DNA-Syntheserate wieder den Basiswert.

Die Veränderungen der DNA-Synthese und des DNA-Gehaltes sind auf die Veränderungen des Lungenflüssigkeitsvolumens, aber nicht auf die Fluktuationen der intraluminalen Drücke zurückzuführen. Eine Vorbehandlung mittels Cortison führte zu einem Anstieg des DNA-Gehaltes drei Tage nach der TO und zu einer gesteigerten Produktion von Lungenflüssigkeit. Ein Bericht weist darauf hin, dass das auf die TO folgende Lungenwachstum auf Faktoren, die natürlicherweise in der Lungenflüssigkeit vorkommen, zurückzuführen war, da der Ersatz der Lungenflüssigkeit, durch eine tägliche Dosis einer gleichwertigen Menge von Kochsalzlösung, zu einem Abbruch des durch die TO hervorgerufenen Lungenwachstums führte [464,486,501].

Nach Berichten von Piedboef und Kollegen, hatte die TO auch Nebenwirkungen am Schaf, die sich in einer schnellen und tiefgreifenden Abnahme der Zahlen der Typ II-Pneumozyten, der Zellgruppe, die für die Produktion des Surfactants verantwortlich ist, zeigten. Zwei Tage nach der TO nahm die Zahl der Typ II-Pneumozyten um mehr als das Dreifache ab, was mit dem Auftreten einer vierfachen Anzahl von Zwischenstadien nicht voll differenzierter Pneumozyten koinzidierte. Die Proportion der Typ I-Pneumozyten stieg später an [467,381].

Das deutet darauf hin, dass eine steigende fetale Lungenausdehnung eine Differenzierung von Typ II- in Typ I-Pneumozyten über einen Intermediärtyp auslöst. Eine Entfernung der Okklusion oder Obstruktion vor der Geburt [382] oder eine nachgeburtliche Behandlung mit Steroiden [383], alleine oder in Kombination, kann die Zahl der Typ II-Pneumozyten stabilisieren bzw. verbessern. Leider gibt es zurzeit noch keine Langzeitstudien bezüglich des Effekts der TO auf die postnatale Lungenfunktion.

Mehrere Studien versuchten Wachstumsfaktoren, die die Beschleunigung des Lungenwachstums nach einer TO am Schafmodell medierten, zu ergründen. Zum Beispiel führte eine chirurgisch-induzierte Zwerchfellhernie zu einer Abnahme der Dehnung des Lungengewebes und der IGF-1-Expression [384] in fetalen Lungen, während die TO

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

dieses Expressionslevel wieder normalisierte und die Expression von IGF-2 und TGF β 2 sogar zu steigern vermochte [385].

Mit Hilfe der *RT-PCR* zeigten Gillet und Kollegen, dass auch die mRNA-Expression für *Calmodulin*³⁶⁹ an den Tagen zwei, vier und zehn nach einer TO erhöht war [386].

Die mRNA des Lungen-*Tropoelastins* zeigte sich, zwei Tage nach einer TO, in einer Studie von Joyce *et al.*, um das 2,5-fache erhöht, was mit einer Zunahme des Elastingehaltes korrelierte. Dieselbe Gruppe von Forschern führte auch eine Studie an 126 Tage-alten Schafen durch, in welcher der linke Hauptbronchus des fetalen Schafes für 36 Stunden okkludiert wurde, während die rechte Lunge als Kontrolle diente. In dieser Studie konnten 118 cDNA-Fragmente gefunden werden, die bei gesteigertem fetalem Lungenwachstum unterschiedlich reguliert waren. Mittels des *Northern-Blottings* bestätigten sich Veränderungen von zehn dieser Gene in einem separaten Anteil dieser Tiere.

Sieben dieser Gene waren hochreguliert, darunter: *Heat-Shock-Protein 47*³⁷⁰, *Thrombospondin-1*³⁷¹, *Trop-2*³⁷², *Tropoelastin*, *Tubulin- α 3*³⁷³, *Connective-Tissue-Growthfactor*³⁷⁴ und *Cystein-rich-angiogenic-inducer 61*³⁷⁵. Die verbleibenden drei Gene: *Ccsp*³⁷⁶-*related-protein-1*, *Elongation-factor 1 α* ³⁷⁷ und *Vitamin d₃-upregulated-protein-1 (Vdup-1)* waren herab reguliert [458].

Weiters stellten Filby und Mitarbeiter fest, dass *VDUPI*³⁷⁸ während der fetalen Lungenentwicklung bei Schafen erhöht, aber zwei bis zehn Tage nach der TO verringert war. Die immunhistochemische Analyse deutete darauf hin, dass VDUP1 im distalen präalveolären Parenchym, sowie auch in Typ I- und Typ II-Pneumozyten, reichlich vorhanden war. Die Autoren beobachteten auch, dass sich die VDUP1-Expression umgekehrt proportional zur Typ II-Pneumozyten-Differenzierung während des normalen Lungenwachstums verhielt [387].

Am Schafsmodell wurde die TO eingesetzt, um die Lungenhypoplasie, die durch Drainage der Lungenflüssigkeit, bilaterale fetale Nephrektomie, oder chirurgisch erstellte CDH hervorgerufen wurde, rückgängig zu machen. Es zeigte sich, dass die TO nicht nur das Defizit des Lungenwachstums korrigierte, sondern auch die ebenfalls auftretende Muskularisierung der feinen Gefäße (<100 μ m) reduzierte. Die Expression der mRNA für *Endothelin-1* und den Endothelin-Rezeptor A, die für ein Protein und seinen Rezeptor mit einem starken vasoaktiven und promotogenen Potential codieren, war in der Gruppe der DH³⁷⁹+TO höher als in Gruppen mit einer alleinigen DH. Der kombinierte Effekt von

³⁶⁹ Calmodulin ist ein Protein, das die Wirkung von intrazellulärem Ca²⁺ als *Second Messenger* vermittelt (1).

³⁷⁰ Heat shock proteine werden hochreguliert, wenn Zellen vermehrtem Stress oder gesteigerten Temperaturen ausgesetzt werden (51).

³⁷¹ Die *Thrombospondine* zeigen eine anti-angiogenetische Wirkung (52).

³⁷² *Tumor-associated calcium signal transducer 2*, Zelloberflächen-Rezeptor (53)

³⁷³ Tubulin- α 3 ist am Aufbau der Mikrotubuli beteiligt, die aus α - und β - Tubulindimeren aufgebaut sind (54).

³⁷⁴ CTGF stimuliert die Produktion extrazellulärer Matrix (55).

³⁷⁵ CYR61 ist ein extrazelluläres, Matrix-assoziiertes Signalmolekül und fördert die Adhäsion von Endothelzellen (56).

³⁷⁶ clara-cell secretory protein

³⁷⁷ Der *EF-1 α* entfaltet seine Wirkung auf *Aminoacyl-tRNAs* an den *Ribosomen* (Proteintranslation) (57).

³⁷⁸ *Vitamin D(3) upregulated protein 1 (VDUP1)* ist ein durch *1,25-Dihydroxyvitamin D(3)* hochreguliertes Protein und wird auch durch verschiedene andere Faktoren (wie z. B. TGF β -1) induziert (58).

³⁷⁹ diaphragmatische Hernie, Zwerchfellhernie

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Lungenwachstum und *Gefäß-Remodeling* war klar von Vorteil, wenn er in Bezug auf die Kurzzeit-Wiederbelebung betrachtet wurde [371,372,388-390].

Die TO führte, nach Berichten von Bratu *et al.*, im Vergleich zur alleinigen DH, zu einer Verschlechterung der Surfactant-Defizienz. Um diesem Problem vorzubeugen, wurde versucht, die Okklusion vor der Geburt zu entfernen, was leider einen nur geringen Vorteil bezüglich des Surfactant-Gehaltes brachte. Zusätzlich führte die Entfernung der Obstruktion zu einer Aufhebung der profitablen Effekte der TO auf das Remodeling des Gefäßbettes, was sich als schädlicher Einfluss bezüglich der Wiederbelebung herausstellte. Die Rolle der Supplementation des Surfactants zum Zeitpunkt der Geburt wurde kontrovers diskutiert. Studien von Nelson und Mitarbeitern zeigten, dass eine *zyklische Okklusion*³⁸⁰, während einer vierwöchigen Periode wiederholt durchgeführt, an fetalen Schafen mit einer DH die Entwicklung der Alveolen förderte, während sie die Population der Typ II-Pneumozyten erhielt. Leider wurden weder die veränderte Surfactant-Produktion, noch der Grad des Remodelings der Muskulatur der kleinen Arterien, oder das Ansprechen auf eine Wiederbelebung hierbei ausgewertet [388,391-393].

Nur die Forschergruppe um Davey [379] hat die Langzeit-Effekte der TO auf hypoplastische Lungen, induziert durch Flüssigkeits-Drainage, untersucht. Im Falle, dass fetale Schafe die TO überlebten, war ihre normale Lungenfunktion innerhalb von ein bis zwei Wochen wieder hergestellt. Eine negative Konsequenz zeigte sich allerdings bezüglich der Alveolen-Entwicklung, die insofern erhöht war, als sich weniger, dafür größere Alveolen in den ersten acht Lebenswochen, verglichen mit normalen Kontrollgruppen, ausbildeten. Die Effizienz der TO bei fetalen Schafen ist schwer einzuschätzen, da Überlebenszahlen bezüglich der Schafe fehlen, die eine intrauterine Lungen-Flüssigkeitsdrainage, aber keine TO erhalten haben [367,379].

1.9.1.1. Methoden um eine TO durchzuführen

Normalerweise wird die TO am Schaf mittels chirurgischer Naht [388], eines *umbilicalen Tapes* [371], oder durch einen *Latexballon* induziert [380]. Die Gruppe von Hooper entwickelte eine Technik, bei der die Trachea mit zwei *Silikongummi-Kathetern* kanalisiert wurde, von denen einer direkt in Richtung einer Lunge und der andere in Richtung des Larynx ausgerichtet wurde [463]. Diese Technik erlaubte nicht nur die Abgrenzung der Operations- von der Okklusionszeit unter Vermeidung von operativem Stress, sondern auch ein Monitoring³⁸¹ des Druckes der Lungenflüssigkeit und des Volumens. Nachdem eine TO am Menschen zum Geburtszeitpunkt reversibel sein muss, wurden die Techniken der TO-Erzeugung verbessert und schließen nun das fetoskopische Setzen von Ballons oder chirurgischen Clips mit ein [394]. Am Schaf wurde diese Technik durch die Anwendung einer *dualen Fetoskopie* unter Verwendung eines chirurgischen Clips [395] oder über eine Fetoskopie mit einem einzelnen Port unter Verwendung eines Ballons, verbessert [396].

Von David *et al.* wurde mittels einer perkutanen, ultraschallgeführten, *transthorakalen Punktion* der Trachea ein endotrachealer Ballon bei drei fetalen Schafen mit Erfolg platziert [367,397].

1.9.1.2. Stärken und Schwächen der TO-Studien an Schafen

Das Schafmodell der TO hat, laut Khan *et al.*, einige wenige, aber wichtige Grenzen.

³⁸⁰ 47 Stunden Verschluss, eine Stunde offener Zustand

³⁸¹ Überwachung

Es ist teuer, die Schafe zu kaufen, zu betreuen und unterzubringen. Die Operation am Schaf ist zeitaufwendig und mühsam, was alles zu einer Limitierung der Zahl der operativen Eingriffe führt. Des Weiteren können Schafe Überträger des *Q-Fiebers*³⁸² sein und schwangere Schafe sind häufig Überträgerinnen der *Rickettsien*³⁸³. Es ist wichtig und finanziell aufwändig, diese Schafe zu kontrollieren und zu zertifizieren.

Zusätzlich sind die chirurgischen Eingriffe hoch spezialisierten Einrichtungen vorbehalten. Es wurde nur ein kleiner Teil des Schaf-Genoms bisher entschlüsselt und es sind weniger Antikörper verfügbar, was die Möglichkeiten der Experimente mit Schafen weiter einschränkt [367].

1.9.2. Das Hasenmodell

Einige Gruppen haben an Hasen erfolgreich eine TO durchgeführt [374,398,399], um die Mechanotransduktion und die Apoptose während der Lungenentwicklung zu erforschen und um die Effekte der kombinierten TO bei einer DH genauer zu untersuchen. Wie in anderen Tiermodellen beobachtet, so führt die TO auch an fetalen Hasen zu pulmonaler Hypoplasie und gesteigerter Lungenreifung, was durch eine Abnahme des zellulären Interstitiums und die beschleunigte Ausdünnung der sich entwickelnden alveolären Wände in Erscheinung tritt [400]. Auch ein Nebeneffekt der TO, die Abnahme der Zahl der Pneumozyten vom Typ II, die mit einer Reduktion der Surfactant-Produktion einhergeht, zeigte sich in diesem Modell. De Paepe *et al.* [374] demonstrierten, dass die Antwort des Wachstums des Lungengewebes auf die TO davon abhing, wie hoch der **Grad der Entwicklung der Lunge vor der Okklusion** war. Es wird also in dieser Arbeit eher der Wert der späten Schwangerschaft, als der der Zeitspanne der Okklusion als kritische Determinante der Förderung des Lungenwachstums definiert [367].

De Paepe *et al.* gelangten auch zur Ansicht, dass die Wirkung der TO auf das Lungengewebe stark von der funktionellen Entwicklung des Lungenepithels abhing. Sie beschrieben ein **schlechteres Ansprechen von frühem Lungengewebe in der pseudoglandulären Phase** mit unreifem alveolären Epithel (Gestationstag 24), als dies bei reiferem Lungengewebe in der kanalikulär-sakkulären Phase (Gestationstag 27-28) der Fall war, das mehr und reifere Epithelzellen mit einer erhöhten Flüssigkeitssekretion zeigte und damit mehr Dehnungskraft hervorbrachte [367,374].

Wie im Schafmodell, so war auch hier das Lungenwachstum mit der Vermehrung der PTII-Zellen³⁸⁴ verbunden, gefolgt von PTII-Zellapoptose und überaus reduzierter interstitieller Zellintensität [374]. Weiters zeigten Hasenfeten mit TO und DH eine relativ normale Lungenstruktur, unabhängig davon, wann die TO durchgeführt wurde. Auch die Beobachtung, dass Feten mit CDH einen Surfactantmangel ausprägten, wurde am Hasenmodell gemacht [211].

De Paepe und Kollegen [466] hinterfragten und untersuchten dieses Detail und zeigten, dass eine TO, die am 24. Schwangerschaftstag durchgeführt wurde, während der ersten vier Tage mit einem Anstieg der Typ II- Alveolarzellen einherging.

Eine weitere Studie [211] kam zu dem Ergebnis, dass Okklusionen am 28. Gestationstag die mit der DH assoziierte Hypoplasie beheben bzw. mildern konnten. Diese Zellen scheinen auch einen adäquaten Anteil an Typ II-Pneumozyten zu haben, wie sich aus der Untersuchung mittels Immunhistochemie des Suractant-Proteins-A vermuten ließ [367].

³⁸²Das *Q-Fieber* ist eine *Zoonose*, durch das intrazellulär lebende, gramnegative Bakterium *Coxiella burnetii* hervorgerufen wird. Die Infektion manifestiert sich meist mit grippeähnlicher Symptomatik (1).

³⁸³ *Rickettsien* sind parasitäre Organismen, die sich in vielen *Vektoren* (Überträgern) vermehren. Beim Menschen verursachen sie eine ganze Reihe von Krankheiten, die als *Rickettsiosen* bezeichnet werden (1).

³⁸⁴ Typ II-Pneumozyten

Außerdem wird durch die TO die Dicke der Wand der Blutgefäße, die durch die DH gesteigert ist, ebenfalls korrigiert.

Die Balance zwischen Differenzierung, zellulärer Proliferation und programmiertem Zelltod ist ein kritischer Aspekt der Morphogenese der Lunge. Tatsächlich sind die späteren Stadien der Lungenentwicklung, wie die post-kanalikulären Stadien, durch Regression des interstitiellen Mesenchyms und des Epithels, gefolgt von einer Abflachung der verbleibenden Epithelzellen und dem Einwachsen von Gefäßen, charakterisiert. Der *programmierte Zelltod* oder die *Apoptose* stellt eine spezifische Form des physiologischen Zelltodes dar, der von der *Nekrose*³⁸⁵ durch beide, histologische und molekulare Gesichtspunkte, klar abzugrenzen ist.

Klassische apoptotische Signale werden entweder von den Mitochondrien gesteuert, oder sind Rezeptor-mediert. Der mitochondrial-medierte Zelltod bezieht die apoptotischen Faktoren der Bcl-2-Familie (BAX) ein, die auf externe Stimuli, wie *ionisierende Strahlung*, ansprechen. Auf der anderen Seite steht die Rezeptor-medierte Variante des Zelltodes, die sich der Untergruppe der TNFs³⁸⁶ bedient und den Signalweg des FasL/Fas³⁸⁷ verwendet [367,400,401].

Fas-Rezeptor-Proteine binden an den Liganden FasL, was wiederum zur Aktivierung von Caspasen³⁸⁸ führt, die dann die Zelle zerstören. Bei fetalen Hasen erscheint die PTII-Zellapoptose normalerweise am 28. Gestationstag (Übergang vom kanalikulären zum sakkulären Stadium). Dies geht offenbar mit einer Hochregulation des FasL einher. Sein Rezeptor Fas wird sowohl in PTII-Zellen als auch in bronchialen Epithelzellen während der Entwicklung exprimiert [367,401,402].

Wenn die TO am 28. Gestationstag durchgeführt wurde, zeigte sich eine dramatische Zunahme der PTII-Zell-Apoptose, was auch mit maximaler Dehnung der Lufträume einherging. Es kam auch zu einer gesteigerten Apoptose von interstitiellen Zellen, aber nicht von PTI-Zellen. Am Tag 26 und 27 der Schwangerschaft waren die Levels der FasL-Proteine gleich, sowohl in Lungen mit TO, als auch in normalen Lungen.

Allerdings waren am Tag 28 in der TO-Gruppe die Levels der FasL-Proteine signifikant erhöht, verglichen mit den Kontrollen. Es ergab sich eine Koinzidenz mit der durch TO induzierten Dehnung und der Apoptose der PTII-Zellen [367,402].

1.9.2.1. Methoden der Durchführung der TO am Hasenmodell

Die TO an Hasen wird am 28. Schwangerschaftstag (kanalikulär-sakkuläres Stadium) durchgeführt, was dem 125.-130. Gestationstag von Schafen und etwa 28-30 Wochen beim Menschen entspricht. Die Luftröhre wird mittels einer feinen chirurgischen Naht, oder durch intratracheale Instillation von *PFOB*³⁸⁹ verschlossen. Interessanterweise zeigte sich bei der letztgenannten Methode keine reduzierte Compliance der Lunge, im Vergleich zur chirurgischen Intervention [211,367,399].

1.9.2.2. Stärken und Schwächen des Hasenmodells

Das Hasenmodell hat gewisse Vorteile, weil Hasen größer als andere Nagetiere sind, im Vergleich zum Schaf weniger kosten und weil sie, anders als Nagetiere wie Mäuse oder

³⁸⁵ *pathologischer Zelltod* nach irreversiblen Ausfall der Zellfunktionen (1)

³⁸⁶ *Tumor-Nekrose-Faktoren*

³⁸⁷ Der FasL (Fas-Ligand) bindet an den Fas (Fas-Rezeptor) auf der Oberfläche der Zielzellen und aktiviert in diesen Zellen die entsprechenden Signalwege der *Apoptose* (1).

³⁸⁸ *Cystein-Proteasen*

³⁸⁹ *Perflouroctylbromid*

Ratten, ähnlich dem Menschen mit der Alveolarisierung schon vor der Geburt beginnen (siehe oben). Einen Nachteil stellen die begrenzt verfügbaren Gen- und Proteinsequenzen dar und die dadurch eingeschränkten biologischen Möglichkeiten [211,367].

1.9.3. Das Rattenmodell (*Rattus norvegicus*)

Die pulmonale Hyperplasie, die nach der am Tag 20-21,5 (kanalikulär-sakkuläre Phase) erfolgten TO auftritt, ist mit jener konsistent, die in anderen Tiermodellen beschrieben wurde. Unterschiede zeigten sich, wenn die TO in der pseudoglandulär-kanalikulären Phase (Schwangerschaftstag 18,5) durchgeführt wurde, denn dann zeigte das Lungengewebe keine signifikante Entwicklungssteigerung, auch wenn die Ligatur über 1,5 Tage beibehalten wurde.

Resultate der morphometrischen Analyse³⁹⁰ zeigten, dass das Wachstum nach erfolgter TO (TO>20. Gestationstag) beide Bereiche, das Parenchym und den sakkulären Luftraum eher, als non-parenchymatöse oder -sakkuläre Septen betraf. Außerdem fiel auf, dass die TO das Lungenvolumen, die Oberflächenregion, das parenchymale Volumen, sowie die Gesamtzahl und Radien der Sacculi steigerte, ohne dabei die Luftwegsverzweigung zu beeinflussen [367,403].

Eine wichtige Rolle im Rattenmodell spielte die Forschung an CDH und TO. Besonders am Nitrofen-induzierten Rattenmodell der CDH, entsteht die DH während des Stadiums früher Lungenentwicklung in der Embryogenese (13-14 Gestationstage). Diese nicht chirurgisch induzierten DHs scheinen ähnlich den menschlichen CDHs zu sein, die auch während der frühen Embryogenese (etwa in der 6. SSW) entstehen. Im Gegensatz dazu, wird am Schafs- und Hasenmodell die DH erst in der späten Schwangerschaft, während der pseudoglandulären Phase der Lunge (75-85 Gestationstage am Schaf und 23 Gestationstage am Hasen), chirurgisch erzeugt [367,403].

Nach Chapin *et al.*, interferiert die CDH mit zwei *mechanischen Hauptmechanismen*, die für die Förderung des Lungenwachstums bekannt sind. Als erstes gestattet die Hernie, wie schon beschrieben, dem Inhalt der Bauchhöhle den Übertritt in den Thoraxbereich, was die Lunge beengt und komprimiert, und zweitens unterbindet die CDH die zyklische Gewebedehnung, die durch die fetalen Atembewegungen hervorgerufen wird. Das Fehlen dieser Atembewegungen könnte zu einem exzessiven Verlust an Lungenflüssigkeit durch den offenen Larynx führen, was wiederum eine Abnahme der statischen Dehnung hervorrufen könnte [367,403].

Die Tatsache, dass Nitrofen an fetalen Ratten eine CDH hervorruft und zu hypoplastischen Lungen führt, wurde durch Kitano *et al.* bestätigt [404]. In ihrer Studie über das Verhältnis von LW/BW^{391} , trockenem LW/BW , sowie auch DNA-Gehalt und Proteingehalt pro Körpergewicht, fanden sie heraus, dass diese Parameter alle signifikant reduziert waren, wenn man sie mit denen von normalen Feten ohne CDH verglich. Weiters wurde über den hyperplastischen Zustand der TO-Lungen berichtet, auch im Vergleich mit Non-CDH-Gruppen, und auch über die Daten der LW/BW , des trockenen LW/BW und des Gesamtproteingehalts/ BW , die alle signifikant gesteigert waren.

Lungen mit CDH und TO waren größer und zeigten ein gesteigertes Volumen von Parenchym und Gasaustausch-Oberfläche. Das Lungenwachstum vollzog sich innerhalb des Parenchyms und der sakkulären Lufträumen eher, als in den non-parenchymatösen und sakkulären Septen [367,405].

³⁹⁰ Strukturellen Analyse

³⁹¹ Lungengewicht/Körpergewicht (Ratio)

Signifikante Anstiege betrafen sowohl das trockene, als auch das feuchte Lungengewicht innerhalb von 24 Stunden nach einer TO. Darüber hinaus produzierte die TO am Schwangerschaftstag 20–21,5 (kanalikulär-sakkuläre Phase) ein stärkeres Lungenwachstum, im Vergleich zu einer TO, die 24 Stunden früher durchgeführt wurde. Die TO am Schwangerschaftstag 18,5 (pseudoglandulär-kanalikuläre Phase) führte zu keiner signifikanten Steigerung des Lungenwachstums, auch nicht bei einer Verweildauer über 1,5 Schwangerschaftstage. Die Stimulation des Lungenwachstums durch die TO beruht, laut Meinung der Autoren, auf *mechanischen Mechanismen*, die nur funktionieren, wenn genügend Zellen, die Lungenflüssigkeit sezernieren, vorhanden sind und auch ausreichende Reifegrade zeigen, so dass sich ausreichend Flüssigkeit in der Lunge ansammeln kann. Diese Flüssigkeit dehnt dann wiederum das Lungenepithel.

Chapin *et al.* kamen durch die Beobachtungen an ihrem Nitrofen-Rattenmodell einer CDH und TO zum dem Schluss, dass die Wachstumsstimulation in der kontralateralen Lunge ausgeprägter, als in der ipsilateralen Lunge³⁹² erschien. Sie merkten an, dass die CDH und die TO die Reifung der PTII-Zellen förderten (und auch die Expression ihres zellspezifischen Markers RTI-40) und die Expression der Homeobox, einschließlich des Ttf1³⁹³, reduzierten. Ttf1 könnte in der Spätgestation direkt die Surfactant-Expression beeinflussen [367,403].

1.9.3.1. Methoden zur Durchführung der TO am Rattenmodell

Intrauterin wurde die TO durch Verwendung einer 9-0, oder 8-0 Nylon-Ligatur durchgeführt [391]. Yoshizawa *et al.* [406] verwendeten den *Microcauter*³⁹⁴ um eine TO zu produzieren.

Die linksseitige CDH bei Ratten wurde durch die Verabreichung von 100 mg *Nitrofen* an die Mutter am Tag 9 der Gestation hervorgerufen [367,404].

1.9.3.2. Stärken und Schwächen des Rattenmodells

Die Vorteile des Rattenmodells liegen, wie bei Khan *et al.* nachzulesen ist, sicher in seinen geringen Kosten und einem gut charakterisierten Genom. Allerdings limitieren die geringe Größe und hohe Verletzlichkeit der fetalen Rattenlungen vor dem 18. Gestationstag die Anwendung der TO in diesem Modell auf einen relativ späten Zeitpunkt der Schwangerschaft.

Ein **weiterer Nachteil ist, dass Nitrofen selbst, also auch in Abwesenheit einer CDH, eine Lungenhypoplasie hervorrufen kann**, wie dies bezüglich einer defekten Verzweigungsmorphogenese beobachtet wurde [322,367].

1.9.4. Das Mausmodell

Erste Versuche der intrauterinen chirurgischen Durchführung einer TO gelangen im Jahr 2003 durch Maltais und Kollegen. Der offenbar signifikanteste Effekt der TO ist die Förderung von schnellem Lungenwachstum. Außerdem wurde eine steigende zelluläre Proliferation und Apoptose 24 und 36 Stunden nach der TO beobachtet. Die Analyse zeigte, dass ein 24 Stunden dauernder trachealer Verschluss Fortschritte in der morphologischen Lungenentwicklung, dem Äquivalent von mindestens drei Schwangerschaftstagen entsprechend, ergab.

³⁹² Lunge auf der Seite des Zwerchfelldefektes (gleichseitig)

³⁹³ *Thyroid-transcription-faktor 1*

³⁹⁴ Das *Elektrotom* ist ein chirurgisches Gerät, das besonders in der Mikro- und Tumorchirurgie eingesetzt wird. Es ermöglicht das chirurgische Schneiden und die gleichzeitige Blutstillung (1).

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Eine 36-stündige Okklusion führte zu einer Steigerung der Lungenentwicklung, die 5 Schwangerschaftstagen entsprach [367,375].

Während einer Analyse der perinatalen Periode der normalen Lungenentwicklung der Maus (16,5. Gestationstag bis Tag 2 postnatal), beobachtete man, dass Apoptose und Proliferation im Lungengewebe in einem *wellenartigen Muster* mit einem *proliferativen* Anteil am Schwangerschaftstag 17,5, und einem *apoptotischen* Anteil am 2. Tag nach der Geburt, auftraten. Diese beiden separaten, aber fortlaufenden Prozesse, überlappen sich während der normalen Lungenentwicklung zeitweise und erreichen zu unterschiedlichen Zeitpunkten ihre Peaks. Demnach kann der stimulierende Effekt der TO auf das Lungengewebe nicht nur in Form der Steigerung der Proliferation oder Apoptose gesehen werden.

Es wäre vermutlich besser, eine *temporäre Veränderung*, die die Zeit bis zum Erreichen des nächsten Peaks der Proliferation oder der Apoptose reduziert, zu definieren. Zusammengefasst führte die TO am Schwangerschaftstag 16,5, auf rapide und signifikante Weise, zu einem Fortschritt der Zeitlinie der epithelialen Zellproliferation und mesenchymalen Zellapoptose, die während der normalen Lungenentwicklung auftreten. Die Dehnung stimulierte fast sofort die Transkription, sodass eine schnelle und weitverzweigte *Mechanotransduktion* in der sich entwickelnden Lunge als Antwort auf eine steigende Ansammlung von Flüssigkeit im Lungenlumen gebildet wurde.

Insgesamt betonen Khan *et al.* in ihrer Publikation, dass die TO die Schwangerschaftszeit bis zum Erreichen der natürlichen Peaks der Proliferation und Apoptose der normalen Lungenentwicklung reduzierte und dadurch zu einer Beschleunigung des Lungenwachstums führte [367,400].

1.9.4.1. Methoden der Durchführung der TO an der Maus

Üblicherweise wird die Operation an Mäusen am Gestationstag 16,5, in der frühen kanalikulären Phase, durchgeführt, da frühere Eingriffe sich als nicht erfolgreich, aufgrund der reduzierten Größe und der erhöhten Fragilität der Trachea, erwiesen haben. Frühere Interventionen sind unpassend, da frühe Obstruktion in der Schwangerschaft mit einer Veränderung des Wachstumsmusters in der Lunge assoziiert ist. Unter allgemeiner Narkose der Muttermaus mittels Isofluran, wird ein Fetus teilweise freigelegt, die Trachea wird dargestellt und mittels eines kleinen chirurgischen Clips okkludiert. Die Schwangerschaft wird dann bis zum jeweiligen Zeitpunkt des Experimentes fortgeführt. Jeder Fetus, der im Experiment Verwendung finden soll, muss die folgenden Kriterien erfüllen: Herzschlag, gute Durchblutung, normales Erscheinungsbild und vorhandenes spontane Bewegungen des Körpers. Die fetale Überlebensrate bei TO liegt heute bei etwa 80% [465,367].

1.9.4.2. Vorteile und Nachteile des Maus-Modells

Die Vorteile des Maus-Modells liegen in seinen sehr geringen Kosten in Bezug auf Kauf und Versorgung der Tiere. Darum kann man Experimente in diesem Modell mit entsprechend hohen Zahlen an Tieren durchführen und statistisch relevante Zahlen erreichen. Das Mausmodell ist das beliebteste Modell mit der weitesten Verbreitung in der Wissenschaft.

Weiters ist das Mausgenom gut identifiziert und es sind umfangreiche wissenschaftliche Daten über die Genfunktion und deren Expression verfügbar. Es sind große Mengen an Antikörpern und biologischen Reagenzien für Mäuse erhältlich.

Eine Schwäche des Modells betrifft die sehr geringe Größe der fetalen Lungen, was ausgedehnte physiologische Studien, wie sie an Schafen durchgeführt werden, unmöglich macht [367].

Außerdem ist die chirurgische Intervention an Mäusen sehr zeitaufwendig und mühsam und die Operationen sind auf einen Fetus pro Mutter begrenzt, da Interventionen mit einer Dauer von mehr als 60 Minuten mit einem starken Anstieg der Aborte einhergehen [367,375].

1.9.5. Die TO und die Entwicklung der Lungengefäße

Der Prozess der vaskulären Entwicklung wurde in vielen Studien untersucht [407,408].

Es existieren auch wissenschaftliche Berichte über die vaskuläre Lungenentwicklung der Maus [409,410]. Die Entwicklung des pulmonalen Gewebes und der Gefäße der Lunge ist sehr fein geregelt. Tatsächlich zeigte sich, dass Störungen der fetalen Lungenentwicklung häufig mit Defiziten und/oder Defekten der Gefäße einhergingen. Es lässt sich daraus ableiten, dass die Hypoplasie der Lunge auch zu Abnormalitäten der Lungengefäße führen kann. Die TO fördert offenbar nicht nur die Bildung einer verbesserten Oberfläche für den Gasaustausch, sondern führt auch zu einem Remodeling der pulmonalen Gefäße und zu einer Stimulation der endothelialen Zellproliferation [367].

1.9.5.1. Spezifische Faktoren der Gefäßentwicklung

Viele Faktoren wirken zusammen, um die komplexe Architektur der normalen fetalen Lungengefäße zu etablieren. Der beste und bekannteste Faktor ist, wie bereits erwähnt, der VEGF-A³⁹⁵. Seitdem bekannt ist, dass diese Expressionslevels sensitiv auf mechanische Faktoren reagieren, sind einige auffallende Aspekte hervorzuheben.

Durch *alternatives Splicing*³⁹⁶ entstehen vier Isoformen des Proteins VEGF: VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₅, die über zwei Tyrosinkinase-Rezeptoren wirken: Flt-1 (VEGFR-1) und Flk-1 (VEGFR-2). Das Protein VEGF-A wird in angrenzenden endothelialen Zellen, wie Epithelzellen, exprimiert, in welchen es in der basalen Membran unterhalb der Epithelzellen der Luftwege zu finden ist. Die Lokalisation des VEGF-A-Proteins könnte für die Entwicklung kleiner Gefäße von entscheidender Bedeutung sein, da diese Gefäße beide VEGF-Rezeptoren exprimieren.

Eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren stimuliert die Synthese von VEGF. In den Lungen beinhalten diese: PDGF, TGF- α und - β , IGF-1, die FGFs und den keratinocyte growth factor (KGF). Zusätzlich fördern hypoxische fetale Bedingungen die von HIF³⁹⁷- α abhängige Expression von VEGF-A, was VEGF-A den Mitgliedern der hypoxie-induzierbaren Gene zuordenbar macht.

Ein anderer Aspekt unterstreicht die Wichtigkeit des VEGF-Pathways³⁹⁸, was die Beobachtung bestätigt, dass die Zerstörung der Zielstrukturen von Vegf-a zu starker Desorganisation des Blutgefäßmusters mit dem Auftreten von zerstreuten endothelialen Zellen führt und damit schwer genug ist, um bereits eine Letalität in der Mitte der Schwangerschaft zu verursachen [367,411-417].

³⁹⁵ *Vascular endothelial growth factor*

³⁹⁶ Das *alternative Spleißen* stellt einen besonderen Vorgang im Rahmen der *Transkription* dar. Aus ein und derselben DNA-Sequenz und dementsprechend ein und derselben prä-mRNA können mehrere verschiedene reife mRNA-Moleküle, und durch deren Translation auch mehrere unterschiedliche Polypeptide oder Proteine, gebildet werden (59).

³⁹⁷ *Hypoxia inducible factor*

³⁹⁸ Signalwege

Weiters spielen 0-Allele³⁹⁹ von *Flk-1*-Genen eine Rolle in der Differenzierung und/oder Proliferation der endothelialen Zellen, da die betroffenen Mäuse in einer Studie von Shalaby *et al.* einen signifikanten Mangel dieser Zellen und eine minimale Ausprägung von Gefäßen aufwiesen. Im Gegensatz dazu, zeigten *Flt-1*-Null-Mäuse normale hämatopoetische Vorläufer- und reichlich Endothelzellen. Diese Zellen setzten sich, den Beobachtungen von Fong und Mitarbeitern folgend, allerdings zu keinen Schläuchen oder Gefäßen zusammen.

Die Behandlung von neugeborenen Ratten mit einem Hemmstoff des Vegf-Rezeptors resultierte in reduzierter Lungengefäß-Dichte und verschlechterter Alveolarfunktion.

VEGF scheint die sich entwickelnden Gefäßwände, durch Förderung der Entwicklung der periendothelialen Zellen, zu stabilisieren. VEGF führt auch zu einem Anstieg der vaskulären Permeabilität um das etwa 50.000-Fache, induziert die endotheliale *Fenestrierung*⁴⁰⁰ und stimuliert die Proliferation der Endothelzellen [367,411,418-420].

1.9.5.2. Die Effekte der TO auf die vaskuläre Entwicklung

Wie schon erwähnt, ist die Dehnung ein wichtiger Induktor der Entwicklung der Lungengefäße. Tatsächlich steigert die Gewebedehnung die Levels der *Vegf-a*-mRNA und der Proteine in Kulturen von gemischten pulmonalen Zellen von fetalen, neonatalen und adulten Mäusen. An einem Modell der Zwerchfellhernie (DH) von Muratore *et al.*, führte die TO, durch die Erzeugung einer kontinuierlichen, tonischen Lungendehnung, zu einem Anstieg der *Vegf-a*-mRNA-Levels im Vergleich zur alleinigen DH. Im gleichen Modell beschleunigte die TO das Wachstum der großen Gefäße und der Kapillaren, reduzierte die gesteigerte Muskularisierung der pulmonalen Arterien, die in experimentellen Studien der DH beobachtet wurde, und brachte die erhöhte Ultrastruktur-Komponente der Kapillarwände und das *kapillar-alveoläre Interface*⁴⁰¹ wieder auf Normalwerte zurück [367,421].

Luks und Mitarbeiter beschrieben in ihrer Studie, dass Tiere mit einer DH und einer TO einen höheren Prozentsatz von nichtmuskulären Arterien aufwiesen, als dies in den Kontrollgruppen der Fall war, was vermuten ließ, dass die TO auch einen Entwicklungsprozess, der normalerweise postnatal auftritt, beschleunigen könnte. Aus diesen Beobachtungen schlossen die Autoren darauf, dass die TO die pulmonale Entwicklung der Arterien und Alveolen förderte, indem sie die Mechanismen, die für eine normale Lungenentwicklung notwendig sind, verstärkte. Gleiche Ergebnisse brachten ein chirurgisches Hasenmodell der DH mit einer TO und ein Rattenmodell mit Nitrofen-induzierter DH und TO, das von Kitano *et al.* untersucht wurde [367,405,422,423].

Die TO könnte besonders wichtig in der sakkulären Phase der Lungenentwicklung sein, denn eine Entfernung der TO, eine Woche vor der Geburt, führte in einer Untersuchung von Bratu und Kollegen zu keiner Ausdünnung der anormal muskularisierten, kleinen pulmonalen Arterien bei Schafen mit einer DH [388]. Es wurde auch gezeigt, dass Änderungen der fetalen Lungendehnung an Ratten auch die Expression von Vegf-a betrafen [411]. In diesem Modell beschleunigte die TO die Zeit, die zum Erreichen eines normalen, reifen Musters der Expression von *Vegf-a*-mRNA und Vegf-a-Protein notwendig war. Die Autoren zogen daraus den Schluss, dass die Mechanismen, die die normalisierende Einflusskomponente der TO auf die defekten Gefäße in den DH-Lungen ausmachten, die stimulierende Expression von Vegf mit einbezogen [367].

³⁹⁹ fehlende Allele

⁴⁰⁰ Bildung von Öffnungen und Poren („Fenster“) im Endothel (1)

⁴⁰¹ Schnittstelle zwischen Kapillaren und Alveolen

Kinder mit CDH-bedingter pulmonaler Hypertension weisen abnorm dicke, präazinäre Arterien und Arteriolen auf. Hier dehnt sich die circumferierende Muskularisierung der Blutgefäße mehr in die Peripherie des vaskulären Bettes aus, als in altersentsprechenden normalen Lungen. Zusätzlich ist ein Anstieg in subendothelialen und adventitialen, Elastin-haltigen Bindegewebsschichten in den pulmonalen Arterien und Venen zu verzeichnen. Allerdings war die Zahl der Kapillaren pro Alveolus nicht auffallend verändert, doch die Zahl der Alveolen war im Falle einer CDH reduziert [367].

Diese Veränderungen führen zu einem Anstieg des *pulmonal-vaskulären Widerstandes*.

Am Schafsmodell mit einer chirurgisch induzierten CDH, **normalisierte eine kurzzeitige TO eine schwere pulmonale Hypertension praktisch vollständig**. Außerdem wurde dabei die übersteigerte Muskularisierung der Arteriolen durch die TO auf präazinäre Levels zurückgeführt. Der exakte Mechanismus, durch welchen die Entwicklung der Gefäße mit der gesteigerten Dehnung des Lungengewebes zusammenhängt, bleibt noch unbekannt. Trotzdem zeigt sich, dass die TO eine Dehnung des Lungengewebes induziert, wodurch sie auch einen wichtigen Einfluss auf die Modulation der Levels der Expression von Faktoren, wie VEGF, der wiederum das Wachstum der Gefäße und deren Differenzierung fördert, ausübt.

Weiters ergibt sich, als Antwort auf eine TO, auch eine Auswirkung auf andere Faktoren, wie Angiopoietin⁴⁰², PDGF und deren Rezeptoren, was das Verständnis der pulmonalen Gefäßentwicklung vertiefen wird [367,422,424].

1.9.5.3. Zukünftige experimentelle Richtungen der TO

Khan *et al.* sind der Ansicht, dass die weitere Verwendung des TO-Modells das Verständnis für die Rolle, die die mechanische Kraft während der Lungenentwicklung spielt, verbessern wird. Die Fertigstellung von „*Post-TO-Langzeitstudien*“ am Tiermodell ist, laut Khan *et al.*, notwendig, um den Gebrauch der TO zu unterstützen und die Mechanismen der TO an menschlichen Feten mit CDH genauer zu untersuchen. In den letzten Jahrzehnten wurden die Überlebenschancen für Kinder mit einer CDH stark verbessert, vor allem auch durch die Behandlung dieser Patienten in hochspezialisierten medizinischen Einrichtungen.

In diesem Zusammenhang ist besonders die Auswertung von Langzeitoutcomes wichtig.

Bisher haben Studien an fetalen Schafen mit einer CDH und TO nur das kurzzeitige Ansprechen auf die TO untersucht. Deshalb wären hier, laut Meinung der Autoren, dringlich Langzeitstudien mit Beobachtung des Outcomes notwendig, die am Tiermodell mit CDH unter TO sowohl die Lungen-, als auch die Gefäßentwicklung über einem klinisch relevanten Zeitrahmen analysieren [367].

1.9.5.4. Ein Modell, das die Dehnung, Lungenentwicklung und TO analysiert

In diesem Modell von Khan und Mitarbeitern [367] geht es um die Analyse der Rolle der Zellen und der Gewebedehnung während der Lungenentwicklung. Es basiert auf der Beobachtung, dass dehnende Kräfte zwei spezifische strukturelle Elemente in den Alveolen beeinflussen. Es wird darüber spekuliert, dass die Steifigkeit an den Ecken eines Alveolus größer ist, als an seinen freien Wänden. Durch die strukturelle Komplexität, bedingt durch die Verankerung mit anderen Alveolen, stellt eine Ecke die am meisten rigide⁴⁰³ Region eines Alveolus dar. Darum wird die dehnende Kraft nicht gleichmäßig verteilt [367].

⁴⁰² Die Wandausbildung der Gefäße wird u. a. durch Angiopoietin-1 reguliert (1).

⁴⁰³ starr

In diesem Modell wird die Kraft effizienter über die unflexiblen, konkaven Strukturen der Ecken, als über die beweglicheren und durch Zellproliferation wachsenden, freien Wandanteile der Alveolen übertragen. So wird von Khan *et al.* die Anwesenheit eines *Dehnungsgradienten*, der in der Mitte dieser freien Wände sein Maximum zeigt, angenommen.

In einer unreifen Lunge wird das Epithel aus reifen und unreifen Zellen zusammengesetzt, die nach dem Zufallsprinzip um die Alveolen verteilt sind. Bereits in frühen Entwicklungsstadien differenzieren die PTII- zu PTI-Zellen. In diesem Stadium kommen auch mehr *Lipofibroblasten*⁴⁰⁴ als *Myofibroblasten*⁴⁰⁵ vor.

Mit dem Auftreten der Dehnungskräfte wird angenommen, dass ein Dehnungsgradient die Zelldifferenzierung fördern könnte. Andererseits wurde bereits demonstriert, dass kontinuierliche Dehnung die Differenzierung von PTII- zu PTI-Zellen fördert. Demzufolge wird in diesem Modell angenommen, dass die Prädominanz von PTII-Zellen an den Ecken der Alveolen, das Resultat der Wirkung des Dehnungsgradienten darstellen könnte [467,367,425].

Möglicherweise wird an den Ecken ein *Schwellenwert der Dehnung*, der groß genug wäre, um die Transdifferenzierung von PTII-Zellen auszulösen, nicht erreicht [367].

Auch in anderen wissenschaftlichen Arbeiten war davon die Rede, dass kontinuierliche Dehnung die Differenzierung der Myofibroblasten förderte, wie dies beispielsweise in der Publikation von Torday und Mitarbeitern beschrieben wird [426]. Die Annahme in diesem Modell deutet an, dass Lipofibroblasten eher in Bereichen zu finden sind, die geringeren Dehnungskräften ausgesetzt sind (an den Ecken der Alveolen) und dort in engem Kontakt mit den dort ebenfalls vorhandenen PTII-Zellen stehen, die ihre Rolle in Bezug auf die Synthese des Surfactants oder den Lipid-Transport spielen können.

Auf der anderen Seite spielen Myofibroblasten, laut den Berichten von Mitchell *et al.*, eine entscheidende Rolle bei der Bildung neuer Septen. Es wird daher angenommen, dass ein Dichtegradient der Myofibroblasten zwischen den Ecken der Alveolen und der Mitte der freien Septen entstehen könnte.

Außerdem wird darüber spekuliert, dass die Sprossung der Gefäße, die eine andere essentielle Komponente der Septenbildung darstellt, durch die Anwesenheit von (Myofibroblasten-ähnlichen) *Perizyten*⁴⁰⁶ beeinflusst werden könnte, die in enger Beziehung zu den endothelialen und epithelialen Zellen stehen [547,367].

Als einen weiteren wichtigen Aspekt ihres Modells, führen Khan *et al.* in ihrem Artikel an, dass die, die Spitze der alveolären Septen umgebende Region, durch eine verlangsamte Rate der Zellteilung charakterisiert ist, die andererseits ihr Maximum in unmittelbarer Umgebung der freien Wand zeigt [367].

Dafür werden von den Autoren folgende zwei Fakten verantwortlich gemacht:

Einerseits ist offenbar nicht anzunehmen, dass die Natur einen anderen Entwicklungsprozess in diesem Stadium, in welchem sich die Alveolen an den distalen Enden dieser Verzweigungen befinden, zur Anwendung bringt, nachdem dieses

⁴⁰⁴ *Lipofibroblasten* sind innerhalb des alveolären Interstitiums lokalisiert und können an ihren charakteristischen *Lipid-Tröpfchen* erkannt werden. Sie befinden sich im basalen Bereich der Typ II-Alveolarepithelzellen (60).

⁴⁰⁵ Sie stellen eine *Zwischenform* zwischen *glatter Muskelzelle* und *Fibroblast* dar und enthalten kontraktile *Aktin-* und *Myosin-Filamente* sowie eine hohe endogene Produktion von *Kollagen* (1).

⁴⁰⁶ *Pericyten* sind Zellen, die der Außenwand von kleinen Blutgefäßen (Kapillaren) anliegen. Sie gehören zu den Bindegewebszellen (1).

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Wachstums-Muster bereits bei der Verzweigung der Luftwege erfolgreich zur Anwendung kam [367,427].

Andererseits ist eine reife Lunge durch eine hohe Luft-/Gewebe-Fraktion charakterisiert. Wenn die Septen aber nun innerhalb der Alveolen sprossen würden, käme es zur Bildung von sehr dichtem Gewebe mit einer niedrigen Luft-/Gewebe-Fraktion.

Es ist vermutlich die dehnbare, freie Wand, die sich aus einem Alveolus heraus wölbt, wobei die vergleichsweise unbiegsameren Septen in der Mitte unberührt bleiben. Mit anderen Worten bleiben die Septen statisch, während sich die freien Wände aufgrund der zellulären Proliferation und der mechanischen Dehnung auswärts dehnen. Wenn man sich also die Septen dreidimensional vorstellt, erscheinen sie wie ein Ring, mit Myofibroblasten und Elastin an ihren Spitzen, die eine Dehnungsresistenz ausprägen (**siehe Abbildung 17**) [367,547].

Die TO stellt ein wertvolles Werkzeug zur Untersuchung der Mechanotransduktion in sich entwickelndem Lungengewebe dar. Mit zukünftiger technischer Verbesserung, nebst verbesserter Patienten-Nachsorge, könnte die TO ein immer verlässlicheres und effektiveres Mittel der klinischen Intervention werden [367].

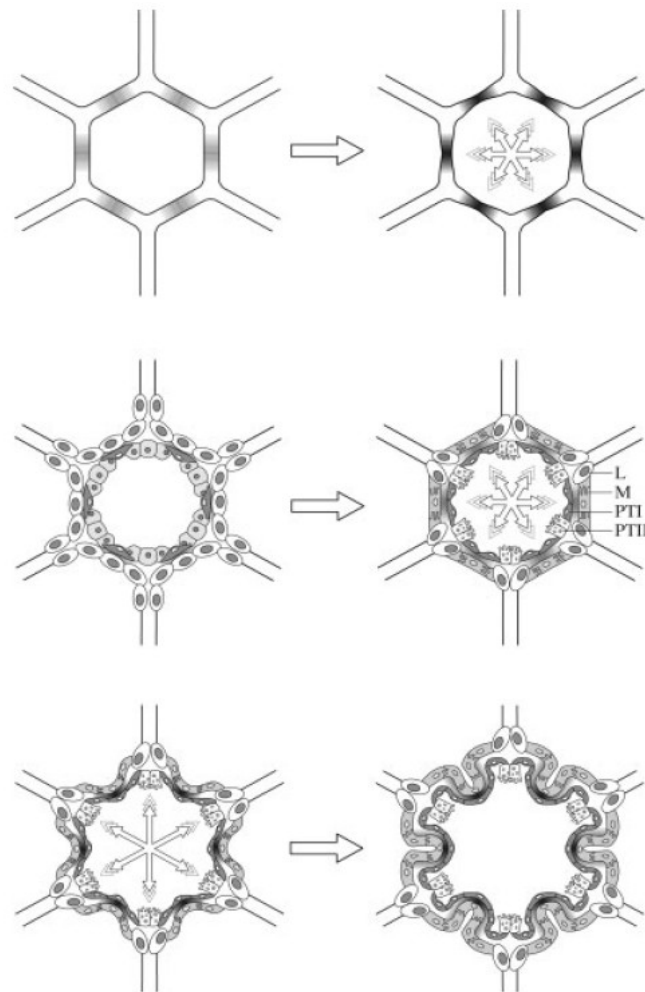


Abbildung 17:

Die linke Seite jeder Abbildung repräsentiert einen Alveolus vor der Dehnung (durch die TO), die rechte Seite den Alveolus nach der Dehnung (nach der TO).

Die multidirektionalen Pfeile innerhalb des Lumens eines Alveolus deuten die Dehnungskräfte an.

Die **oberste Abbildung** zeigt das Schema eines Alveolus ohne Zellen.

Nachdem die Ecken der Alveolen relativ rigide sind, werden hauptsächlich die mittleren Wände gedehnt (siehe Text).

Die **mittlere Abbildung** zeigt das Schema eines Alveolus mit zusätzlich abgebildeten Zellen.

Vor der Dehnung (TO) prädominieren auf der epithelialen Seite undifferenzierte Pneumozyten, sowie Pneumozyten vom Typ II (**PTII**).

Die Lipofibroblasten (**L**) dominieren auf der Seite des Mesenchyms.

Nach der Dehnung dominieren die Typ I-Pneumozyten (**PTI**). Die Typ II-Pneumozyten bleiben in den Ecken erhalten, die einer geringeren Dehnung ausgesetzt sind. Auf der mesenchymalen Seite fördert die Dehnung die Differenzierung der Myofibroblasten (**M**), die damit zu einem prädominierenden Zelltyp werden. Die verbleibenden Lipofibroblasten sind nahe den Typ II-Pneumozyten in den Ecken des Alveolus zu finden.

Die **unterste Abbildung** zeigt ein schematisches Modell der Bildung der sekundären Septen des Alveolus und deutet an, dass unter der Proliferation der freien Wand sich nicht das Septum in das alveoläre Lumen vorwölbt. Es sind eher die weniger steifen, freien Wände des Alveolus, die sich durch den Druck vorwölben. Elastin ist als dunkle Struktur an den Spitzen der sich vorwölben Myofibroblasten

abgebildet. Quelle: © Khan *et al.* [367]

1.9.6. Andere Teratogene, die eine CDH induzieren können

Zusätzlich zu Nitrofen kann eine CDH auch durch viele andere Teratogene, wie Schwermetalle und antientzündliche Medikamente, verursacht werden. *Cadmium* kann ein ganzes Spektrum an angeborenen Defekten und am Stamm der *Wistar Rats* auch eine CDH hervorrufen. Die Mechanismen hierzu sind noch nicht bekannt.

Helfen kann dabei die Verabreichung von antioxidativ wirkendem *N-Acetyl-Cystein*, weil es in Experimenten einem oxydativen Schaden, den man durch Cadmium vermutete, vorbeugen konnte. Cadmium kann auch oxydativen Stress in der Niere verursachen und über Schädigung der $Na^+/K^+-ATPase$ ⁴⁰⁷ zu Bluthochdruck führen [367,428,429].

An Nagetiermodellen können zwei Substanzen, nämlich *SB-202235* und *SB-210661* (beide sind Derivate des *Benzofuranyl-Harnstoffes*), die 5-Lipoxygenase⁴⁰⁸ (5-LOX) hemmen und damit die Bildung von *Leukotrienen*⁴⁰⁹ und der *Hydroxyecosatetraen-Säure*⁴¹⁰ blockieren. Solomon *et al.* beobachteten auch, dass beide Substanzen, sowohl *SB-202235*, als auch *SB-21066*, eine CDH hervorrufen können, wobei die Letztere eine höhere Potenz zeigte [430].

Der Zusammenhang zwischen der Hemmung der 5-Lipoxygenase und der Entstehung der CDH ist unklar. Mey *et al.* vermuteten, dass *SB-21066* die Oxidation von *Retinaldehyd* zu *Vitamin A-Säure* durch Hemmung der RALDH verhindern könnte. Dies würde zu einer Abnahme an Vitamin A-Säure führen und somit der Symptomatik einer *VAD*, oder einem Mangel an Vitamin A-Säure, ähnlich sein. Eine andere Beobachtung bezieht sich auf die Hemmung der 5-LOX. Sie metabolisiert die EPA⁴¹¹ zu LTB5⁴¹².

Die somit steigenden Spiegel an EPA üben eine anti-inflammatorische⁴¹³ Wirkung im Organismus aus und die daraus folgende Hemmung der Migration und Aktivierung der Phagozyten könnte zur Entstehung einer CDH beitragen [570,367,431].

Andere „anti-inflammatorische“ Substanzen, wie *AH23848*, ein Thromboxan A₂⁴¹⁴-Blocker, kann die *Thrombozyten-Aggregation*⁴¹⁵ sowohl *in vivo*, als auch *in vitro*, hemmen [432].

⁴⁰⁷ Die *Natrium-Kalium-ATPase* (genauer: $3 Na^+/2 K^+-ATPase$), auch als *Natrium-Kalium-Ionenpumpe* bezeichnet, ist ein in der Zellmembran verankertes *Transmembranprotein*. Das Enzym katalysiert, unter *Hydrolyse* von *ATP* (*ATPase*), den Transport von Natrium-Ionen aus der Zelle und den Transport von Kalium-Ionen in die Zelle gegen den chemischen *Konzentrationsgradienten* und den elektrischen *Ladungsgradienten* (61).

⁴⁰⁸ Die *Arachidonat-5-Lipoxygenase* ist das Enzym, das *Arachidonsäure* in zwei Schritten zu *Leukotrien A4* oxidiert. Mit dieser Reaktion beginnt die Biosynthese der stabileren *Leukotriene B4* bis *E4*, die als Hormone in Säugetieren wirken. In Pflanzen wird anstelle von *Arachidonsäure* die *Linolsäure* oxidiert. Entsprechend kommt *5-LO* in Säugetieren und Pflanzen vor. Beim Mensch ist sie in allen Gewebetypen zu finden (62).

⁴⁰⁹ *Leukotriene* wurden in *Leukozyten* (weißen Blutkörperchen) entdeckt und sind chemisch von der *Arachidonsäure*, einer vierfach ungesättigten Fettsäure, abgeleitet. Sie besitzen *drei konjugierte Doppelbindungen* und gehören zur Stoffgruppe der *Eikosanoide*. Ihre Rolle im Stoffwechsel steht im Zusammenhang mit *allergischen* bzw. *entzündlichen* Reaktionen des Körpers (z. B. *Asthma bronchiale*) (63).

⁴¹⁰ ein Derivat der *Arachidonsäure* (4-fach ungesättigte Fettsäure). *Arachidonsäure* wird in jedem tierischen Organismus aus der essentiellen Omega-6-Fettsäure *Linolsäure* über die Zwischenstufen γ -*Linolensäure* (GLA) und *Dihomo- γ -linolensäure* (DGLA) synthetisiert, oder über die Nahrung aufgenommen. Sie findet sich als Bestandteil von *Lipiden*, wie etwa *Phospholipiden* (64).

⁴¹¹ *Eicosapentaensäure*

⁴¹² *Leukotrien B5*

⁴¹³ entzündungshemmend

⁴¹⁴ *Thromboxan* (oder genauer: *Thromboxan-A2* oder kurz: *TXA2*) ist ein *Prostaglandin*, das durch die *Thromboxan-Synthase* unter Vermittlung der *Cyclooxygenase* aus *Arachidonsäure* über *Prostaglandin H2*

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Die Mechanismen, die zu einer CDH führen könnten, sind noch unbekannt.

Man vermutet, dass die Teratogenität von AH23848 auf einem chemischen Spaltprodukt beruht, nämlich dem *4-Biphenyl-Methanol*, das wiederum zu *4-Biphenyl-Carboxylsäure* (BCA) oxidiert wird, wie bei Sutherland *et al.* zu lesen ist.

Mey *et al.* demonstrierten, dass BCA die RALDH *in vitro* hemmen konnte [570,367,433].

COX1- und *COX2* –Hemmer⁴¹⁶, wie Aspirin®, führten in einer Studie von Cappon und Mitarbeitern am Ratten-Modell [434] zu ventrikulären Septumdefekten und, nach Verabreichung an den Tagen 9-10, auch zum Auftreten einer CDH. Der Mechanismus ist nicht klar, aber Reixach *et al.* vermuten in ihrer Publikation, dass Aspirin®, wie auch andere NSAID⁴¹⁷, ihre Teratogenität über die Bindung von Transthyretin⁴¹⁸, dem Hauptcarrier der RBPs⁴¹⁹ im Serum, ausüben könnten [435]. Durch Beeinflussung oder Verhinderung der TTR-RBP-Interaktion, könnte so im Embryo mehr Retinol freigesetzt werden.

Aspirin® kann zusätzlich noch die *Carboanhydrase*⁴²⁰ hemmen, allerdings führte dieser Effekt alleine nicht zu teratogener Wirkung. Sie entstand erst aus der Kombination mit der Hemmung der *COX1/2* [436].

Eine weitere Möglichkeit, wie *COX1*-/*2*- und *LOX-5*-Hemmer ihre Teratogenität verursachen könnten, wäre, laut den Untersuchungsergebnissen von Rordorf und Kollegen [437], die Hemmung der Blutplättchen-Aggregation durch eine Reduktion der Kollagen-Expression. Nachdem Kollagen einen Hauptanteil am Diaphragma darstellt, könnte die verringerte Kollagensynthese zu einer reduzierten Widerstandsfähigkeit des Zwerchfells, somit zu einer leichteren Ruptur der Leber in den Thoraxbereich und damit auch zu einer Förderung der Entstehung einer Hernie führen. Es ist auch auffällig, dass Patienten mit Kollagen-Erkrankungen, wie dem *Ehlers-Danlos-Syndrom*⁴²¹, zur Entstehung einer CDH neigen [367,438].

gebildet wird. Es vermittelt seine Wirkungen über den *Thromboxan-Rezeptor*, einen membranständigen *G-Protein-gekoppelten Rezeptor* (65).

⁴¹⁵ Zusammenlagerung, Bildung von Aggregaten

⁴¹⁶ *Cyclooxygenasen (COX)* sind die wesentlichen Enzyme am Anfang der *Prostaglandinsynthese* aus *Arachidonsäure*, der *DGLA* oder der *Eicosapentaensäure*. Dieser Schritt wird durch *Nichtsteroidale Antiphlogistika* gehemmt und ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der *Prostaglandinsynthese*. Die *COX* haben daher eine zentrale Funktion in der *Regulation des Entzündungsgeschehens* (66).

⁴¹⁷ Nichtsteroidale Antiphlogistika

⁴¹⁸ *Transthyretin (TTR; Thyroxin bindendes Präalbumin, TBPA)* ist ein Serum-Transportprotein in Wirbeltieren, das beim Mensch vorwiegend im *Plexus choroideus* und in der Leber gebildet wird. Es ist am Transport der *Schilddrüsenhormone* beteiligt (67).

⁴¹⁹ *Retinol-bindende Proteine* sind Transportproteine im Blutplasma und im Zytosol von Wirbeltierzellen. Sie binden an freies Vitamin A (*Retinol, Retinal, Retinsäuren*) und verhindern so unkontrollierte Wirkungen dieser Moleküle (68).

⁴²⁰ Die *α -Carboanhydrasen (α -CAs)* sind Enzyme, die die *Hydratisierung* von Kohlenstoffdioxid zu Kohlensäure (=Hydrogencarbonat) und umgekehrt katalysieren (69).

⁴²¹ Das *Ehlers-Danlos-Syndrom (EDS)* gehört zu einer Gruppe von genetischen *Bindegewebserkrankungen*, die durch eine erhöhte *Elastizität* der Haut, sowie eine ungewöhnliche Zerreißbarkeit derselbigen, gekennzeichnet sind (70).

1.10. Physiologische Mechanismen des normalen und veränderten Lungenwachstums

Das Überleben nach der Geburt hängt in entscheidendem Masse von der Fähigkeit der Lunge ab, den Austausch der respiratorischen Gase in einer Form durchzuführen, die den metabolischen Anforderungen des Neugeborenen entspricht. Dazu ist es nötig, dass die Lunge ausreichend gewachsen ist und sich zum Zeitpunkt der Geburt strukturell, physiologisch und biochemisch ausreichend entwickelt hat. Die Lunge muss ein kompliziertes System von Luftwegen etablieren, das eine Luftströmung in die Lunge und aus der Lunge, bei geringem Widerstand, ermöglicht [439].

Die innere Oberfläche muss groß und vom Gefäßnetzwerk durch eine dünne Schicht von Gewebe getrennt sein. Die mechanischen Eigenschaften der Lunge müssen ausreichend gereift sein, um eine Ausdehnung der Lunge während der Inspiration bei geringem Kraftaufwand zu ermöglichen, aber andererseits einen ausreichenden Lungenwiderstand für die Expiration erhalten, um einen Kollaps der Atemwege am Ende der Expiration zu vermeiden [439].

Normalerweise sind diese Eigenschaften bei gesunden Kindern bereits zum Zeitpunkt der Geburt etabliert, auch wenn die Lunge *in utero* noch nicht am Gasaustausch teilnimmt. Wenn eine Beeinträchtigung der fetalen Lungenentwicklung auftritt, kommt es zur *Ateminsuffizienz*, der häufigsten Ursache von Morbidität und Mortalität in der Neugeborenen-Periode. Die Ateminsuffizienz kann entweder durch eine unzureichende Entwicklung *in utero*, aufgrund einer Frühgeburt, oder durch Umgebungsfaktoren oder genetische Faktoren hervorgerufen werden, die die Lungenentwicklung stören [439].

Während des fetalen Lebens sind die zukünftigen Luftwege mit einer Flüssigkeit gefüllt, die vom Lungenepithel produziert wird. Diese Flüssigkeit ist ein Produkt des *Fluxes*⁴²² von Chlorid-Ionen über die Lungenepithelzellen und spielt eine kritische Rolle bei der Lungenentwicklung, indem sie die zukünftigen Luftwege in einem gedehnten Zustand hält. Durch diese Flüssigkeit wird auch ein Eintritt der Amnionflüssigkeit in die Lunge verhindert, die einen zerstörenden Effekt auf das Lungenepithel ausüben kann [439,440].

Das Volumen dieser Flüssigkeit in den zukünftigen Luftwegen und ihr Flux in die Luftwege hinein und aus den Luftwegen heraus, werden durch die fetale muskuläre Aktivität, sowie auch durch Veränderungen der Lagerung und andere Faktoren, die den transpulmonalen Druck verändern, beeinflusst. Durch das Aufrechterhalten eines gedehnten Zustandes der Lunge, dient die fetale Lungenflüssigkeit als eine Art „*Schiene*“, um welche sich die distalen Luftwege entwickeln, wie dies Harding *et al.* beschreiben [441].

Es ist auch offensichtlich, dass es, ohne diese Dehnung des Lungengewebes, zu keinem Wachstum und keiner ausreichenden strukturellen Reifung kommen kann. Wissenschaftler haben herausgefunden, dass die *metabolische* und *endokrine* Umgebung des Fetus, wie die Verfügbarkeit von Mikronährstoffen (beispielsweise Vitamin-A-Säure), in der fetalen Lungenentwicklung eine bedeutende Rolle spielen [441].

1.10.1. Physiologische Kontrolle der fetalen Lungenentwicklung

Die fetale Dynamik der Lungenflüssigkeit und Lungendehnung wurde in Studien mit katheterisierten fetalen Schafen durch Verwendung der Indikator-Verdünnungsmethode

⁴²² Strömung

untersucht, um somit das Lungenflüssigkeitsvolumen beurteilen zu können. Ihr Fluss innerhalb der Trachea wurde dabei ebenfalls beurteilt [442,443].

In oben erwähnter Studie, die von Harding und Hooper [441] während der letzten Hälfte der Schwangerschaft von Schafen durchgeführt wurde, stieg das Flüssigkeitsvolumen in der fetalen Lunge stark an und war während der letzten Schwangerschaftswoche größer, als das funktionelle Residualvolumen der luftgefüllten Lunge nach der Geburt. Die basalen Lungenflüssigkeitsvolumina lagen zwischen 35 und 45 ml/kg bei fetalen Schafen in der späten Schwangerschaft [444], während das funktionellen Residualvolumen bei neugeborenen Schafen zwischen 25 und 30 ml/kg lag [445].

Das hohe Maß, in welchem die fetale Lunge gedehnt wird, wird durch die fetale Aktivität und dabei besonders durch die fetalen Atembewegungen und die *Glottis*⁴²³ beeinflusst [446]. Dies deutet darauf hin, dass der Fetus aktiv am Erhalt seines Lungenvolumens teilnimmt. Ein weiterer Einfluss wird durch den transpulmonalen Druckgradienten ausgeübt, der wiederum durch den *intrathorakalen* und *intrauterinen* Raum beeinflusst wird [439].

Demzufolge wird darüber berichtet, dass das Lungenvolumen von toten, anästhesierten oder paralysierten Feten häufig unterschätzt wird, weil unter diesen Bedingungen Lungenflüssigkeit verloren geht [446].

Sowohl die mütterlichen Wehen, als auch die Reduktion der Amnionflüssigkeit, führen zu einer Reduktion des Lungenflüssigkeitsvolumens durch komprimierende Kräfte, die auf den Fetus einwirken und damit den transpulmonalen Druck erhöhen [447]. In der Abwesenheit von Wehen wird das Volumen der Lungenflüssigkeit bei gesunden Feten hauptsächlich durch den transpulmonalen Druck und die fetale Muskelaktivität bestimmt. Veränderungen der Sekretion der Lungenflüssigkeit führen zu keinem Effekt auf das Volumen der Lungenflüssigkeit, denn sie werden von korrespondierenden Effekten des *Effluxes*⁴²⁴ der Flüssigkeit beantwortet [448].

Die Rate dieses Flüssigkeits-Effluxes der fetalen Lunge über die Trachea hängt sowohl vom Druckgradienten zwischen dem Lungenlumen und der Fruchtblase (*transpulmonaler Druck*), als auch vom Widerstand der oberen Luftwege ab. Dieser wird, wie gesagt, vor allem durch die Glottis beeinflusst [449].

Bei Abwesenheit der fetalen Atembewegungen (beispielsweise bei fetaler *Apnoe*⁴²⁵), ist der intrapulmonale Druck etwa 1 bis 2 mmHg höher, als jener in der Fruchtblase [450], was hauptsächlich durch die Retraktionskraft des Lungengewebes und den Widerstand der Glottis bedingt wird [451]. Während der Apnoe ist der Efflux der Flüssigkeit über die Trachea geringer, als seine Produktionsrate und so kumuliert die Flüssigkeit innerhalb der Lunge [6]. Während der Episoden der fetalen Atembewegungen wird der Widerstand gegen den Efflux der Flüssigkeit durch phasische Abduktion der Glottis reduziert [449], was einen verstärkten Flüssigkeitsausstrom aus der Lunge ermöglicht [6]. Demzufolge besteht, trotz rhythmischer Kontraktionen des Zwerchfells, ein Netto-Verlust an Flüssigkeit aus der Lunge während der fetalen Atembewegungen, der zwei- bis dreimal größer ist als jener, während der Apnoe-Perioden [452].

Obwohl die Flüssigkeit manchmal während veränderter fetaler Atembewegungen und Veränderungen der Funktion der oberen Luftwege in die Lunge einströmen kann, besteht ein Netto-Fluss aus der Lunge [449]. Dieser essentielle unidirektionale Fluss unterhält in den Luftwegen konstante chemische Bedingungen und schränkt damit das Eindringen von

⁴²³ Kehldeckel

⁴²⁴ Ausfluss

⁴²⁵ Atemstillstand

potentiell schädlichen Substanzen der Amnionflüssigkeit (wie beispielsweise *Mekonium*) ein [453].

Der transpulmonale Druckgradient und damit der Efflux der Lungenflüssigkeit werden auch durch externe Faktoren, wie den abdominalen Druck, beeinflusst [447]. Veränderungen der fetalen Haltung (beispielsweise die Beugung des Körperstammes) führen zu einer Steigerung des abdominalen Drucks, steigern den transpulmonalen Druckgradienten und führen somit zu einer Reduktion des Lungenvolumens [447]. Solche Veränderungen der fetalen Körperhaltung können eine Folge von fetalen Bewegungen, oder solche von Kontraktionen des Uterus sein, oder auch durch eine Einschränkung des intrauterinen Raumes in Folge eines Oligohydramnions, bedingt sein [447].

Das Auftreten eines Oligohydramnions zwingt den Fetus in eine Position der gesteigerten Krümmung der Wirbelsäule und diese Flexion erhöht den abdominalen und transpulmonalen Druck und bedingt dadurch einen verstärkten Flüssigkeits-Efflux aus der Lunge und ein reduziertes Lungenvolumen. Dies stellt den häufigsten Grund einer Lungenhypoplasie in Assoziation mit Oligohydramnion dar [447]. Evidenz bezüglich der Beeinflussung des Lungenwachstums und der Lungenentwicklung wurde, laut Harding und Hooper [439], durch die fetale Lungendehnung in Experimenten gewonnen, bei welchen die fetale Lunge chronisch drainiert wurde, um eine Entleerung der Flüssigkeit zu verursachen, oder die fetale Trachea zum Zwecke der Flüssigkeitsakkumulation obstruiert wurde.

Im Vergleich zu Feten der Kontrollgruppe, führte die Hemmung der fetalen Atembewegungen, hervorgerufen durch eine Durchtrennung des fetalen Rückenmarkes [454], oder eine selektive Blockade des *N. phrenicus*, wie sie von Miller *et al.* [446] vorgenommen wurde, zu einer Abnahme des Volumens der fetalen Lungenflüssigkeit um etwa 25%, was die Wichtigkeit der Zwerchfellaktivität bei der Erhaltung des Volumens der fetalen Lungenflüssigkeit erkennen ließ.

Der unabhängige Effekt der fetalen oberen Luftwege bezüglich des Erhalts des Volumens der fetalen Lungenflüssigkeit, ließ sich durch die Reduktion des Lungenflüssigkeitsvolumens in Folge der Anlage eines Bypasses der oberen Luftwege (Eliminierung des Widerstandes der oberen Luftwege), zusätzlich zur Aufhebung der fetalen Atembewegungen, demonstrieren [439].

1.10.1.1. Effekte einer reduzierten Lungendehnung auf das fetale Lungenwachstum

Eine Reduktion der fetalen Lungendehnung kann eine schwere Hypoplasie, verzögerte strukturelle Entwicklung der Lunge und Veränderungen der Proportionen der Alveolarepithelzell-Phänotypen hervorrufen [439]. Diese Veränderungen hängen vom Grad der Reduktion der Lungendehnung ab. Eine verlängerte 25%ige Reduktion der Lungendehnung ruft eine etwa 25%ige Reduktion des Lungenwachstums [454] hervor, während eine totale *Deflation*⁴²⁶ der Lunge, wie es in der Publikation von Nardo *et al.* [455] beschrieben ist, zu einer Beendigung des Wachstums des Lungengewebes führt.

Die Mechanismen der Reduktion des Lungenwachstums sind nicht bekannt, aber es wurde eine Reduktion der Genexpression des *Igf-2*⁴²⁷ an zwei separaten Modellen mit reduzierter Lungenexpansion beobachtet [454,456]. Das normale *Remodeling*⁴²⁸ des Lungenparenchyms ist bei einer Reduktion der fetalen Lungenexpansion ebenfalls stark verzögert [457]. Im Speziellen sind die interalveolären Gewebsvolumina und Distanzen

⁴²⁶ Vollständiger Ausfluss der Lungenflüssigkeit

⁴²⁷ *Insuline-like growth factor 2*

⁴²⁸ Umbau

stark erhöht, was zu einem Anstieg der Blutgas-Diffusionsbarriere und damit zu einer reduzierten Diffusionskapazität der Atemgase führt [457].

Weiters ist der Prozess der Alveolarisierung in hohem Maße abgeschwächt, was zu einer merklichen Reduktion der Anzahl der Alveolen [457] und gesteigerten Elastin-Ablagerung in den Wänden der Sacculi⁴²⁹ führt [458]. Die fetale Lungenhypoplasie wird auch durch die Reduktion der Entwicklung des Gefäßbettes der Lunge charakterisiert, was dadurch erkennbar ist, dass eine verlängerte Reduktion der fetalen Lungenexpansion auch das Wachstum des Lungengefäßbettes beeinflusst [439]. Das Alveolarepithel der Lunge wird durch die prolongierte Reduktion der Lungenexpansion ebenfalls beeinträchtigt [459].

Es besteht eine Evidenz dafür, dass eine reduzierte Lungenexpansion die Differenzierung von

Typ I- in Typ II-Alveolarepithelzellen beeinflusst [459] und dies deutet darauf hin, dass Typ I-Zellen nicht terminal differenziert sind und sich, laut Shannon *et al.* [460], somit in Typ II-Zellen differenzieren können.

1.10.1.2. Effekte einer gesteigerten Lungenexpansion

Eine prolongierte *Hyperexpansion*⁴³⁰ der fetalen Lunge stellt einen potenten Stimulus für das Lungenwachstum und das Gewebe-Remodeling dar und wird experimentell durch eine Obstruktion der Trachea induziert [461]. Die gesteigerte Zellproliferation der Lunge ist zeitabhängig und auf das expandierte Lungengewebe beschränkt [462]. Die fetale Antwort des Lungenwachstums auf diese Obstruktion hängt vom Stadium der Lungenentwicklung ab, in welchem sie durchgeführt wird.

Während des alveolären Stadiums stieg in einer Studie von Keramidaris und Mitarbeitern [463] der DNA-Gehalt der Lunge bei fetalen Schafen innerhalb von zwei Tagen nach der trachealen Obstruktion an und das gesteigerte Wachstum vollzog sich über etwa sieben Tage.

Nardo *et al.* [464] berichteten sogar über eine annähernde Verdoppelung des DNA-Gehaltes. Die Beendigung des gesteigerten Wachstums kam möglicherweise durch die Beschränkung durch die Brustwand zustande und dies verhinderte die weitere Expansion der Lunge. Im Gegensatz dazu, zeigte sich während des pseudoglandulären und frühen kanalikulären Stadiums der Lungenentwicklung des Schafes (Tag 80 bis 100) kein messbarer Anstieg nach zwei Tagen der trachealen Obstruktion [463], aber fallweise kam es dann im späteren fetalen Leben zu einem stärkeren Anstieg des DNA-Gehalts (fallweise sogar um bis zu 200%) [465].

Ähnliche Ergebnisse lieferten Studien von De Paepe und Mitarbeitern an fetalen Hasen [466].

Die an älteren Feten beobachtete, geringere Rate der Beschleunigung des Lungenwachstums nach trachealer Obstruktion, ist, nach den Ergebnissen von Keramidaris *et al.* [463] zu urteilen, möglicherweise die Folge einer geringeren *Compliance*⁴³¹ der Lunge und demzufolge einer niedrigeren Rate der Lungenexpansion. Der höhere Anstieg des DNA-Gehaltes der Lunge bei jüngeren Feten ist eventuell durch eine höhere Compliance der Thoraxwand bedingt, die den Lungen einen höheren Grad an Expansion gestattet, als dies bei älteren Feten der Fall ist [465]. Die Antwort des Lungenwachstums auf die Expansion hängt auch vom Stadium der Lungenentwicklung ab. Während des alveolären Stadiums steigert die Expansion der Lunge die Proliferation der meisten Haupt-

⁴²⁹ Normalerweise wird Elastin in den Spitzen der sekundären, septalen Leisten abgelagert.

⁴³⁰ Überdehnung

⁴³¹ Dehnbarkeit

Zelltypen [461], jedoch zeigte sich während der pseudoglandulären und frühen kanalikulären Phase eine vorwiegende Proliferation der mesenchymalen Zellen, was zu einer starken Zunahme der Distanzen zwischen den Lufträumen führte [465].

Im Gegensatz dazu, rief eine prolongierte Zunahme der Lungenexpansion eine Beschleunigung der strukturellen Reifung der Lunge in den späten Stadien der Lungenentwicklung hervor. Es kam zu einer Reduktion des interalveolären Gewebes, während die alveoläre Oberfläche und die Zahl der Alveolen gesteigert waren [466].

Die Mechanismen, durch welche ein Anstieg der Lungenexpansion die Septenbildung und Alveolarisierung stimuliert, sind noch unbekannt, aber stehen möglicherweise in Verbindung mit einer gesteigerten Tropoelastin-Expression durch diesen Stimulus [458].

Die anhaltenden Steigerungen der fetalen Lungenexpansion haben auch einen starken Einfluss auf die Differenzierung der Alveolarepithelzellen. Die Typ II-Alveolarepithelzellen differenzieren sich über einen intermediären Zelltyp zu Typ I-Alveolarepithelzellen. Dies ist auch in Berichten von einer Studien von Flecknoe *et al.* an fetalen Schafen nachzulesen, in welchen sich, bei einer zehntägigen Hyperexpansion der Lunge, weniger als 2% Alveolarepithelzellen vom Typ II, aber mehr als 90% der Zellen vom Typ I erkennen ließen. Dies deutet darauf hin, dass, laut Annahme der Autoren, zumindest beim Fetus, die Phänotypen der Alveolarepithelzellen einen „plastischen Charakter“⁴³² aufweisen und stark vom Grad der Lungenexpansion beeinflusst werden [467].

1.10.1.3. Die Rolle der fetalen Atembewegungen in der Lungenentwicklung

Die Atembewegungen beginnen früh im fetalen Leben und treten am gesunden Fetus episodisch auf. Sie sind mit dem fetalen Verhalten assoziiert, was sich auch in der REM⁴³³-Schlafphase verdeutlicht [468]. Die Atemmuskeln der fetalen Atembewegungen sind hauptsächlich das Zwerchfell und die *Abduktoren der Glottis*⁴³⁴ [451]. Wie auch während der postnatalen REM-Schlafphase, so sind die *interkostalen Muskeln*⁴³⁵ in hohem Maße in Ruheposition. In der letzten Hälfte der Schwangerschaft beträgt die Inzidenz der fetalen Atembewegungen zwischen 40 und 50% und sie werden durch Apnoe-Perioden voneinander getrennt [469]. Hierbei ist die Glottis durch die anhaltende Aktivität der *Adduktoren*⁴³⁶ geschlossen. Typischerweise verringern die fetalen Atembewegungen den intrathorakalen Druck bis auf 5 mm Hg und verursachen kleine Oszillationen der Flüssigkeit in der fetalen Trachea und den nasalen Passagen [470,471].

Um die funktionelle Rolle der fetalen Atembewegungen zu erforschen, wurden zahlreiche Techniken entwickelt, um ihre Effekte abzuschwächen oder zu eliminieren, wie die *fetale Paralyse*⁴³⁷ durch Moessinger [471], die chirurgische Durchtrennung durch Alcorn *et al.* [472] und reversible Blockade des N. phrenicus durch Miller *et al.* [75], die Durchtrennung des Rückenmarkes oberhalb des Abganges der Motoneurone des N. phrenicus durch Liggins *et al.* [473] und der, ebenfalls von dieser Forschergruppe durchgeführte, Ersatz von Abschnitten der thorakalen Wand durch eine nachgiebige Membran [474].

⁴³² veränderlichen, wandlungsfähigen Charakter

⁴³³ *Rapid Eye Movement*

⁴³⁴ Muskeln, die als Öffner der Glottis fungieren

⁴³⁵ Zwischenrippen-Muskeln

⁴³⁶ Muskeln, die die Glottis verschließen

⁴³⁷ Unter einer *Plegie* versteht man eine vollständige Lähmung von Skelettmuskeln. Als Synonym verwendet man oft auch den Begriff der *Paralyse*, der aber weiter gefasst ist und auch Muskel- bzw. Nervengruppen einschließt, die nicht das Skelettsystem bewegen (z. B. bei glatter Muskulatur: paralytischer Ileus) (36).

Die Ergebnisse dieser Studien sind mit Vorsicht zu interpretieren, denn diese Eingriffe zeigen auch Effekte, die auf die Beseitigung der fetalen Atembewegungen zurückzuführen sind. Beispielsweise verursacht die Durchtrennung des N. phrenicus eine Atrophie und Veränderung der Zwerchfellmuskulatur, wo hingegen die Thorakoplastik eine Lungenkompression hervorrufen kann. Die fetale Paralyse führt zu einer Beseitigung der Aktivität der Adduktoren der Glottis und kann dadurch die fetale Haltung verändern, was zu Lungenkompression führen kann [439].

Um die Rolle der fetalen Atembewegungen genauer zu verstehen, ist es unerlässlich, diese experimentell zu verändern und die resultierenden fetalen Lungenvolumina zu messen [439]. Dies ist eine Möglichkeit, um damit die durch eine induzierte Beseitigung der Atembewegungen hervorgerufene Reduktion des Lungenwachstums, und die damit assoziierte Abnahme der basalen Lungenexpansion, zu erklären [454].

Tatsächlich ist der Prozentsatz der Abnahme der Lungenexpansion dem Prozentsatz der Reduktion des Lungenwachstums ähnlich, wie dies in der Publikation von Harding *et al.* [454] beschrieben wurde. Die Abnahme der Lungenexpansion nach der Beseitigung der thorakalen Komponente der fetalen Atembewegungen, kann durch die persistierende dilatorische Aktivität der Glottis erklärt werden. Der Verlust von Lungenflüssigkeit war im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe bei diesen Feten gesteigert [454].

Bei gesunden Feten spielt die Aktivität des Zwerchfells eine Schlüsselrolle während der fetalen Atembewegungen, indem sie den Verlust von Lungenflüssigkeit, bei verringertem Widerstand gegen den Efflux von Lungenflüssigkeit durch die Dilatation der Glottis, einschränkt [74]. Die fetale Muskelaktivität hilft also, im Sinne einer aktiven Adduktion der Glottis während der Apnoe, oder Aktivierung des Diaphragmas während der fetalen Atembewegungen, dabei, die fetalen Flüssigkeitsvolumina der Lunge und damit den Grad der Expansion zu regulieren (siehe **Abbildung 3**) [439].

In vitro-Studien von Liu und Mitarbeitern brachten hervor, dass eine phasische Dehnung der fetalen Lungenzellen in Kulturen deren Proliferation stimulierte [475]. *In vivo* sind die Atembewegungen isovolumetrisch und deshalb ist der Prozentsatz der an einer Zelle zu erwartenden Längenveränderung vernachlässigbar gering. Dies beruht auf der hohen Dehnbarkeit der fetalen Thoraxwand, der hohen Viskosität der fetalen Lungenflüssigkeit im Vergleich zu Luft, und auf der Masse der Lungenflüssigkeit und der daraus resultierenden, hohen Trägheit [439].

Auch die Aktivierung des Zwerchfells, die zu einer Reduktion des intrathorakalen Druckes führt, verursacht nur einen geringen Flüssigkeitseinstrom in die Lunge, weil andere Bereiche der Brustwand gleichzeitig eingezogen werden [476] und Flüssigkeit sich zuerst innerhalb des Pharynx befinden muss, bevor sie inhaliert werden kann. Als Folge davon ist das Atemzugvolumen des Fetus sehr klein [451]. Bei Schafen in der späten Schwangerschaftsphase beträgt es, laut der Studie von Maloney *et al.*, weniger als 0,5 ml, bei einer Rate von bis zu drei fetalen Atembewegungen pro Sekunde [470].

Bei menschlichen Feten beträgt die mittlere Frequenz der fetalen Atembewegungen im letzten Trimester etwa einmal pro Sekunde, obwohl Atemzyklen mit einer Dauer von bis zu 2,0 Sekunden beobachtet wurden [477]. An menschlichen Feten wurde der Color-Doppler-Ultraschall zur Messung der Flussgeschwindigkeiten in der Trachea und im Nasopharynx herangezogen, allerdings ist der Beitrag dieser Flussbewegungen an den Volumsveränderungen in der Lunge bisher ungeklärt [478].

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

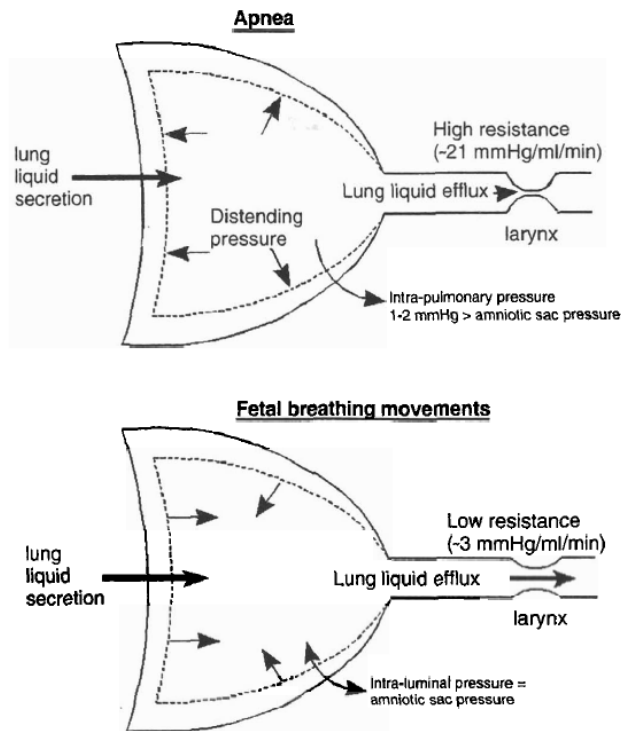


Abbildung 3: Das Diagramm zeigt die Funktion der fetalen oberen Luftwege während der Phasen der Apnoe (oben) und der fetalen Atembewegungen (unten).

Quelle: © Harding R, Hooper S [439]

1.10.1.4. Mechanismen der Mechanotransduktion

Alle Zellen, Gewebe und auch ganze Organe sind *in vivo* physikalischen Kräften ausgesetzt. Diese beinhalten Scherkräfte, Dehnung, Zerrung und Kompression [439]. Diese Kräfte können durch die Schwerkraft, durch osmotischen Druck, Flüssigkeitsfluss, intrazelluläre Spannungen, Körperbewegungen und Veränderungen des inneren Volumens von Organen (Magen, Uterus, Herz, Harnblase, Lunge, etc.) bedingt sein [439].

Chicurel und Mitarbeiter nehmen in einer Publikation an, dass zwischen den Zellen eine isometrische Spannung besteht, die durch intrazelluläre, kontraktile Filamente der Zelle generiert wird [479]. Demzufolge wird eine von außen einwirkende Kraft auf ein bestehendes Gleichgewicht von Kräften ausgeübt, was zu Veränderungen der Zellformen und der intrazellulären Ausrichtung von Fasern führt, bis das ursprüngliche Gleichgewicht der Kräfte wiederhergestellt ist [479].

Physikalische Kräfte spielen eine bedeutende Rolle im zellulären Wachstum und der Differenzierung und sind auch kritische Regulatoren der dreidimensionalen Gewebsstruktur, vor allem innerhalb der Lunge [480,481].

Demzufolge sind physikalische Kräfte ein wichtiger Weg, über den die Zellen mit ihrer Umgebung interagieren und die Wege der *Transduktion*, durch welche diese Kräfte in chemische Stimuli übersetzt werden und damit zu Veränderungen der Zellfunktion führen, werden nun zusehends verstanden [482].

Es wurden Zelloberflächenrezeptoren, die verschiedene extrazelluläre Matrixproteine binden, entdeckt und dies hat einen großen Beitrag zum Verständnis der *Mechanotransduktion* geleistet. Beispielsweise wurden von Rubin *et al.* in diesem Zusammenhang die Mitglieder der Familie der *Integrine* genannt, die eine spezifische

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Sequenz, Arg-Gly-Asp⁴³⁸, die häufig bei extrazellulären Matrixproteinen vorkommt, binden [483]. Die intrazellulären Domänen dieser Rezeptoren sind mechanisch mit fibrillären Actin-Bündeln über verschiedene, mit dem Zytoskelett assoziierte Proteine (*Talin*, *Vinculin*, *Paxillin*, u. a.), verknüpft und mit bestimmten Proteinkinasen⁴³⁹ assoziiert [483]. Die Actin-Bündel stellen eine Hauptkomponente des intrazellulären strukturellen Gerüsts dar und die intra- und extrazellulären Strukturkomponenten stehen mechanisch, über extrazelluläre Matrixrezeptoren, miteinander in Verbindung und bilden so ein strukturelles *Kontinuum*⁴⁴⁰. Über diese physikalischen Verbindungen können mechanische Kräfte detektiert und in chemische Signale *translatiert*⁴⁴¹ werden [483].

Obwohl die intrazellulären Signalwege weniger genau bekannt sind, werden vermutlich, über die Veränderung der Form, von *dehnungsaktivierten Ionenkanälen* intrazelluläre *second-messenger Systeme* aktiviert und es folgt darauf eine direkte Aktivierung der RNA-Polymerase und der Enzyme der DNA-Synthese [439]. Es ist möglich, dass eine gesteigerte Expansion des Gewebes der fetalen Lunge zur Synthese und Freisetzung spezifischer Wachstumsfaktoren führt, die dann lokal, auf parakrine⁴⁴² Weise, die Zellproliferation im expandierten Gewebe stimulieren.

Die fetale Lunge produziert zahlreiche Wachstumsfaktoren, wie PDGF, VEGF, IGF-2, KGF⁴⁴³ und TGF- β 1⁴⁴⁴.

Wenn sich auch in einer Studie von Hooper *et al.* [484] die IGF-2-Expression nach einer Dauer der Lungenexpansion von sieben Tagen als erhöht erwies, so war es den Autoren doch wichtig, zu ergründen, ob die IGF-2-Expression (sowie auch die Expression der anderen Wachstumsfaktoren) parallel zu einem Anstieg der Rate der DNA-Synthese führte. Die DNA-Syntheserate zeigte zwei Tage nach der trachealen Obstruktion ihr Maximum und nahm dann, den Untersuchungsergebnissen von Nardo und Mitarbeitern folgend, innerhalb von zehn Tagen wieder auf Kontrollwerte ab [485]. Ebenso war es wichtig zu verstehen, wie sich die Expression von spezifischen Wachstumsfaktor-Rezeptoren, in Antwort auf einen Anstieg der fetalen Lungenexpansion veränderte, oder ob die Freisetzung von extrazellulär-gebundenen Wachstumsfaktoren dabei involviert war [439].

In der Tat unterliegt die fetale Lunge einem bemerkenswerten strukturellen Umbau, der in Antwort auf eine gesteigerte Lungenexpansion erfolgt und zu einer Freisetzung von, an die extrazelluläre Matrix gebundenen Wachstumsfaktoren, führen könnte [439].

Dies wird durch die Erkenntnis von Papadakis *et al.* gestützt, die in ihrer Studie zu dem Ergebnis gelangten, dass der Ersatz von fetaler Lungenflüssigkeit durch physiologische Kochsalzlösung die Antwort des Lungenwachstums auf die tracheale Obstruktion reduzierte, was vermuten lässt, dass wachstumsfördernde Faktoren in die Lungenflüssigkeit freigesetzt werden könnten, auch wenn dies noch nicht spezifisch untersucht wurde [486].

⁴³⁸ *Arginin-Glycin-Asparagin*

⁴³⁹ *Proteinkinasen* sind Enzyme, die den Transfer einer Phosphatgruppe von einem *Donor* (meist *ATP*) auf die *Seitenketten-Hydroxyl-(OH)-Gruppe* einer Aminosäure katalysieren.

Kinasen sind daher *Phosphoryltransferasen* (37).

⁴⁴⁰ eine strukturelle Einheit

⁴⁴¹ übersetzt

⁴⁴² lokale Wirkung auf benachbarte Strukturen (1)

⁴⁴³ *Keratinocyte growth factor*

⁴⁴⁴ *Transforming growth factor- β 1*

1.10.1.5. Physikalische Ursachen der fetalen Lungenhypoplasie

Die Definition einer Lungenhypoplasie bezieht sich auf eine signifikante Reduktion des Lungengewichtes oder des Zellgehaltes der Lunge, die die Lungenfunktion beeinträchtigt. Die folgenden Störungen in der Schwangerschaft führen zu einer Lungenhypoplasie: Oligohydramnion, CDH, Lungenzysten, Tumore, Pleuraergüsse und zahlreiche fetale muskuloskelettale Deformitäten [439]. Diese Störungen zeigen laut Harding *et al.* einen gemeinsamen Mechanismus, durch welchen sie die fetale Lungenhypoplasie verursachen, nämlich die verlängerte Reduktion des Grades der fetalen Lungenexpansion [487].

1.10.1.6. Oligohydramnion

Das Oligohydramnion tritt bei etwa 10% aller Schwangerschaften auf und wird gewöhnlich durch eine vorzeitige Ruptur der fetalen Membranen⁴⁴⁵ hervorgerufen [439]. Eine andere Ursache stellt die inadäquate Produktion von fetalem Urin dar, der wiederum durch Fehlbildung des fetalen Harntraktes, wie der bilateralen renalen Agenesie, renalen Dysplasie, der Agenesie oder Stenose des *Ureters*⁴⁴⁶ oder der *Urethra*⁴⁴⁷, bedingt sein können [487]. Der Schweregrad des Wachstumsdefizits der Lunge hängt, wie in der Publikation von Moessinger *et al.* [488] nachzulesen ist, von zahlreichen Faktoren, speziell von der Dauer des Oligohydramnions und dem Schwangerschaftsstadium bei Beginn der Störung ab. In ihrer schwersten Form kann die Lungenhypoplasie binnen weniger Stunden nach der Geburt letal sein, aber sie kann sich auch in weniger schwerer Form subklinisch manifestieren und während der neonatalen Periode somit unentdeckt bleiben [439]. Den häufigsten physiologischen Mechanismus, durch welchen das Oligohydramnion eine Lungenhypoplasie hervorruft, stellt eine Reduktion der fetalen Lungenexpansion dar und dies wurde von Miller und seinen Mitarbeitern beschrieben [489].

Bei Fehlen des Fruchtwassers reduziert sich der intrauterine Raum für den Fetus, der Uterus kontrahiert sich und komprimiert dabei den Fetus und beugt die fetale Wirbelsäule zwischen den lumbalen und thorakalen Segmenten. Dies führt wiederum zu einem Anstieg des fetalen abdominalen Druckes mit einem Hochtretzen des Zwerchfells und damit zu einer Kompression der Lunge und zum Verlust von Lungenflüssigkeit [447].

Die Rate des Flüssigkeitsverlustes der Lunge steigt während der nicht-wehenbedingten Kontraktionen des Uterus an und dadurch steigt auch der Grad der Flexion⁴⁴⁸ der fetalen Wirbelsäule.

Die Kompression, die durch den Uterus auf die Lunge ausgeübt wird, kann so stark sein, dass sie sogar zu Entwicklungsstörungen des Gesichts und der Extremitäten führen kann [490].

1.10.1.7. Muskuloskelettale Fehlbildungen

Verschiedene muskuloskelettale Fehlbildungen führen am Fetus zur pulmonalen Hypoplasie, indem sie eine Reduktion der Lungenexpansion hervorrufen. Vor allem die Interferenz mit der Muskulatur des Zwerchfells und den Adduktoren der Glottis spielt eine wichtige Rolle beim Erhalt der fetalen Lungendehnung [439,447].

⁴⁴⁵ Eihäute (Amnion, Chorion und mütterl. Dezidua) (1)

⁴⁴⁶ Harnleiter

⁴⁴⁷ Harnröhre

⁴⁴⁸ Beugung

1.10.1.8. Effekte von Corticosteroiden auf das Wachstum und die Entwicklung der Lunge

Während der Entwicklung ist die fetale Lunge auf natürliche Weise den eigenen fetalen und auch den mütterlichen Corticosteroiden ausgesetzt, vor allem während der Phasen der späten Schwangerschaft. Der Rolle der Corticosteroide wurde viel Beachtung geschenkt, weil sie einen wichtigen Einfluss auf die Verstärkung der fetalen Lungenreifung ausüben. Allerdings sind die genauen Effekte noch nicht klar [439]. Mittlerweile ist bekannt, dass die zirkulierenden Corticosteroide einen wichtigen Effekt auf die strukturelle Entwicklung der Lunge, das Surfactant-System und die Reabsorption⁴⁴⁹ der Lungenflüssigkeit ausüben. Andere Effekte wirken sich in Form einer Reduktion des Gewebewachstums der Lunge und einer Stimulation der Differenzierung der Alveolarepithelzellen vom Typ II aus, wobei letzterer Effekt noch Gegenstand von Diskussionen ist [439].

Es wird häufig darüber berichtet, dass Corticosteroide die Lungenreife auf Kosten des Lungenwachstums steigern, doch diese Daten sind widersprüchlich und zeigen eine Differenz bezüglich der Spezies, Dosis, Zahl der Einzeldosen und Art der Verabreichung [439]. Viele Studien bedienten sich der Anwendung von synthetischen Glucocorticoiden (*Beta-* oder *Dexamethason*), die eine 30- bis 40-fach höhere *Bioaktivität*⁴⁵⁰ als Cortisol aufweisen. Wenn *Betamethason* [491] der Mutter verabreicht wurde, führte dies, laut French *et al.*, zu einer Reduktion des fetalen Körper- und Lungenwachstums und dieser Effekt steigerte sich mit zunehmender Dosis. Wird es allerdings direkt dem Fetus verabreicht, verursachen auch höhere Dosen keine Reduktion des Körper- oder Lungenwachstums [492]. Physiologische Dosen von Cortisol, die direkt dem Fetus infundiert wurden, induzierten, den Berichten von Jobe *et al.* folgend, die strukturelle Reifung der Lunge, ohne dabei das fetale Körper- oder Lungenwachstum zu beeinflussen [493].

Diese Daten zeigen, dass der Effekt von mütterlich-verabreichtem Betamethason auf das fetale Körper- und Lungenwachstum dosisabhängig ist und über die Plazenta mediiert wird. Die Entfernung oder Beeinträchtigung der endogenen fetalen Quelle der Corticosteroide hatte ebenfalls Auswirkungen auf die fetale Lunge. Eine fetale *Adrenalektomie*⁴⁵¹ und die Entfernung der Hypophyse führten bei fetalen Schafen zu einer signifikanten Reduktion des Lungengewichts, was eher durch eine Reduktion des Proteingehalts, als durch eine Reduktion des DNA-Gehaltes bedingt war.

Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass endogenes Cortisol zum Lungenwachstum und speziell zur Akkumulation⁴⁵² der Proteine in der späten Schwangerschaft beitragen könnte. Im Gegensatz dazu führte ein Knockout des Gens für das *Corticotropin-Releasing Hormon* (*Crh*) an Mäusen zu einer Steigerung des DNA-Gehaltes und der Raten der Zellproliferation der fetalen Lunge, speziell bei Epithelzellen, was auf eine durch endogene Corticosteroide hervorgerufene Reduktion der pulmonalen Zellproliferation in der späten Schwangerschaft hindeutete [494,495,496].

Die *Adrenalektomie* und die *Hypophysektomie*⁴⁵³ löschen nur die endogene Quelle des Cortisols aus, denn der mütterliche transplazentare⁴⁵⁴ Flux des Cortisols unterhält niedrige

⁴⁴⁹ Wiederaufnahme

⁴⁵⁰ biologische Aktivität

⁴⁵¹ operative Entfernung der Nebenniere (1)

⁴⁵² Anreicherung

⁴⁵³ operative Entfernung der Hypophyse (1)

zirkulierende Levels am Fetus [494]. Nur Knockout-Mäuse von Müttern mit der genetischen Konstellation *-/-Crh*, die ebenfalls die genetische Konstellation *-/-Crh* aufwiesen, prägten einen Mangel an Glucocorticoiden aus und verstarben bei der Geburt aufgrund von respiratorischer Insuffizienz [439].

Im Gegensatz dazu überlebten Knockout-Mäusefeten (*-/- Crh*) von heterozygoten Müttern (*-/+ Crh*) die Geburt, weil sie vermutlich Glucocorticoide auf transplazentarem Weg von der Mutter erhielten [497]. Demzufolge scheint das Überleben neugeborener Mäuse bei der Geburt nicht vom vorgeburtlichen Anstieg der Corticosteroide abhängig zu sein, wie es beim Menschen und auch beim Schaf der Fall ist, sondern auch zirkulierende Corticosteroide sind essentiell⁴⁵⁵.

Einer der wichtigsten Effekte der Corticosteroide auf die Lungenentwicklung ist die Veränderung der Architektur, weil diese zu einer Verbesserung der Lungenmechanik bei der Geburt führt [498]. Beide, sowohl natürliche, als auch künstliche Corticosteroide, reduzieren die Dicke der interalveolären Wände und führen zu einer Reduktion des Prozentsatzes des Gewebeanteils, der Zelldichte pro Gewebevolumen und einem starken Anstieg des Volumens der Lufträume. Von diesen Ergebnissen erwartet man sich einen Anstieg der Compliance der Lunge [439].

Im Gegensatz dazu, rufen die Adrenalektomie bei fetalen Schafen, die Hypophysektomie bei fetalen Schweinen [499] und der Knockout des Glucocorticoid-Rezeptors und des *Crh* eine Zunahme der Distanzen zwischen den Luftwegen, eine Reduktion der Volumina der Lufträume und eine Steigerung der *Zellularität*⁴⁵⁶ hervor, was zu Atemversagen bei der Geburt und einer Reduktion der Lungen-Compliance führt [439].

Corticosteroide beeinflussen die Alveolarisierung, auch wenn dieser Effekt dosis- und speziesabhängig ist. Betamethason, das Ratten verabreicht wurde, führte zum Arrest der Alveolarisierung [500], während physiologische Dosen, die fetalen Schafen verabreicht wurden, die Zahl der Alveolen erhöhten. Der durch die Corticosteroide verursachte Anstieg der Compliance der Lunge interagiert mit dem Verhältnis zwischen Lungenexpansion und Lungenwachstum und ruft ein gesteigertes Lungenwachstum, in Antwort auf eine gesteigerte Lungenexpansion, hervor [501].

1.10.1.9. Effekte von metabolischen Faktoren auf die fetale Lungenreifung und das Lungenwachstum

Die Beeinträchtigung der Ernährung und des Sauerstoffangebotes während des fetalen Lebens kann die sich entwickelnde Lunge beeinflussen. Studien bezüglich der respiratorischen Funktion von Kindern und Erwachsenen deuten an, dass die Lungenentwicklung durch intrauterine Bedingungen, die die fetale *Wachstumsrestriktion*⁴⁵⁷ induzieren, beeinflusst werden kann und viele Studien an Tieren haben das Verhältnis zwischen reduzierter Nahrung, Sauerstoffverfügbarkeit und der Lungenentwicklung untersucht [502-505].

Das Problem bei der Interpretation solcher Studien liegt darin, dass eine Nahrungsrestriktion oder auch eine Hypoxie selbst die Lungenentwicklung beeinflussen kann. Solche Veränderungen beinhalten gesteigerte zirkulierende Levels von Corticosteroiden, Katecholaminen und Prostaglandinen.

⁴⁵⁴ über die Plazenta

⁴⁵⁵ lebensnotwendig

⁴⁵⁶ Zellanzahl

⁴⁵⁷ die Einschränkung des Wachstums

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Bei separater Untersuchung unterscheiden sich die Effekte der fetalen *Hypoxämie*⁴⁵⁸ von jenen der Nahrungsrestriktion. Prolongierte Hypoxämie führte in den Untersuchungen von Hooper und Mitarbeitern, bei Abwesenheit von Hypoglykämie, zu einer Reduktion der Syntheserate der DNA in Lungen fetaler Schafe. Bei Ratten führte die fetale Hypoxie, ab der frühen Schwangerschaft, zu einem verringerten Lungengewicht, relativ zum Körpergewicht, jedoch schien die Hypoxie in späteren Phasen der Schwangerschaft das fetale Lungenwachstum nicht zu beeinträchtigen.

Eine Verschlechterung des Nahrungsangebotes während der frühen Lebensphase kann die Bildung der Alveolen beeinflussen. Beispielsweise führte bei Ratten, die vermehrt nach der Geburt alveolarisieren, eine intermittierende Nahrungskarenz bald nach der Geburt zu vergrößerten Alveolen, dickeren Septen und einer Reduktion der Ablagerung von Elastin. Bei Schafen zeigten sich, verursacht durch Hypoxämie und Nahrungsrestriktion während der späten Schwangerschaftsphase, eine Reduktion der Anzahl der Alveolen pro respiratorischer Einheit und, bei Geburt, das Vorkommen von dickeren alveolären Septen. Daraus lässt sich ableiten, dass eine adäquate Ernährung für die normale Alveolarisierung sehr wichtig ist [506-510].

Die möglichen Ursachen einer Verschlechterung der Bildung der Alveolen bei Auftreten einer FGR⁴⁵⁹ sind: Hypoxämie, Hypoglykämie und steigende Konzentrationen von zirkulierenden Glucocorticoiden [511].

Weiters ist der Glukose-Transport zu den Lungen bei Feten mit eingeschränktem Wachstum reduziert und dies könnte auch zu reduzierter metabolischer Aktivität innerhalb der Lungenzellen führen [512].

Auch die alveoläre Blut-Luft-Schranke kann durch Unterernährung beeinflusst werden. Die FGR steigerte während der späten Schwangerschaft die Dicke der Blut-Luft-Schranke bei fetalen Schafen und dieser Effekt hielt für mindestens zwei Jahre nach der Geburt an. Bei Meerschweinchen-Feten, die von einer unterernährten Mutter geboren wurden, war die alveoläre Oberfläche reduziert, was sich in einer Reduktion der Diffusionskapazität widerspiegelte. Dieser Effekt stand in Beziehung zur reduzierten Körpergröße und der kleineren alveolären Oberfläche und war auch 126 Tage nach der Geburt, trotz eines Anstiegs des Körpergewichtes und Lungenvolumens, noch vorhanden. Auch Strukturelemente der Lunge, wie elastische Fasern, Kollagen, Proteoglykane und Basalmembran-Proteine werden während der frühen Lungenentwicklung abgelagert und können durch den Ernährungszustand beeinträchtigt werden [439,513].

Elastin ist besonders wichtig für die Entwicklung der Luftwege und der Alveolen und beeinflusst die Compliance der Lunge. Tropoelastin wird von Fibroblasten, hauptsächlich während der Bildung der Alveolen, exprimiert [514]. Aufgrund der langen Halbwertszeit des Elastins können Veränderungen der Elastinablagerung bleibende Effekte auf die mechanischen Eigenschaften der Lunge ausüben [515]. Es ist mittlerweile bekannt, dass Ernährungsfaktoren die Elastinablagerung beeinflussen können. Dies zeigten Studien von Matsui *et al.* [516] an Ratten, bei welchen eine Protein-Restriktion⁴⁶⁰ zu einem Anstieg der Dimensionen der Alveolen führte.

⁴⁵⁸ reduzierte Sauerstoffsättigung des Blutes

⁴⁵⁹ *Fetal growth restriction* (engl.): fetale Wachstumsrestriktion

⁴⁶⁰ Einschränkung der Proteinzufuhr

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Beim Menschen akkumuliert das Elastin in der Lunge zwischen der 25. Schwangerschaftswoche und der 15. Woche nach der Geburt und diese Akkumulation scheint nicht signifikant durch eine FGR beeinflusst zu werden [517].

Während des fetalen und postnatalen Lebens können Hypoxie und fetale Unterernährung zu einem Anstieg der Levels der Corticosteroide führen und dies kann die Elastinsynthese beeinflussen [518]. Exogene Corticosteroide können die Elastinbildung in der Lunge sowohl steigern [519], als auch reduzieren [520]. Berk *et al.* beobachteten, dass die Elastinablagerung in der Lunge auch durch Hypoxie beeinflusst werden konnte, weil diese zu einer Down-Regulation der Genexpression des Tropoelastins in pulmonalen Fibroblasten und der Tropoelastin-Synthese in glatten Muskelzellen der Arterien führte [521].

Paradoxerweise steigert die Hypoxie (12 bis 13% Sauerstoff) die Aktivität der pulmonalen *Lysyl-Oxidase*, des extrazellulären Enzyms, das für das Verbinden von Elastin und Kollagen verantwortlich ist. Allerdings konnte bisher kein inhibitorischer Effekt der Hypoxie auf die Elastin-Synthese bei Ratten nachgewiesen werden [522,523].

Die Kollagene, die aus den Lungenfibroblasten stammen, verleihen der Lunge ihre mechanische Widerstandskraft. Im Gegensatz zu Elastin wird Kollagen während des gesamten Lebens synthetisiert und abgebaut und der Metabolismus von Kollagen wird durch den Ernährungsstatus beeinflusst [524,525]. Bei postnatalen fetalen Ratten zeigte sich eine Reduktion des Kollagen-Gehalts in den Lungen, wenn sie einer Niedrigprotein-Diät ausgesetzt wurden [526]. Kollagen vom Typ IV ist die Hauptkomponente der Basalmembran und beeinflusst damit auch die Stärke und Funktion der Blut-Luft-Schranke. Die Genexpression von *Prokollagen*⁴⁶¹ in Lungenfibroblasten ist bei Hypoxie, die einen Teilaspekt der FGR darstellt, gesteigert [527].

Proteoglykane stellen eine Hauptkomponente der extrazellulären Matrix der Lunge dar. Es existieren allerdings noch keine Daten bezüglich des Einflusses einer Verschlechterung der Ernährung oder der Sauerstoffversorgung auf die Synthese der Proteoglykane in der sich entwickelnden Lunge [439].

Im vaskulären Gewebe führt die Hypoxie zu einer Abnahme der Produktion der Proteoglykane, was an bovinen Endothelzellen⁴⁶² der Lungenarterien [528] und glatten Muskelzellen der menschlichen Aorta [529] beobachtet wurde. Auch die Entwicklung des Surfactants wird durch Ernährungsfaktoren beeinflusst. Die Unterernährung von schwangeren Ratten führte in den Untersuchungen von Curle *et al.* [530] zu einer Verschlechterung der die Oberflächenspannung reduzierenden Eigenschaften der fetalen Lunge und auch die Reifung der Typ II-Alveolarepithelzellen nach der Geburt war verzögert, weil ihr Glykogengehalt anstieg und die Volumendichte ihrer Lamellenkörperchen abnahm.

Prolongierte Perioden von fetaler Hypoxämie führten zum Anstieg der Expression von Surfactant-Protein A und B, allerdings zeigte sich dies bei Untersuchungen am Schafsmodell nahe am Geburtstermin nicht [531]. Dies deutet darauf hin, dass die FGR und Nahrungsrestriktion günstige Effekte auf die Lungenreifung Frühgeborener haben könnten, allerdings nicht bei jenen, die zeitgerecht geboren werden. Die Effekte von

⁴⁶¹ Vorstufe von Kollagen

⁴⁶² Endothelzellen von Rindern

Unterernährung und Hypoxie auf die Typ II-Zellen hängen vermutlich vom Schwangerschaftszeitpunkt und den Veränderungen des Cortisol-Spiegels ab [439].

Einige Mikronährstoffe sind mittlerweile als für die Lungenentwicklung essentielle Faktoren bekannt. Wie zuvor bereits erwähnt, spielen beispielsweise Vitamin A und Vitamin A-Säure in der frühen Lungenentwicklung, während der Embryo- und Organogenese, eine entscheidende Rolle. Die Vitamin A-Säure ist dabei der aktivste Vertreter der Retinoide [532] und beeinflusst viele Aspekte der Lungenentwicklung, wie die frühe Verzweigung der Luftwege, die Bildung der Alveolen und die Synthese von Surfactant und seinen Proteinen [533]. So führte ein experimenteller Vitamin A-Mangel während der Schwangerschaft zu einer Reduktion der Expression der Surfactant-Proteine A, B und C (Sp-a, -b und -c) in fetalen Rattenlungen [534].

1.10.1.10. Bronchopulmonale Dysplasie (BPD)

Die bronchopulmonale Dysplasie ist eine chronische Lungenerkrankung der Kindheit und stellt offenbar eine Konsequenz der Beatmung und Sauerstofftherapie bei akutem respiratorischem Lungenversagen bei Frühgeburten dar [185].

Studien mit Langzeit-Followups zeigten, dass Kinder mit einer BPD variable Schweregrade von persistierenden respiratorischen Beschwerden, wie u. a. Einschränkungen des *Airflows*⁴⁶³, *Gas-Trapping*⁴⁶⁴, Übungsintoleranz, pulmonale Hypertension ausprägten. Histologisch zeigten diese Lungen eine reduzierte Anzahl distaler respiratorischer Anteile, anormale Mikrogefäße, ein sakkuläres Emphysem und eine *Atelektase*⁴⁶⁵. Demzufolge sind vor allem die Reduktion der Alveolarisierung und das anormale Wachstum der Gefäße wichtige Veränderungen, die durch eine BPD verursacht werden. Dies deutet darauf hin, dass die Störung des Gefäßwachstums mit einer Reduktion der Verzweigungsvorgänge⁴⁶⁶ in der Lunge einhergeht [185,535].

Tatsächlich führte eine Blockade des Vegfr-Signalwegs in neonatalen Ratten- und Mäuselungen zu einer Reduktion der Gefäß- und Alveolenbildung. Kinder, die an einer BPD verstarben, wiesen verringerte Levels des pulmonalen VEGF im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe auf und Kinder, die eine BPD entwickelten, zeigten niedrigere Levels des VEGF im trachealen *Aspirat*⁴⁶⁷, als jene der Kontrollgruppe.

VEGF stellt eines vieler *Targets*⁴⁶⁸ der *hypoxia-inducible factors* (HIFs) dar. Ob die HIFs in Lungen von Kindern, die an einer BPD leiden, exprimiert werden, muss noch untersucht werden. Mäuse-Mutanten mit der genetischen Konstellation *Hif-1 α* -Null, verstarben während der frühen Schwangerschaft [536], wo hingegen Mäuse mit einer Defizienz von *Hif-2 α* , erst nach der Geburt, aufgrund von respiratorischen Problemen, verstarben [537]. Im Vergleich zu Mäusen der Kontrollgruppe, zeigten die Lungen der Mäuse mit Mangel an *Hif-2 α* reduzierte Proteinlevels von Vegf. Ihre Lungen hatten eine normale Anzahl an Alveolen, aber diese Alveolen waren anormal dick und wiesen veränderte Kapillaren auf [538-540].

⁴⁶³ Atemfluss, Strömung der Atemgase (1)

⁴⁶⁴ *Trapped air* bedeutet „gefangene Luft“ in der Lunge, die nicht abgeatmet werden kann (1,27).

⁴⁶⁵ *Atelektasen* sind nicht belüftete Lungenabschnitte, in welchen die Wände der kollabierten Alveolen aneinanderliegen (1).

⁴⁶⁶ das *Branching*

⁴⁶⁷ aus der *Trachea* angesaugte Flüssigkeit

⁴⁶⁸ Zielgene

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Eine exogene Injektion von VEGF, entweder *intraamniotisch*⁴⁶⁹, oder *intratracheal*⁴⁷⁰, führte, einen Tag vor der Frühgeburt verabreicht, zu einer signifikanten Verbesserung der Lungenreife und reduzierte die Mortalität. Außerdem zeigte VEGF auf menschliche fetale Lungen einen stimulierenden Effekt bezüglich der Proliferation der Epithelzellen *in vitro*. Demzufolge könnte die Therapie mit VEGF eine potentielle Behandlungsmöglichkeit für eine Förderung der Regeneration der Alveolen darstellen [439,540].

Auch Steroide werden zur Verbesserung der Lungenreifung eingesetzt. Während geringe Dosen von Dexamethason zu einer Hochregulierung der VEGF-Expression führen, scheinen höhere Dosen die Expression von VEGF zu reduzieren, was andeutet, dass hohe Mengen von Dexamethason den günstigen Effekten von VEGF entgegenwirken könnten. Eine große Menge anderer Wachstumsfaktoren, wie die Gruppe der IGFs, EGFs, der TGF- α , die PDGFs, die FGFs und der TGF- β , scheinen, bezüglich der BPD, ebenfalls eine Rolle zu spielen. Um ihren Einfluss auf die BPD zu verstehen, muss ihre Rolle noch genauer untersucht werden. Auch Transkriptionsfaktoren, wie FOXa2, GATA-6 und TTF1, spielen eine Rolle bei der Entstehung einer BPD und sind in die Alveolarisierung der Lunge und Reifung der Mikrogefäße involviert [185,537,541,542].

1.11. Strukturelle Analyse der fetalen Lungenentwicklung der Ratte

Der wohl größte Unterschied bezüglich der Lungenentwicklung des Menschen und der Ratte, bezieht sich auf die Alveolarisierung [543]. Im Gegensatz zur menschlichen Lunge, in welcher die Alveolarisierung vor der Geburt beginnt, wird die Ratte während des sakkulären Stadiums der Lungenentwicklung geboren und alveolarisiert erst nach der Geburt [544].

In der sich entwickelnden Rattenlunge lassen sich, laut Beschreibung von Burri *et al.*, die vier folgenden unterschiedlichen Zonen gegeneinander abgrenzen [543]:

Die *Zone I* besteht aus lockerem Mesenchym, das aus primitiven interstitiellen Zellen und wenigen Kapillaren aufgebaut ist. Ab dem Tag 19 treten erstmals epitheliale Tubuli auf. Mit dem Fortschreiten der Lungenentwicklung wird diese Zone immer dünner und verschwindet schließlich am Tag 23.

Die *Zone II* besteht aus dicht gepacktem Mesenchym, das dunkle Zellen und Kapillaren enthält. Diese Zone enthält die peripheren Anteile des Baumes der Luftwege und die zukünftigen parenchymalen Luftwege.

Die *Zone III* enthält die Zweige des Baumes der Luftwege und Teile des vaskulären Systems. Diese beiden Strukturen werden typischerweise von *Progenitorzellen*⁴⁷¹ glatter Muskulatur umgeben und in diese eingebettet.

Die *Zone IV* hat einen der *Zone III* ähnlichen Aufbau, allerdings tritt in der *Zone IV* eine zusätzliche Mantelschicht von *Adventitia*⁴⁷²-Zellen auf.

⁴⁶⁹ in das Fruchtwasser

⁴⁷⁰ in die Trachea (Luftröhre)

⁴⁷¹ *Vorläuferzellen*

⁴⁷² äußerste Gefäßschicht

1.11.1. Morphologie der fetalen Rattenlunge am Tag 17 und 18 (pseudoglanduläres Stadium)

In diesem Stadium wird die Lunge histologisch durch ihr *pseudoglanduläres*⁴⁷³ Erscheinungsbild charakterisiert und die epithelialen Tubuli, die sich in das umliegende Mesenchym verzweigen, sind der Hauptgrund dafür [543].

Zone I

In den periphersten Regionen der Lungenlappen und in den interlobulären Räumen, bildet das Mesenchym ein dreidimensionales Netzwerk an Zellen, zwischen denen sich weite interstitielle Räume mit Kollagenfibrillen ausbreiten. Dieser „Mantel von einbettendem Gewebe“ wird als *Zone I* der sich entwickelnden Lunge bezeichnet.

Die primitiven interstitiellen Zellen haben einen großen Nucleus⁴⁷⁴, der ein oder zwei Nucleoli⁴⁷⁵ enthält, und einen sehr engen und dichten Randsaum aus Heterochromatin⁴⁷⁶. Innerhalb des spärlichen Zytoplasmas zeigen sich freie Ribosomen, Zisternen des *rauen endoplasmatischen Reticulums*⁴⁷⁷, einige wenige und kleine Mitochondrien, manchmal Lipidtröpfchen und gelegentlich auch ein Zilium⁴⁷⁸. Die Zellen kontaktieren ihre Nachbarzellen über kurze Zellfortsätze. Innerhalb dieses Netzwerkes werden häufig abgerundete freie Zellen beobachtet. Neben Kapillaren findet man in dieser Zone auch einige wenige größere Gefäße. Diese repräsentieren am ehesten die zukünftigen Venen, die das Blut aus der Peripherie sammeln, und sie besitzen eine noch inkomplette Schicht von noch undifferenzierten glatten Muskelzellen⁴⁷⁹. Diese Gefäße sind auch in der Zone III zu finden. Innerhalb der Zone I sind noch keine epithelialen Tubuli vorhanden [543].

Zone II

In dieser Zone, die sich proximal der Zone I befindet, verändert sich die Charakteristik des Mesenchyms: dieses Gewebe bildet eine dicht gepackte Masse von Zellen und enthält epitheliale Tubuli und Kapillaren, die kleiner sind, als jene in der Zone I. Die interstitiellen Zellen dieser Zone haben ein gedehntes Profil mit einem Nucleus einer entsprechenden Form. Die Zellen sind reich an Ribosomen, aber arm an Mitochondrien und zeigen nur kleine Mitochondrien. Die epithelialen Tubuli sind in beiden Zonen, sowohl innerhalb von Zone II, als auch von Zone III, vorhanden.

In den proximalen Regionen der Zone II sind die epithelialen Tubuli von interstitiellen Zellen eingehüllt, die eine geringe Anzahl von Bündeln intrazytoplasmatischer Filamente enthalten. Diese Zellen stellen mit hoher Wahrscheinlichkeit die FSMCs⁴⁸⁰ dar, aber diese können nur mit Hilfe des Elektronenmikroskops identifiziert werden. Im Gegensatz dazu können die Präkursoren der SMCs der Zone III bereits mit Hilfe des Lichtmikroskops unterschieden werden.

⁴⁷³ Drüsen-artig

⁴⁷⁴ Zellkern

⁴⁷⁵ Kernkörperchen

⁴⁷⁶ Als *Heterochromatin* wird Chromatin bezeichnet, das gegenüber *Euchromatin* stärker kondensiert und besser färbbar ist. *Konstitutives Heterochromatin* ist z. B. das *Zentromer*, *fakultatives Heterochromatin* ist das *Geschlechtschromatin* (1).

⁴⁷⁷ RER

⁴⁷⁸ Zilien sind Zellorganellen des Flimmerepithels (1).

⁴⁷⁹ *smooth muscle cells*: SMCs

⁴⁸⁰ Die FSMCs (*fibroid smooth muscle cells*) sind *Vorläuferzellen* oder *Präkursorzellen* der glatten Muskelzellen [543].

Das Verhältnis zwischen diesen beiden Zelltypen deutet auf die, mit fortschreitender Entwicklung auftretende, zentrifugale Ausdehnung der Zone III hin und es kommt dabei zu einer lokalen Differenzierung der FSMCs der Zone II zu Präkursoren der SMCs der Zone III [543].

Die epitheliale Auskleidung der Tubuli prägt eine unterschiedliche strukturelle Differenzierung zwischen den Zonen II und III aus:

Das Epithel der Zone II ist eher kubisch und histochemisch besser färbbar, als jenes der Zone III, was sich vermutlich anhand seines höheren Glykogengehalt begründen lässt. Die Basalmembran⁴⁸¹ der Zone III stellt einen kontinuierlichen Layer⁴⁸² dar, allerdings ist sie im Zentrum der Zone II dünner und peripher häufiger unterbrochen, was multiple interzelluläre Kontakte zwischen den Epithelzellen und den umliegenden Mesenchymzellen ermöglicht. Eine interessante Beobachtung wurde bei Betrachtung der *Spitzen der Tubuli* der Zone II gemacht: diese erscheinen etwas erweitert, sodass sie, dreidimensional betrachtet, ein keulenartiges Aussehen annehmen [543].

Zone III

In diesem Stadium gehören die zentralsten Regionen der Lunge zur Zone III, denn es haben sich noch keine entsprechenden Charakteristika der Zone IV entwickelt. Die Epithel-Tubuli werden von einer Schicht von spindelförmigen Zellen, die eine dunkle Farbe aufweisen und die Präkursoren der SMCs darstellen, eingehüllt. Ähnliche Zellen umgeben und begleiten auch die zukünftigen Gefäße und einige der peripheren Sammelvenen. Diese Strukturen werden gemeinsam als Zone III bezeichnet.

Die Präkursoren der SMCs zeigen gut entwickelte Myofilamente mit typischen *dense bodies*⁴⁸³ und sind mit Polysomen⁴⁸⁴ und Mitochondrien gut ausgestattet, was auf die aktive Bildung von intrazytoplasmatischen Proteinen hinweist. Es zeigt sich ein vermehrtes Vorkommen des RER und ein Fehlen von *mikro-pinozytischen*⁴⁸⁵ *Vesikeln*.

Die Vorläufer der SMCs werden vom Epithel durch eine kontinuierliche Basalmembran und Kollagenfibrillen getrennt. Zwischen der epithelialen Basalmembran und den Vorläufern der SMCs, beobachtet man gelegentlich eine Streuung von isolierten großen und klaren Zellen, die blasse Nuclei mit wenig Heterochromatin und ein oder zwei Nucleolen aufweisen. Im Zytoplasma dieser Zellen findet man sehr kleine Mitochondrien und freie Ribosomen. Diese mesenchymalen Zellen repräsentieren am ehesten die Stammzellen der mucosalen Bindegewebsschicht⁴⁸⁶ [543].

Innerhalb der Zone III ist das Epithel der Tubuli *pseudostratifiziert*⁴⁸⁷ und zeigt eine relativ homogene Population von hochprismatischen und wenigen basalen Zellen. Diese Zellen enthalten einen blassen, gedehnten Zellkern mit einem Nucleolus oder zwei Nucleoli. Das Zytoplasma enthält sowohl basal, als auch apikal Glykogen. Wie zuvor bereits erwähnt, besteht hier eine kontinuierliche Basalmembran, die durch eine relativ dicke Schicht von fibrillärem Material verstärkt wird und nur wenige Kontakte zwischen Epithel und Mesenchym erlaubt.

Ein anderes histologisches Charakteristikum, das erstmals an Schnitten von Lungengewebe am Tag 18 beobachtet werden konnte, stellen schalenförmige Bereiche

⁴⁸¹ BM

⁴⁸² Gewebeschicht

⁴⁸³ mikroskopisch dichte Körperchen

⁴⁸⁴ Polyribosomen (1)

⁴⁸⁵ Pinozytose: Aufnahme gelöster Stoffe in das Zellinnere (1)

⁴⁸⁶ Bindegewebsschicht der Schleimhaut

⁴⁸⁷ mehrreihiges Epithel (1)

von mesenchymalen Zellen dar, die Glykogen und Lipid-Tröpfchen enthalten. Diese Strukturen liegen in der Zone II und grenzen die Schicht der Präkursoren der SMCs, die mit den Luftwegen und Gefäßen assoziiert sind, von der Zone III ab. Ähnliche Zellen kann man auch im Zentrum der Zone II finden, wo sie die epithelialen Tubuli mit ihren Vorläufern der SMCs umgeben [543].

1.11.2. Morphologie an den Tagen 19 und 20 (pseudoglanduläres Stadium)

Zu diesem Zeitpunkt befindet sich die Lunge immer noch im pseudoglandulären Stadium. Das wichtigste Ereignis ist die in diesem Stadium auftretende strukturelle Veränderung der Lunge, die sich in Form einer enormen Zunahme der Zahl der epithelialen Tubuli in der peripheren Lunge manifestiert.

Dies vollzieht sich zusätzlich zu einem intensiven, hauptsächlich dichotomen⁴⁸⁸ Branching des Baumes der epithelialen Tubuli, der sich in die Zone I ausdehnt [543].

Zone I

Die keulenförmigen Spitzen der epithelialen Tubuli befinden sich nun im lockeren Mesenchym der Zone I. Einige Kapillaren befinden sich in großer Nähe zu den basalen Oberflächen der Epithelzellen, die wesentlich weniger Glykogen enthalten, als jene der Zone II. Ab dem Tag 19 wird die Zone I kontinuierlich schmaler. Sie ist unterhalb der Pleura und um die Adventitia der Luftwege und Gefäße lokalisiert, also auch um die Strukturen der Zone IV. Aufgrund ihrer größeren Ausdehnung sind die subpleuralen Anteile der Zone I immer besser sichtbar, als die peribronchialen und perivaskulären Anteile. Auch hier sind wieder abgerundete freie Zellen erkennbar [543].

Zone II

Die starke Annäherung zwischen den Kapillaren und dem Endothel, die am Tag 19 in der Zone I beobachtet werden kann, wird nun auch in Zone II augenscheinlich. In simultaner Weise nehmen die Lumina⁴⁸⁹ der Tubuli, die bisher abgerundet und weich konturiert waren, ein sternförmiges Erscheinungsbild an, was offenbar durch die Verlagerung der *tight-junctions*⁴⁹⁰ an die Zellbasis hervorgerufen wird. Selten sind auch Korpuskeln, die Lamellenkörperchen ähneln, innerhalb des basalen Zellanteils des Epithels der Zone II zu erkennen [543,545].

Zone III

In diesem Stadium können die Zonen II und III bereits leicht voneinander unterschieden werden, was auf die abrupte Transformation der einen zur anderen Zone zurückzuführen ist. Die Tubuli der Zone III werden von Präkursoren der SMCs umgeben und die Epithelzellen enthalten deutlich weniger Glykogen, als jene in Zone II [543].

Zone IV

Die am meisten zentral gelegenen Regionen der fetalen Lunge, also die zukünftigen Gefäße und Luftwege mit ihren assoziierten Muskel-Layern⁴⁹¹, werden nun von einer Schicht adventitialer Zellen umgeben. Dieses Areal wurde als Zone IV definiert. Diese adventitialen spindelförmigen Zellen, die am Tag 21 erscheinen, sind vom umliegenden

⁴⁸⁸ Bei einer *dichotomen Teilung* gehen zwei gleiche Teile aus einem Teil hervor. Dies ist beispielsweise bei der Verzweigung von Drüsengängen oder Pflanzen zu beobachten (1).

⁴⁸⁹ Das *Lumen* ist die lichte Weite röhrenförmiger Körper und Hohlorgane (1).

⁴⁹⁰ interzelluläre Zellverbindung mit Verschmelzung der jeweils äußersten Schicht der Zellmembranen (1)

⁴⁹¹ Lagen von Muskelzellen

undifferenzierten Mesenchym klar abgrenzbar, das Teil der Zone I ist. Die Zonen I und IV kommen nebeneinander zu liegen, was auf die wiederkehrende Architektur der Lunge zurückzuführen ist, die eine Zurückverlagerung der Luftwege in Richtung ihres Hauptstammes erkennen lässt. Die Luftwege der Zone IV, und zum Teil auch jene der Zone III, besitzen einen mucosalen Layer mit longitudinalen Falten (sternförmiges Lumen in den Gewebeschnitten). Die Lumina sind weit und diese Eigenschaft betont den Beginn des *zentrifugalen* Prozesses der Dilatation der Luftwege, der im nächsten Stadium der Entwicklung vorherrscht. Die Epithelschicht setzt sich aus dunklen und hellen Zellen zusammen, wobei die Letzteren in die *Ziliogenese*⁴⁹² involviert sind [543].

Zum ersten Mal können in diesem Stadium die zukünftigen Bronchi anhand des Auftretens primitiver Knorpelzellen identifiziert werden. Der erste Cluster dieser zukünftigen Knorpelzellen kann am Tag 18 in der Nachbarschaft der zentralen Luftwege gefunden werden. Die Äste der Lungenarterien in Zone IV bilden mehrere Layer von SMCs aus, die durch elastische Lamellen gegeneinander abgegrenzt werden.

Innerhalb der Adventitia können auch Nerven gefunden werden. Die Basalmembranen des Epithels sind in den Zonen III und IV kontinuierlich ausgebildet, in manchen Regionen der Zone II sind sie teilweise unterbrochen und größtenteils fehlen sie in der Zone I.

Die am Tag 18 beschriebenen interstitiellen Zellen, die Glykogen und Lipid-Tröpfchen enthalten, können auch in diesem Stadium gefunden werden, sind aber nur um Strukturen der Zone II angesiedelt [543].

1.11.3. Morphologie an den Tagen 21 und 22 (kanalikuläres Stadium)

Innerhalb von 24 Stunden, also vom Tag 20 bis 21, vollziehen sich in der Lunge strukturelle Veränderungen, die ihr mikroskopisches Erscheinungsbild deutlich verändern [543].

Zonen I und II (*Parenchym*⁴⁹³)

In den zentralen Regionen der Peripherie der Lunge beginnend, unterliegen die zukünftigen Luftwege einem Prozess der Erweiterung, der hauptsächlich die Tubuli der Zone II beeinflusst.

In den proximalen Ästen der epithelialen Tubuli der Zone II erscheinen dünne Blut-Luft-Barrieren. Parallel zum Auftreten von Typ I-Pneumozyten, lassen sich kleine Lamellenkörperchen innerhalb der Glykogen-haltigen Epithelzellen der Zone II erkennen. Während dieses Stadiums zeigen die Epithelzellen der Zone I einen gesteigerten Gehalt an Glykogen. Die peripheren Tubuli, die immer noch ein kubisches Epithel ausprägen, reichen nun fast bis an die Basalmembran der Pleura. Mit fortschreitender Entwicklung dünnt sich die Zone I kontinuierlich aus und verschwindet allmählich gegen Ende des kanalikulären Stadiums. Dies geschieht hauptsächlich durch die Differenzierung der Mesenchymzellen der Zone I zu reiferen Zellen der Zone II. Diese zeigen ein intensiveres *Staining*⁴⁹⁴, denn ihr Zellkern enthält mehr Heterochromatin und ihr Zytoplasma enthält eine steigende Anzahl von Organellen (Polysomen, RER und Mitochondrien).

Auch die Mesenchymzellen von Zone II unterliegen einer Veränderung: wenn man sie mit jenen im pseudoglandulären Stadium vergleicht, scheinen sie weniger dicht gepackt zu sein und dies macht es wiederum sehr schwer, die exakten Grenzen zwischen den Zonen I und II zu bestimmen. Die ultrastrukturelle Analyse der Mesenchymzellen der Zone II ergab,

⁴⁹² Bildung der Zilien

⁴⁹³ spezifische Zellen eines Organs, die dessen Funktion bedingen, bilden das *Parenchym* (1).

⁴⁹⁴ immunhistochemische Färbung

dass diese nun Zisternen des RER, einige Lipid-Tröpfchen und etwas Glykogen enthielten [543].

Zonen III und IV (Nonparenchym)

Parallel zur Differenzierung des Parenchyms reifen die Luftwege und Gefäße in einer zentrifugalen Richtung. Im Epithel der Luftwege haben sich die meisten Zellen in Zilien-tragende Zellen transformiert und die anderen, die unterschiedlichen Glykogengehalt aufweisen, könnten die Vorläufer entweder der *Becherzellen*⁴⁹⁵, oder anderer Zelltypen darstellen [543].

1.11.4. Morphologie am Tag 23 (sakkuläres Stadium)

Die meisten Lungen der Feten treten im Alter von 23 Tagen in das sakkuläre Stadium ein. Wichtige Charakteristika dieses Stadiums sind das Verschwinden der Zone I und die Bildung eines kontinuierlichen und kohärenten Layers. Allerdings können trotzdem noch immer kleine Inseln von primitiven mesenchymalen und undifferenzierten Epithelzellen übrigbleiben. Zum ersten Mal zeigt die Lunge ein schwammartiges Erscheinungsbild, allerdings ist sie, im Vergleich zur adulten Lunge, immer noch in hohem Maße unreif. Die parenchymalen Septen bilden eine primitive Architektur aus, die durch eine breite interstitielle Gewebeschicht⁴⁹⁶ und ein *doppeltes Netzwerk von Kapillaren* charakterisiert ist.

Die Prozesse, wie die Bildung der Alveolen und die Reifung der Mikrogefäße, müssen vor dem Erreichen der adulten Morphologie der Lunge abgeschlossen sein. Unter den interstitiellen Zellen gibt es zwei verschiedene Populationen an *Lungenfibroblasten*⁴⁹⁷: die eine enthält Lipid-Tröpfchen und häufig Glykogen, während die andere zahlreiche Polysomen und reichlich RER enthält. Ab dem Tag 22 finden sich Makrophagen⁴⁹⁸ sowohl im Interstitium, als auch innerhalb des Parenchyms der Luftwege (siehe **Abbildung 4**) [543,546].

1.11.5. Morphologie am ersten postnatalen Tag (sakkuläres Stadium)

Die Veränderungen, die in der postnatalen Lunge im sakkulären Stadium beobachtet werden können, werden hauptsächlich durch den *Beginn der Atmung* induziert. Die intersakkulären Septen werden dünner und die Luftwege dehnen sich aus. Das Epithel der Luftwege hat fast all sein Glykogen verloren. Bronchi und Bronchioli sind dilatiert⁴⁹⁹ und haben ihre longitudinale Faltung eingebüßt. Das Lumen der Gefäße und Kapillaren erscheint ebenfalls erweitert und weist ein abgeschwächtes Endothel auf [543].

Heute erlauben die Histochemie, Zytochemie und die molekularbiologischen Techniken das Erkennen von zellulären Differenzierungsschritten, weit vor ihrem Auftreten auf morphologischer Ebene. Zum Beispiel bindet ein Typ II-Zellmarker, das *Maclura pomifera-Lektin*, an einige periphere Epithelzellen der Rattenlunge bereits am Tag 18 der Schwangerschaft und dies geschieht somit viel früher, als Typ II-Zellen in der Lunge detektiert werden können.

⁴⁹⁵ schleimbildende Drüsenzellen im Epithel der Atemwege: *goblet cells* (engl., syn.) (1)

⁴⁹⁶ Das *Interstitium* ist im Gegensatz zum *Parenchym* nicht an der Funktion des Organs beteiligt und stellt ein Binde- und Stützgewebe dar (1).

⁴⁹⁷ Vorstufen der Fibrozyten (Bindegewebszellen) (1)

⁴⁹⁸ Fresszellen (1)

⁴⁹⁹ erweitert

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Ein anderes Lektin, das *Ricinus communis-Agglutinin*, das einen Marker für die apikalen Oberflächen der Typ I-Zellen darstellt, bindet in der Peripherie der epithelialen Tubuli bereits am Schwangerschaftstag 18.

Unter Verwendung von Techniken der Immunfluoreszenz und eines lungenspezifischen Antigens, das in Typ II-Zellen lokalisiert ist, konnte die Fluoreszenz an Ratten bereits am Tag 16 der Schwangerschaft detektiert werden.

Tatsächlich wurden auch andere Membran-Marker zur Untersuchung des Schicksals einer spezifischen Zellpopulation angewendet.

So ließ sich, unter Verwendung von Antikörper gegen kontraktile Proteine in sich entwickelnden Lungen, in einer Studie von Mitchell *et al.*, die Differenzierung des Mesenchyms zu glatten Muskelzellen verfolgen [543,547-551].

Im frühen pseudoglandulären Stadium (Tage 17 und 18) und im sakkulären Stadium (Tag 23 und erster postnataler Tag) sind nur drei der vier Zonen vorhanden: in den *frühen Stadien fehlt also die Zone IV* und in den *späteren Stadien die Zone I* [543].

Während sich erstere noch nicht entwickelt hat, ist letztere bereits verschwunden.

Am Anfang ist die Zone I frei von epithelialen Tubuli. Während der zentrifugalen Ausbreitung der Luftwege und der Differenzierung des proximalen Mesenchyms der Zone I zur Zone II, wächst die periphere Zone I kontinuierlich weiter, was das verlängerte Auftreten eines Mantels der Zone I erklärt. Gleichzeitig reifen die proximalen Elemente der Zone II und transformieren zu Strukturen der Zone III. Vom Tag 19 bis 22 hat es den Anschein, als wüchsen die epithelialen Tubuli der Zone II schneller, als sich das Mesenchym der Zone I zur Zone II differenziert. Demzufolge dehnen sich die Tubuli in die Zone I aus [543]. Inzwischen differenzieren die Elemente der Zone III weiter und bilden eine neue Region, die Zone IV, die durch das Auftreten der proximalen Luftwege und Gefäße repräsentiert wird. Die Zone IV ist durch das Auftreten eines Layers der Adventitia charakterisiert [543].

Vom Tag 23 an ist die Zone I komplett zur Zone II differenziert. Burri und Mitarbeiter nahmen an, dass der Pool an Zellen, der in Zone I am Tag 19 beobachtet werden konnte, Präkursoren der Zellen des Gasaustausch-Parenchyms der Zone II am Tag 23 verkörpern könnte [543]. Diese Interpretation wird auch durch die Ergebnisse der Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz von Ten Have-Opbroek [552] an Mäusen und Ratten gestützt: der verwendete fluoreszierende Antikörper, der sein spezifische Antigen, das nur auf Typ II-Pneumozyten oder ihren Vorgängern präsent ist, erkennt, führte bei Mäusen ab dem Tag 14 und bei Ratten ab dem Tag 16 zu einer positiven Reaktion innerhalb der distalen Tubuli.

Die Gruppe von Forschern um Burri ging davon aus, konnte allerdings nicht beweisen, dass das Mesenchym der Zone I nicht nur das Bindegewebe der Zone II, sondern auch die Endothelzellen der Zonen I und II bilden könnte. Des Weiteren konnte von ihnen auch nicht ausgeschlossen werden, dass Zellen innerhalb der zentralen Anteile von Zone I (wo Strukturen der Zone I direkt jene der Zone IV umgeben) zur Bildung des adventitialen Layers und des Knorpels beitragen könnten. Während der frühen pseudoglandulären Phase erweitert sich die Zone I peripher in gleicher Geschwindigkeit, wie sie sich zentral zur Zone II differenziert. Somit entsteht ein großes Volumen an zukünftigem Parenchym [543].

Auf diese Weise wird das wachsende Epithel der Tubuli innerhalb der Zone II gehalten. Wenn dann die Proliferation und Differenzierung in der Zone I im späten

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

pseudoglandulären Stadium langsamer wird, penetrieren die Spitzen der Tubuli der Zone II in die Zone I. Hier kommt somit das Epithel in engsten Kontakt mit den Kapillaren und kennzeichnet damit die Orte der anschließenden Bildung der Blut-Luft-Barriere. Wegen der klaren Beschreibung der Zonen II und III, mit Zilien-tragenden Zellen auf der einen (ab dem Tag 21) und Typ II-Pneumozyten auf der anderen Seite, erscheint, nach Meinung der Autoren, das mögliche Auftreten eines Überganges zwischen diesen beiden Zonen im späteren Leben als sehr unwahrscheinlich [543].

Die Tatsache, dass mehrere Generationen von Tubuli sich distal der terminalen Bronchiolen am Ende der pseudoglandulären Phase im Zuge des Umbaus der Azini des menschlichen Fetus erweitern, unterstützt die Annahme, dass bei der Ratte die großen Anteile des Epithels des zukünftigen Gasaustausch-Parenchyms innerhalb der distalen Anteile der tubulären Sprosse bereits gebildet sein könnten [543,553].

Der Prozess des Wachstums und der Differenzierung vollzieht sich *zentrifugal*. Beispielsweise sei die Dilatation der Luftwege erwähnt, die während der späten pseudoglandulären Phase in den extrapulmonalen Luftwegen beginnt und sich dann, gegen Ende der kanalikulären Phase, bis zu den distalsten Epithelien der Tubuli ausgedehnt hat. Auch die Bildung der Zilien wird anfangs in den zentralsten Anteilen der Luftwege beobachtet und schreitet in Richtung der Peripherie fort. In ähnlicher Weise verhält sich auch die Bildung der glatten Muskelzellen in den Luftwegen, den Gefäßen und auch jene der adventitialen Fibrozyten, die ebenfalls zentrifugal verläuft. Allerdings ist es unklar, ob die glykogenreichen interstitiellen Zellen, die an den Tagen 18 bis 20 in den die Zone III umgebenden Strukturen der Zone II gefunden werden, zur Bildung der zukünftigen Adventitia-Zellen, oder aber eher zur Bildung der interstitiellen Zellen des Gasaustausch-Parenchyms beitragen [543].

Den wohl prominentesten, zentrifugalen Prozess der fetalen Lunge stellt sicher das Wachstum des epithelialen Baumes durch Elongation⁵⁰⁰ der Tubuli und Teilung der terminalen Knospen dar. Beobachtungen von Burri *et al.* deuteten darauf hin, dass sich der Großteil der frühen Teilungen (wenn die Spitzen des Epithels noch von kondensiertem Mesenchym umgeben sind) auf die irreguläre dichotome Art vollzog, während die späteren Teilungsprozesse, die innerhalb des lockeren Mesenchyms der Zone I auftraten, sich großteils auf die reguläre Art vollzogen. Die Differenzierung des Epithels ist vom Typ des umgebenden Mesenchyms abhängig und es besteht diesbezüglich eine Übereinkunft mit Berichten von Hilfer *et al.*, die den Einfluss des Mesenchyms auf die Bildung von Organen untersuchten [543,554].

Die Bildung der dünnen Blut-Luft-Barrieren beginnt am Tag 21 innerhalb des Epithels der Zone II, distal der Zone III, und sie erweitern sich dann am Tag 22 in die zentralen Anteile von Zone I, um dann, während der folgenden Tage, die peripheren Anteile der epithelialen Tubuli zu erreichen, ausgenommen die äußersten Kappen der kuboidalen Zellen, die auch nach der Geburt in menschlichen Lungen detektiert werden konnten [543,555].

Anfangs erscheint es, als liefe der Prozess der Annäherung der Kapillaren an das Epithel, der die Initiation der Bildung der Blut-Luft-Barriere darstellt, in *zentripetaler* Richtung, denn er konnte zuerst am Tag 19 in Zone I nachgewiesen werden. Innerhalb der Zone II prägte sich derselbe Vorgang einen Tag später aus. In diesem Fall nahmen Burri und Mitarbeiter an, dass das Epithel der Zone I am Tag 19 in die Zone II am Tag 20 verlagert wurde und dass in der Peripherie neue Sprossen von sich teilenden Tubuli mit neu

⁵⁰⁰ Verlängerung

gebildeten und mehr distal gelegenen Kapillaren in Kontakt kamen. Dies stellte wieder einen *zentrifugalen* Prozess dar [543,545].

1.11.6. Geschichtliches

In der älteren Literatur fanden sich bereits vor etwa 100 Jahren Beschreibungen von Regionen der Lunge, die mit den heute von Burri *et al.* beschriebenen Zonen korrespondieren, speziell trifft dies für die frühen Entwicklungsstadien zu [543].

Beispielsweise beschrieb Koelliker das Vorkommen von Gruppen sich teilender epithelialer Tubuli in einer drei Monate alten menschlichen Lunge, die gemeinsam in eine fibröse Hülle verpackt und damit nur undeutlich vom umgebenden „interstitiellen Gewebe“ abzugrenzen waren.

Bender verglich die 12 Wochen alte fetale menschliche Lunge mit einer Drüse und zeigte in einer seiner Skizzen, dass Zellen in der Nachbarschaft des Epithels näher beieinander lagen, wo hingegen die mehr distal gelegenen Zellen eher locker verstreut zu sein schienen. Diese Beschreibung korrespondiert wohl mit den Zonen I und II, die später von Burri *et al.* beschrieben wurden. Ham und Baldwin untersuchten die Unterschiede und möglichen Schicksale von zwei verschiedenen *Mesenchym-Typen*, einem *dichten* und einem *lockeren Typ*. Sie nahmen an, dass sich aus dem „nicht-zellulären“ Mesenchym (der Zone I) *non-parenchymatöse* Strukturen, wie die Pleura⁵⁰¹ und das subpleurale Bindegewebe, die Lymphgefäße, die interlobulären Septen und die bronchialen Knorpel entwickeln würden. Heute wird angenommen, dass die Zone I die Hauptquelle des interstitiellen Gewebes (und eventuell auch der Kapillaren) und des Lungenparenchyms darstellt. Dies würde wiederum bedeuten, dass die Bestandteile der Zone I die Möglichkeit besitzen, sich in Elemente der Zone II zu verwandeln (also ein „*Upgrade*“ durchführen) und das würde auch für die Elemente der Zonen II und III gelten, die sich in Elemente der Zonen III und IV verwandeln würden [543,556-558].

Beispielsweise wird ein proximaler Anteil der Zone III, an den Tagen 22 und 23 zu einem Teil der Zone IV, und ein Anteil der Zone II, wie im Elektronenmikroskop beobachtet werden konnte, transformiert zur Zone III, oder, während der späteren Entwicklung, auch zur Zone IV. Somit stellt die Zone IV, laut der Schilderung von Burri und Kollegen, eine Struktur dar, die sich nicht weiter transformieren kann, weil alle ihre Komponenten ihre Endpunkte der Entwicklung erreicht haben [543].

Eine interessante Beobachtung war jene der Entdeckung von abgerundeten Zellen, zwischen dem ersten Tag der Beobachtung und dem Ende der kanalikulären Phase der Entwicklung. Anfangs wurden sie im Interstitium der Zone I und später auch im Interstitium und den Lufträumen von Zone II (ab dem Tag 21) gefunden. Nach Sorokin und Hoyt könnten sie Präkursoren der Alveolarmakrophagen darstellen [543,559].

⁵⁰¹ das Lungenfell

1.11.7. Zusammenfassung

Zusammenfassend kann man folgende morphologische Beobachtungen von Burri *et al.* festhalten [543]:

1. Alle Wachstums- und Differenzierungsprozesse der postnatalen Lunge vollziehen sich in *zentrifugaler* Richtung
2. Die Zone I korrespondiert mit einer Zone der Expansion von Organen. Während sie in der Peripherie wächst, differenzieren sich die zentralen unreifen Zellen zu mesenchymalen Strukturen der Zone II. Das Schicksal letzterer hängt vom Stadium der Lungenentwicklung ab und die Zone I verschwindet bei Beginn des sakkulären Stadiums.
3. Die Zone III repräsentiert, bis zum Schwangerschaftstag 19, eine Region der Bildung, des Wachstums und der Differenzierung der leitenden Luftwege. Nach dem Tag 19 wird sie in zunehmendem Maße zum Ort der Differenzierung des zukünftigen Gasaustausch-Parenchyms und nach dem Tag 21 übt sie diese Funktion in exklusiver Weise aus.
4. Die Zone III setzt sich aus Strukturen leitender Luftwege und ihren begleitenden Gefäßen zusammen. Beide Strukturen haben in diesem Stadium noch keinen adventitialen Layer entwickelt.
5. Die Zone IV setzt sich aus Bestandteilen der Zone III zusammen, die eine Hülle aus Adventitia entwickelt haben. Die Zone IV ist im frühen pseudoglandulären Stadium noch nicht vorhanden, aber entwickelt sich ab dem Tag 19 fortschreitend aus den proximalen Anteilen der Zone III.

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlung“

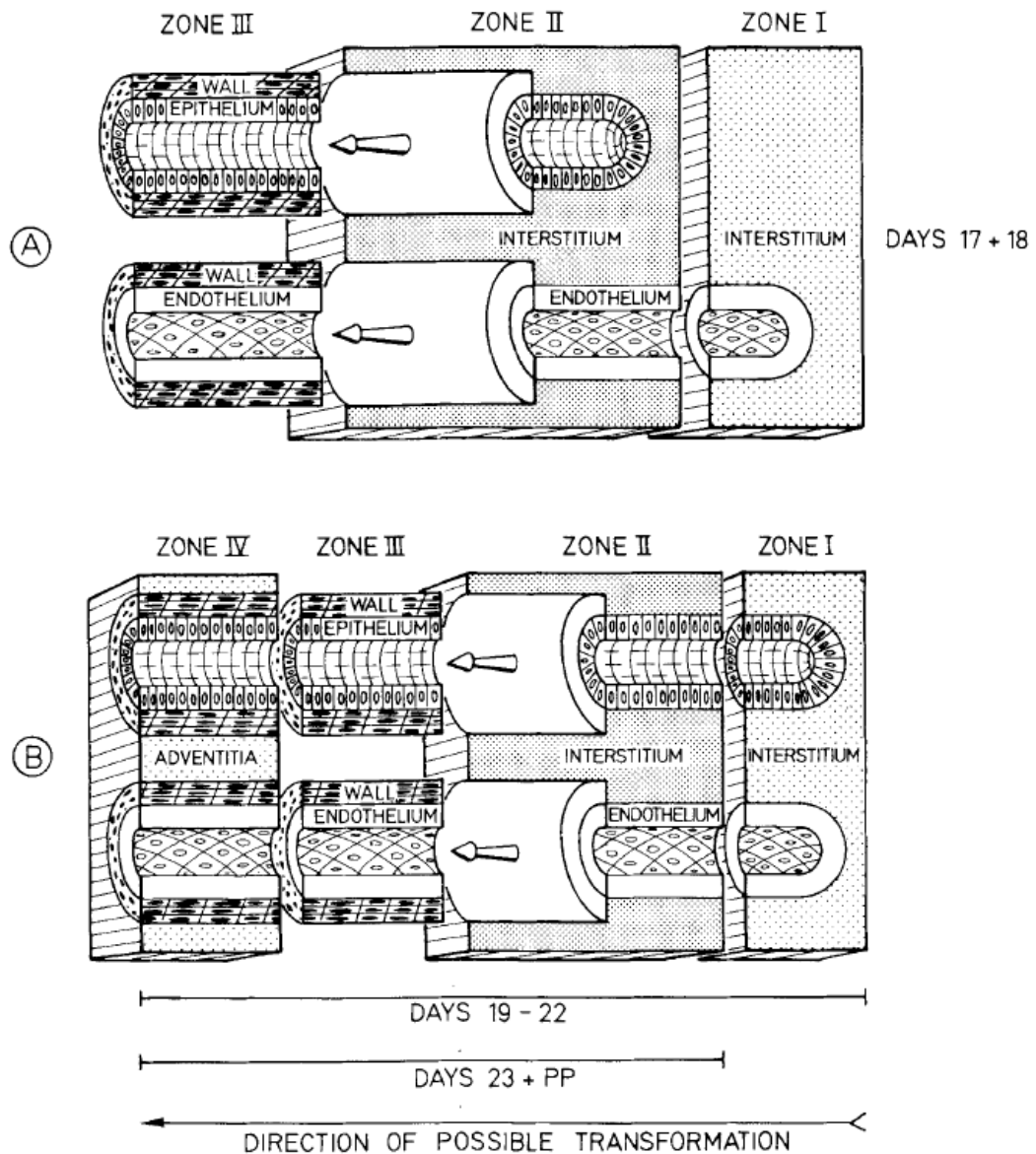


Abbildung 4:

Diagramm der fetalen Lungenentwicklung, die das topographische Verhalten der vier Zonen und die Dynamik ihrer Transformation widerspiegelt.

Die Zugehörigkeit einer Struktur zu einer Zone wird durch das umliegende Gewebe beeinflusst.

Die Zone I wird durch eine lockere Anordnung primitiver Mesenchymzellen charakterisiert.

In Zone II sind die interstitiellen Anteile dicht gepackt. Zone III wird von glatten Muskelzellen (SMAs) oder deren Vorläuferzellen umgeben. In Zone IV sind die leitenden Strukturen von adventitialen Zellschichten begrenzt.

Das Fehlen der Zone IV an den Tagen 17 und 18 und der Zone I ab dem Tag 23 ist auffallend.

Quelle: © Burri PH, Moschopoulos M [543]

1.12. Frühe Entwicklung des Zwerchfells und zelluläre Mechanismen der Nitrofen-induzierten CDH

Die CDH ist ein bisher nur unzureichend verstandener angeborener Defekt des Zwerchfells, der am Neugeborenen eine schwere Form des *Respiratory Distress*⁵⁰² hervorruft. Das am besten untersuchte Tiermodell bezüglich einer CDH ist das *Nitrofen-Modell* [560,561].

Die Entwicklung der Defekte des Diaphragmas an Nitrofen-exponierten Ratten konnten von Allan und Greer bis zu einer Anomalität in der *PPF*⁵⁰³ zurückverfolgt werden [562]. Die PPF ist von besonderer Wichtigkeit bezüglich der Zwerchfellentwicklung, denn sie stellt die Zielstruktur der diaphragmatischen Muskelvorläuferzellen und der Axone des N. phrenicus dar (siehe **Abbildung 5**) [563].

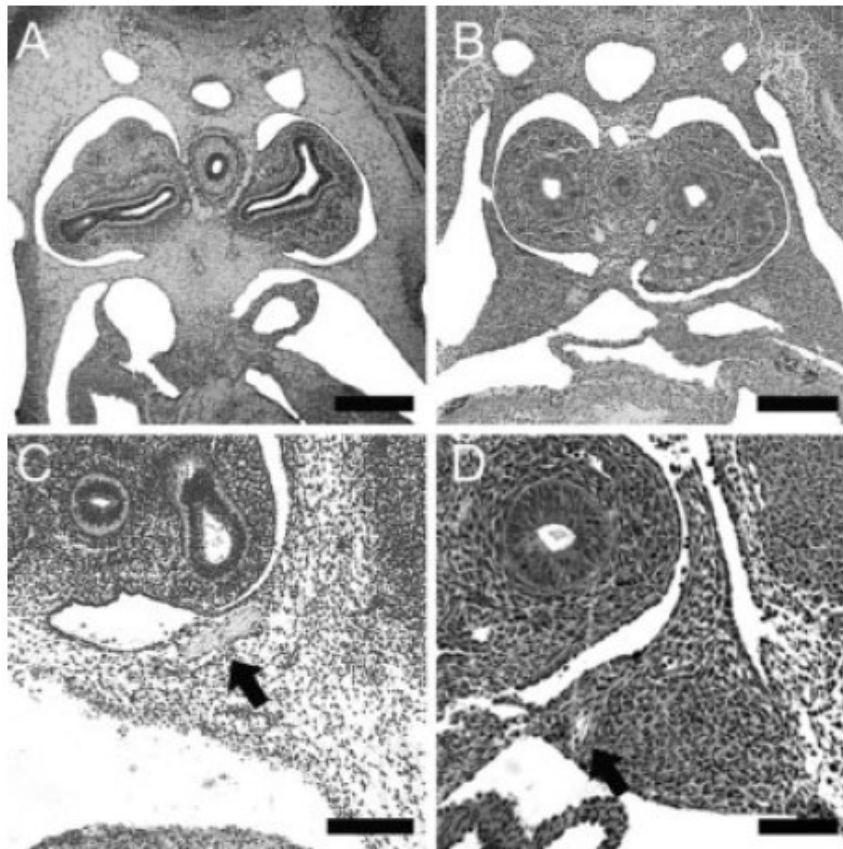


Abbildung 5: Vergleich der PPF zwischen Mensch und Ratte.

A: Querschnitt durch einen 5-Wochen alten menschlichen Embryo. Es zeigt sich die typische dreieckige Struktur der PPF auf beiden Körperseiten. **B:** Transversalschnitt durch einen Rattenembryo (E13,5). **C:** PPF eines 5-Wochen alten menschlichen Embryos. **D:** Ähnliche anatomische Verhältnisse am Rattenembryo. Die *schwarzen Pfeile* zeigen die Lokalisation des Zwerchfell-Nervs in der PPF.

A: scale bar = 400 μm ; B: scale bar = 250 μm ; C: scale bar = 200 μm ; D: scale bar = 100 μm .

Quelle: © Clugston *et al.* [560]

⁵⁰² Das RDS (respiratory distress syndrome) ist ein Atemnotsyndrom des Neugeborenen (1).

⁵⁰³ pleuroperitoneale Falte

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Abweichungen der Entwicklung der PPF wurden in Modellen von Nitrofen-exponierten, Vitamin A-defizienten und „*Wt1*-Null-mutierten⁵⁰⁴“ Tieren mit CDH vorgefunden, was darauf hindeutet, dass es sich dabei um ein häufiges Merkmal handeln könnte. Es wird angenommen, dass PPF-Defekte der menschlichen CDH zugrunde liegen könnten. Der Mechanismus, der zu einer abnormen Bildung der PPF führt, ist bisher unbekannt. Die Wirkung bzw. der Einfluss von Nitrofen auf die CDH, wird in zwei Hypothesen beschrieben: es könnte sich einerseits um eine Verminderung der Zellproliferation⁵⁰⁵, aber andererseits auch um die vermehrte Induktion einer *Apoptose*⁵⁰⁶ handeln [560,564].

In einer Studie von Clugston und Mitarbeitern zur genaueren Charakterisierung der PPF, wurde eine Serie von Rattenembryonen während einer 48-Stunden-Periode (von E12,0⁵⁰⁷ bis E14,0) untersucht.

Zum Zeitpunkt E12,0 konnte noch kein Strukturäquivalent zur PPF erkannt werden. Die PPF wurde erst zum Zeitpunkt E12,5 (ca. 6 mm) erkennbar und wuchs schnell innerhalb der nächsten 36 Stunden. Ein immunhistochemisches Staining der Muskelpräkursoren (*Pax3*) und des N. phrenicus (*Neurofilament*) spiegelte den chronologischen Verlauf der Migration dieser Komponenten in der PPF wieder.

Im Stadium E12,5 konnten Präkursoren der Muskulatur in der Körperwand, die an die sich entwickelnde PPF angrenzt, beobachtet werden, allerdings wurden nur ein oder zwei Muskelpräkursoren innerhalb der PPF entdeckt. Am Gestationstag 13,0 stieg die Zahl der Muskelpräkursoren innerhalb der wachsenden PPF an, der Zwerchfellnerv war allerdings noch nicht sichtbar.

Im Stadium E13,5 war die PPF größer gewachsen und dies wurde durch einen weiteren Anstieg von Muskelpräkursoren bedingt. Ein ähnliches Bild zeigte sich zum Zeitpunkt E14,0.

Im E13,5 wurde erstmals der phrenische Nerv als Bündel von Neurofilament-positiven Fasern innerhalb des medialen Winkels der dreieckigen PPF sichtbar. Auch Gewebeschnitte von menschlichen Embryonen im Stadium der *CRL*⁵⁰⁸ zwischen 4 und 15 mm wurden untersucht. Der klassische dreieckige Bereich der PPF wurde erstmals in Embryonen mit einer CRL von 6 mm entdeckt (*Carnegie-Stadium* 13/14; etwa 4. Schwangerschaftswoche). Im Zuge der weiteren Entwicklung konnte die PPF in Embryonen bis zu einer CRL von 14 mm beobachtet werden, danach war sie vom Diaphragma nicht mehr abzugrenzen (*Carnegie-Stadium* 17, etwa 6. SSW).

Den Beschreibungen von Clugston *et al.* folgend, existiert die transiente Struktur der PPF in menschlichen Embryonen mit einer CRL zwischen 6 und 14 mm, was den Carnegie-Stadien 13 bis 17 und der 4. bis 6. SSW entspricht (siehe **Abbildung 6**) [560].

⁵⁰⁴ das *Wilms-Tumorsuppressorgen* (*WT1*). Mutationen im *WT1*-Gen verursachen einen Nierentumor (1).

⁵⁰⁵ Zellteilung

⁵⁰⁶ programmierter Zelltod

⁵⁰⁷ Embryonalperiode 12

⁵⁰⁸ *Crown-Rump-Length* (engl.): *Scheitel-Steiß-Länge* (1)

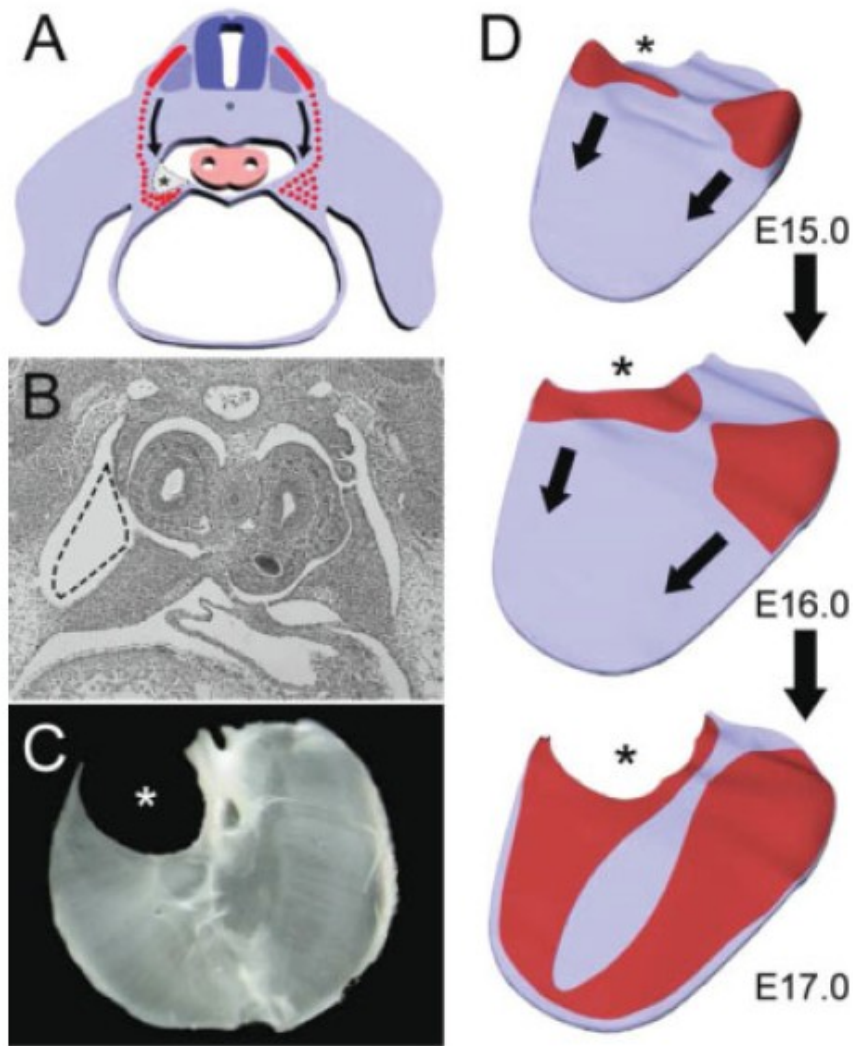


Abbildung 6 :

Embryogenese der Zwerchfelldefekte bei CDH

A: Schematischer Querschnitt eines Rattenembryos zum Zeitpunkt E13,5.

Normalerweise migrieren die Muskelpräkursorzellen (*rot*) in den dreieckigen Bereich der PPF, von wo aus sie in weiterer Folge das spätere Zwerchfell besiedeln. Es wird angenommen, dass eine Malformation der PPF zu Defekten des späteren Zwerchfells führen könnte.

B: Querschnitt eines Nitrofen-exponierten Rattenembryos am Tag 13,5: die PPF auf der linken Seite zeigt eine Fehlbildung (*punktierte Linie*) im Vergleich zur rechten Körperseite.

C: Blick auf das Zwerchfell einer Nitrofen-exponierten Ratte (E16,5). Es zeigt sich eine Zwerchfellhernie vom *Bochkdalek-Typ* in der linken posterolateralen Region des Zwerchfells.

D: Schematische Darstellung der Zwerchfellentwicklung der Ratte (E15 bis E17).

Die roten Strukturen zeigen die Muskelpräkursoren, die die Region der PPF besiedeln und sich dann auf das gesamte Zwerchfell ausbreiten (*Pfeile*). Ein Defekt der PPF führt so zu einem Defekt (*Sterne*) des späteren Zwerchfells.

Quelle: © Clugston *et al.* [560]

1.12.1. Anormale Bildung der PPF bei Nitrofen-exponierten Rattenembryonen

Der Zeitpunkt, ab welchem Anomalitäten der PPF an Nitrofen-exponierten Rattenembryonen erstmals erkannt werden können, wurde in der hier angeführten Studie von Clugston *et al.* ebenfalls untersucht [560]. Im Zuge dieser Studie wurde eine Serie von Nitrofen-exponierten Rattenembryonen (E12,5 bis E14,5) zusammengestellt und die Morphologie der PPF zu analysieren. Im E12,5 und E13,0 wurden an den Embryonen keine PPF-Defekte beobachtet. An den Tagen 13,5 und 14,0 wurden dann allerdings solche sichtbar, die in ihrer Morphologie identisch zu den vorher beschriebenen waren [564]. Das immunhistochemische Staining der Muskelpräkursoren und des phrenischen Nerven, zum frühesten Zeitpunkt, an dem die PPF-Veränderungen sichtbar wurden (also zum Zeitpunkt E13,5), ergab, dass der neuromuskuläre Beitrag zur PPF auf die Region des Gewebedefektes beschränkt war [560].

NIH 3T3⁵⁰⁹ Zellwachstums-Analyse

Um den Effekt von Nitrofen auf NIH-3T3-Zellen in Zellkulturen zu überprüfen, legten Clugston *et al.* Wachstumskurven der proliferierenden Zellen bei verschiedenen Konzentrationen von Nitrofen an: 0 µM (Kontrolle), 10 µM, 25 µM, 50 µM und 100 µM. Zellen, die in Abwesenheit von Nitrofen wuchsen, produzierten eine typische *sigmoidale*⁵¹⁰ Wachstumskurve mit einer sichtbaren *Lag*-, *exponentiellen Wachstums*- und einer *Plateau-Phase* bei Sättigung. Der Zusatz von Nitrofen zur Zellkultur führte zu einer Rechtsverschiebung der Wachstumskurve, was ein verzögertes Wachstum der Zellen anzeigte. Außerdem war dieser Effekt dosisabhängig und man beobachtete demnach einen stärkeren inhibitorischen Effekt bei höheren Dosen von Nitrofen [560].

Bromodeoxyuridin-Inkorporation *in vitro*

Um festzustellen, ob Nitrofen einen inhibitorischen Effekt auf die NIH-3T3-Zellproliferation ausübte, wurde die *BrdU*⁵¹¹-Inkorporation in sich aktiv teilenden Zellen bei verschiedenen Nitrofenexpositionen von 0 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, und 100 µM untersucht. Als Maß für die Zellproliferation wurde dabei der Prozentsatz von *BrdU-positiven Zellen* ermittelt, da Kulturen mit einer gesteigerten Fraktion von BrdU eine schnellere Proliferation zeigten, als jene, mit geringeren BrdU-Anteilen. Wie sich beobachten ließ, hatte die Anwesenheit von Nitrofen in jeder Dosis, nach einer 24-Stunden-Exposition im Kulturmedium, *keinen Effekt* auf die BrdU-Inkorporation im Vergleich zur Kontrolle. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden trat dann jedoch ein *klarer Effekt* auf die Zellproliferation auf. Zu diesem Zeitpunkt nahmen Nitrofen-exponierte Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe **wesentlich weniger** BrdU auf. Es schien auch ein *dosisabhängiger Trend* (allerdings nicht statistisch signifikant) bezüglich des Nitrofeneffektes aufgetreten zu sein: 100 µM > 50 µM > 25 µM > 10 µM [560].

⁵⁰⁹ *Embryonale Fibroblasten-Zelllinie* der Maus. Der Name bedeutet: „3-day transfer, inoculum 3 x 10⁵ cells“. Diese speziellen Zellen werden alle 3 Tage zu neuen Kulturen transferiert und dort in einer Dichte von 3 x 10⁵ Zellen pro 20 cm² eingesetzt. Diese Zellkulturen zeigen ein sehr stabiles Wachstumsmuster (38).

⁵¹⁰ sigmaförmig

⁵¹¹ Das *Bromdesoxyuridin* stellt einen Proliferationsmarker dar (1).

***In vitro*-Detektion des Zelltodes**

Um festzustellen, ob die Nitrofen-Exposition den Anstieg des Zelltodes in Kulturen von NIH-3T3-Zellen verursachte, wurde ein ELISA⁵¹² zur Detektion des Zelltodes durchgeführt. Der Zelltod wurde zu drei Zeitpunkten untersucht (4, 24 und 48 Stunden) unter Verwendung von 10 µM, 25 µM, 50 µM und 100 µM Nitrofen. Nach 4 und 24 Stunden ließen sich keine Anzeichen eines gesteigerten apoptotischen Zelltodes feststellen. Im Gegensatz dazu, zeigte sich nach einer 24-stündigen Inkubationsperiode eine **signifikante Zunahme der Apoptoserate** der Zellen, die 100 µM Nitrofen exponiert wurden und zu einem kleineren Anteil auch bei Exposition mit 50 µM Nitrofen. Bei den Expositionen mit 25 und 10 µM Nitrofen zeigte sich dieser Effekt nicht [560].

Zellproliferation in Nitrofen-exponierten Embryonen

Um den Effekt von Nitrofen auf die Zellproliferation zu definieren, wurde von Clugston und Mitarbeitern in dieser Studie der Prozentsatz von BrdU-positiven Zellen in der PPF, dem Lungenmesenchym und den Extremitätenknospen, zwischen normalen und Nitrofen-exponierten Tieren, untersucht. Den schwangeren Muttertieren wurden am Tag 8 150 mg Nitrofen oral verabreicht und die Gewebe wurden am Tag 13,5 analysiert. Die Wachstumskurve von Nitrofen-exponierten NIH 3T3-Zellen demonstrierte, dass Nitrofen während dieses Zeitrahmens aktiv wirkte [560].

Frühere Untersuchungen des Nitrofenmetabolismus an Ratten, die von Brown *et al.* durchgeführt wurden, brachten hervor, dass Nitrofen hauptsächlich im embryonalen Kompartiment akkumulierte, eine lange Halbwertszeit im mütterlichen Serum hatte (8 Tage) und aus dem mütterlichen Fett umverteilt wurde, was den Erhalt hoher zirkulierender Levels erklärte [565].

Für jede Gruppe wurden in der Studie von Clugston *et al.* 6 bis 11 Embryonen aus drei verschiedenen Würfen untersucht und die Zellen aus drei zufälligen Quellen ausgewählt, um daraus den durchschnittlichen Prozentsatz des BrdU-Wertes der Inkorporation zu berechnen. Die statistische Analyse zeigte eine **signifikante Reduktion der Zellproliferation** innerhalb der PPF der Nitrofen-exponierten Embryonen, verglichen mit jenen der Kontrollgruppe.

Auch die Lungenknospen der Nitrofen-exponierten Embryonen zeigten einen signifikant geringeren Prozentsatz der BrdU-Inkorporation. Nachdem beide, sowohl die Lungen, als auch das Zwerchfell, Targets der Nitrofen-Exposition darstellen, konnte auch eine BrdU-Inkorporation in den Extremitätenknospen, einer Struktur, die nicht typisch mit der Nitrofen-Teratogenese assoziiert ist, gefunden werden. Allerdings ließ sich hier keine signifikante Differenz der Zahl der BrdU-positiven Zellen im Vergleich zwischen normalen und Nitrofen-exponierten Embryonen feststellen [560].

TUNEL⁵¹³-Labeling in der PPF von Nitrofen-exponierten Rattenembryonen

Das TUNEL-Labeling wurde in Geweben der PPF von Nitrofen-exponierten Rattenembryonen durchgeführt, um festzustellen, ob die Nitrofen-Exposition eine Zellapoptose hervorrufen könnte [560].

⁵¹² *Enzyme-linked immuno sorbent assay (heterogener Enzym-Immunoassay)*, Antigennachweis mit Hilfe der „Sandwich-Methode“ (1).

⁵¹³ Das TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) ist eine Nachweismethode der DNA-Fragmentierung, die ein Resultat einer apoptotischen Signalkaskade der Zellen darstellt. Es ist also ein *Apoptose-Nachweis* (39).

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Eine frühere Studie zeigte einen gesteigerten Zelltod innerhalb der PPF nach erfolgter Nitrofen-Exposition am Tag 8,5, aber es ließ sich keine Zunahme der Apoptoserate am Tag 12,5 feststellen [566].

Darum wurden in der hier zusammengefassten Studie von Clugston und Mitarbeitern 150 mg Nitrofen zum Zeitpunkt E11 verabreicht und das Gewebe wurde 24 und 48 Stunden später gewonnen, also an den Tagen 12,5 und 13,5. Mehrere Bereiche der PPF wurden mit TUNEL markiert und nach einer Evidenz für Apoptose in der Nitrofen-exponierten und der Kontrollgruppe untersucht. Allerdings wurde weder nach 24, noch nach 48 Stunden eine gesteigerte Apoptose in der Nitrofen-exponierten Gruppe nachgewiesen. Eine kleine Zahl von apoptotischen Zellen innerhalb der PPF wurde in jeder Gruppe von Tieren beobachtet. Eine Untersuchung dieser Zellen in einer Serie von zufällig selektierten PPFs der Kontroll- und Nitrofen-Gruppe zeigte keine signifikante Differenz in der durchschnittlichen Zahl der apoptotischen Zellen, die nach 24 oder 48 Stunden untersucht wurden [560].

1.12.2. Entwicklung der PPF bei Menschen und Ratten

Die PPF ist ein essentieller Teil des sich entwickelnden Diaphragmas und zeigte in multiplen Tiermodellen mit CDH eine Malformation. Diese Struktur entwickelt sich in Rattenembryonen mit einer CRL zwischen 5 und 9 mm (etwa im Stadium E12-14). Es existiert eine Hypothese, die besagt, dass die wachsende PPF zur Entstehung des posterolateralen Anteils des Zwerchfelles beiträgt und die Muskelpräkursoren und der Zwerchfellnerv sich von dieser Struktur aus verzweigen, um später das gesamte Zwerchfell zu besiedeln. Präkursoren der Muskulatur wandern von der lateralen *dermomyotomalen Lippe* in die PPF ein.

Es ist bekannt, dass die Präkursoren der Muskulatur die PPF nicht vor dem Stadium E12,5 erreichen (CRL etwa bei 6 mm). Interessanterweise erscheinen die Muskelpräkursoren, die die PPF bevölkern, 12 bis 24 Stunden früher, als die Präkursoren des Zwerchfellnervs. Das Verhältnis zwischen der Migration der Muskelpräkursoren zur PPF und der Innervation durch den Zwerchfellnerv ist Gegenstand aktueller Forschung [560,563,564,567].

In menschlichen Embryonen wurde eine Struktur mit dem gleichen dreieckigen Querschnitt und der gleichen anatomischen Lokalisation wie die PPF der Ratte entdeckt, was die Annahme stützt, dass die frühe Entwicklung des Zwerchfelles an Menschen und Ratten in ähnlicher Weise verlaufen könnte (siehe **Abbildung 7**) [560,568].

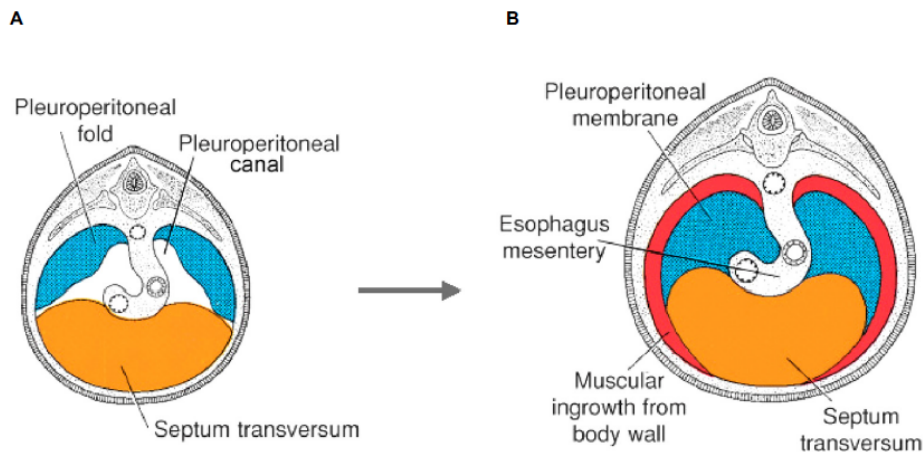


Abbildung 7:

Morphogenese des Zwerchfells.

Beschreibung der Entwicklung des menschlichen Diaphragmas zum Zeitpunkt von 5 Wochen (A) und 4 Monaten (B). Das Diaphragma entwickelt sich aus Anteilen des *Septum transversum*, der *Pleuroperitonealen-Falte*, des *Mesenteriums* und der *Thoraxwand*.

Quelle: © Sadler TW [568]

Die Periode der PPF-Entwicklung findet an menschlichen Embryonen mit einer CRL zwischen 6 und 14 mm statt (etwa in der 4. – 6. SSW). Die Vermutung, dass die CDH des Menschen von einem Defekt der PPF ausgehen könnte, bleibt bestehen. Die Beobachtung, dass eine anormale Entwicklung der PPF in multiplen Tiermodellen einem Zwerchfelldefekt zugrunde liegt, deutet in diese Richtung.

Die Annahme, dass die CDH am Menschen ihren Ursprung von einer Malformation der PPF nehmen könnte, deutet auf eine kritische Periode der Entwicklung der CDH zwischen der 4. und 6. SSW hin. Dies stellt deshalb einen relevanten Aspekt dar, weil diese kritische Periode offenbar viel früher in der Schwangerschaft auftritt, als dies anfangs angenommen wurde [564,569].

1.12.3. Anormale Formation der PPF bei Nitrofen-exponierten Ratten

In der von Clugston *et al.* untersuchten Serie der Nitrofen-exponierten Rattenembryonen wurden keine Defekte der PPF im Stadium E12,5 oder 13,0, sehr wohl aber im Stadium 13,5 beobachtet [560]. Der historischen, von Mey *et al.* [570] beschriebenen Inzidenz von etwa 50% einer Nitrofen-induzierten CDH folgend, hätten sich Clugston und Mitarbeiter eigentlich einen PPF-Defekt bei etwa der Hälfte der untersuchten Embryonen erwartet. Dies war jedoch nicht der Fall [560].

Deshalb wurde angenommen, dass die gröberen Anomalitäten in der PPF zwischen den Stadien E13,0 und E13,5 in Erscheinung treten und mit einem Stadium von raschem Wachstum in dieser Struktur einhergehen könnten. Interessanterweise demonstrierte die immunhistochemische Untersuchung der neuromuskulären Komponente der PPF, dass Muskelpräkursoren und Anteile des phrenischen Nerven in hohem Maße innerhalb der anormalen PPFs der Nitrofen-exponierten Embryonen vorhanden waren. Diese

Beobachtung bestätigte die Hypothese von Babiuk *et al.*, dass die Anomalitäten der PPF von einem Defekt im *nonmuskulären Mesenchym* dieser Struktur ausgingen und unabhängig von der Myogenese auftraten [560,571].

Wie zuvor beschrieben, zeigte die Analyse der Wachstumskurven, dass Nitrofen einen **dosisabhängigen Effekt** auf NIH-3T3-Zellen *in vitro*⁵¹⁴ ausübte. Die Reduktion der vorhandenen Zellzahl könnte zwei mögliche Effekte gehabt haben: zum einen eine Hemmung der Zellproliferation und zum anderen die Induktion des Zelltodes. Bei der Untersuchung des Einflusses von Nitrofen auf die Zellproliferation, war, mittels der Untersuchung der Inkorporation von BrdU, kein Effekt nach 24 Stunden zu erkennen [560]. Allerdings inkorporierten die exponierten Zellen nach einer Zeitspanne von 48 Stunden signifikant weniger BrdU, als die Zellen der Kontrollgruppen. Daraus konnten die Autoren einen **antiproliferativen Effekt** von Nitrofen auf NIH 3T3-Zellen ableiten. Nach einem Zeitintervall von 24 und 48 Stunden nach Nitrofen-Exposition, zeigte sich allerdings keine erhöhte Apoptoserate in den exponierten Zellen. Anders verhielt es sich nach 48 Stunden, als gesteigerte Raten der Apoptose unter Anwendung von 50 und 100 µM Nitrofen, aber nicht bei Verabreichung niedrigerer Konzentrationen, auffielen.

Den Ausführungen von Clugston *et al.* folgend, ist der Effekt von Nitrofen **dosis- und zeitabhängig** [560].

Diese Beobachtung führte zur Annahme, dass die zytotoxischen Effekte von Nitrofen auf indirekte Weise erfolgen und dass messbare Veränderungen erst nach einer gewissen Zeitspanne akkumulieren könnten.

Diese Studie zeigte auch, dass Nitrofen die NIH-3T3-Zellproliferation *in vitro* hemmen und in höheren Dosierungen eine Apoptose auslösen konnte [559].

Die Hemmung der Entwicklung von Pneumozyten und kardialen Fibroblasten durch Nitrofen-Exposition, wurde bereits früher festgestellt. Allerdings wurde in diesen Studien von Gonzalez-Reyes und Mitarbeitern kein Zelltod nachgewiesen und die maximale Dosis von Nitrofen belief sich auf 20 µM [572]. Ähnliche Beobachtungen wurden von Keijzer *et al.* an Kulturen von Rattenlungen-Explantaten gemacht, die zwar über eine reduzierte Proliferation, aber über keine Apoptose berichteten [322].

Eine gesteigerte Apoptoserate konnte auch in *P19-Zellen* eines *Teratokarzinoms* beobachtet werden, die einer hohen Dosis von Nitrofen (120 µM) exponiert wurden. Man kann daraus ableiten, dass Nitrofen in **geringeren Dosen die Zellproliferation hemmen** und in **höheren Dosen eine Zellapoptose verursachen** kann [560,573].

Dieses Resultat ist, den Beschreibungen von Chen *et al.* [574] folgend, u. a. deshalb bedeutend, weil das geschätzte Nitrofen-Level, das den Embryo erreicht, nur etwa 10 bis 20 µM beträgt. Basierend auf *in vitro*-gewonnenen Daten wäre diese Dosis zu gering, um eine Apoptose *in vivo* auszulösen, aber hoch genug, um die Zellproliferation zu hemmen [560].

Bei der Untersuchung der Zellproliferation der PPF unter Nitrofen-Exposition an Rattenembryonen war, wie zuvor bereits beschrieben, zu beobachten, dass die BrdU-Inkorporation nach der Nitrofen-Exposition eine signifikante Abnahme in der PPF und dem sich entwickelnden Lungengewebe zeigte. Keine relevanten Effekte wurden hingegen an den Extremitäten-Knospen bemerkt. Dies legt die Vermutung nahe, dass Nitrofen

⁵¹⁴ in der Zellkultur

Strukturen spezifisch beeinflusst und sie somit das Ziel der Nitrofen-induzierten Teratogenese darstellen [559,322].

Demnach wurde von Clugston und Kollegen angenommen, dass Nitrofen die Fähigkeit besitzt, die Zellproliferation in der PPF und der sich entwickelnden Lunge zu hemmen und damit direkt zur Entstehung der CDH beizutragen. Die Untersuchung der Induktion einer Apoptose innerhalb der PPF nach Nitrofen-Exposition, zeigte keinen Anstieg der Apoptoserate innerhalb von 24 bis 48 Stunden, woraus die Autoren schlossen, dass Nitrofen die CDH **nicht durch apoptotische Mechanismen** verursachte [560].

Wie schon zuvor festgestellt wurde, ist bekannt, dass Nitrofen zu einer anormalen Formierung der PPF an exponierten Rattenembryonen führte und dieser Effekt liegt der Entstehung einer CDH zugrunde. Bisher wurde der Mechanismus, durch welchen der PPF-Defekt entsteht, noch nicht direkt untersucht. In dieser Studie von Clugston und Mitarbeitern zeigte sich allerdings, dass Nitrofen, zumindest teilweise, über eine Hemmung der Zellproliferation wirkte. Es ergaben sich aber keine Anzeichen dafür, dass dieser Effekt durch eine gesteigerte Apoptoserate hervorgerufen wurde, auch wenn dies von den Autoren nicht ausgeschlossen werden konnte [560,566].

Das Konzept, das zur Entstehung einer CDH unter Nitrofen-Exposition führt, geht eher auf eine anormale Zellproliferation, als auf einen Zelltod zurück. Es zeigen sich auch Parallelen zum, von Dawrant *et al.* untersuchten, pathogenen Mechanismus von *Adriamycin*, das zu vertebrealen, analen, trachealen, kardialen, ösophagealen und renalen Anomalitäten und Extremitäten-Fehlbildungen führte. In diesem Modell wurden kongenitale Defekte ebenfalls nicht mit einer Apoptose, sondern mit einem Defekt der Zellproliferation in eine hypothetische Verbindung gebracht.

Es könnten auch *alternative Mechanismen*, wie die Störungen der *Zellmigration* oder -*adhäsion*, zur anormalen Formation der PPF beitragen [560,575].

Die PPF stellt am Menschen und auch am Nagetier eine vorübergehende, schnell wachsende Struktur dar, die eine Schlüsselrolle bei der Entstehung des Zwerchfelles spielt. Die Ergebnisse der *in vivo* durchgeführten Untersuchungen von Nitrofen-exponierten Rattenembryonen führten zu der Annahme, dass die **reduzierte Zellproliferation** vermutlich der primäre Mechanismus zur Entstehung einer anormalen PPF darstellt. Basierend auf den Resultaten dieser Studie kann festgehalten werden, dass Nitrofen die Zellproliferation innerhalb der schnell wachsenden PPF hemmt und damit zu deren Malformation, und so letztlich zu einem Defekt innerhalb des Diaphragmas in der späteren Schwangerschaftsperiode führt [560].

Zusätzlich zur Beeinflussung der Proliferation und Differenzierung ist es möglich, dass Nitrofen die Balance des Zelltodes in Geweben, die sich später zu Lunge und Diaphragma entwickeln, verändern könnte [576]. Nach einer Verabreichung von Nitrofen am Tag 9,5, zeigte sich in der Untersuchung von Clugston *et al.* eine verstärkte Speicherung von *Nile blue*⁵¹⁵-positiven Zellen innerhalb der *Somiten*⁵¹⁶ 2-4 und dem umgebenden Mesenchym, was die Autoren auf eine verfrühte Differenzierung oder auch auf einen Zelltod schließen ließ [560].

⁵¹⁵ *Nile blue* wird für histologische Färbungen verwendet. Man kann damit neutrale Lipide (Triglyzeride, Steroide) die sich rosa anfärben, von Säuren (Fettsäuren, Phospholipide) unterscheiden, die sich blau anfärben (40).

⁵¹⁶ Ein *Somit* (von lat. „*somitus*“) ist das *Ursegment* („*Urwirbel*“), das vorübergehend in der embryonalen Entwicklung der Wirbeltiere auftritt. Die Somiten werden in Kopf-Schwanz-Richtung (*craniocaudal*) aus dem Mesoderm seitlich der Mittellinie (*paraxial*) abgeschnürt. Sie liegen daher in zwei Strängen, rechts und links der axialen Strukturen *Chorda dorsalis* und *Neuralrohr* (41).

Nachdem das Mesoderm der *zervikalen Somiten*⁵¹⁷ 3 bis 5 zur Muskulatur des Diaphragmas beiträgt, wurde angenommen, dass ein Schaden in diesem Bereich zu einer verminderten Bildung von Zwerchfell-Muskulatur führen könnte. Diese Hypothese wurde allerdings von Babiuk *et al.* in Frage gestellt, als sich zeigte, dass Nitrofen eine CDH auch ohne Anwesenheit von Muskulatur im Zwerchfell bewirken konnte [560,577]. Deshalb ist es unklar, ob die erwähnten *Nile blue-positiven Zellen* zur Entwicklung der CDH beitragen könnten [560].

Die Hypothese der Apoptose wurde durch die Ergebnisse einer Studie von Kling *et al.* [573] an *P19-Zelllinien* unterstützt. Diese Zellen stammen von einem *Teratokarzinom* ab und besitzen eine Pluripotenz⁵¹⁸ und werden demnach häufig als Modell eines fetalen Gewebes verwendet [578]. Es wurde beobachtet, dass P19-Zellen einer dosisabhängigen *Caspase-3*⁵¹⁹-Wirkung in Assoziation mit einer gesteigerter *p38 MAP-Kinase-Aktivität*⁵²⁰ und einem Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies unterlagen [573]. Zusätzlich fiel auf, dass das Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem *Glutathion*⁵²¹ verringert war und durch die Verabreichung des antioxidant wirkenden *N-Acetyl-Cysteins (NAC)* teilweise verbessert werden konnte. So ist es möglich, dass Nitrofen eine Apoptose in Zellen verursacht, die sich später zu Lunge oder Zwerchfell entwickeln. Dieser Mechanismus könnte die teilweise Milderung der Schäden erklären, die mit Hilfe der Verabreichung von Antioxidantien, wie *NAC*, *Vitamin E*, *Glutathion* und *Ascorbinsäure*, erzielt werden können [560,579].

Im Gegensatz zu dieser Studie wurde von Clugston und Mitarbeitern [560] am Rattenmodell, wie bereits genauer beschrieben, der Zelltod im Lungengewebe untersucht und festgestellt, dass an Feten mit einer durch Nitrofen induzierten CDH keine erhöhten Apoptosewerte vorlagen und somit die Lungenhypoplasie und die CDH nicht apoptosebedingt zu sein schienen, wie dies von Jesudason *et al.* angenommen wurde [580]. In einer anderen Studie an einer fetalen Lungenkultur, zeigte sich auch keine erhöhte *DNA-Fragmentation* in fetalem Lungengewebe nach *in vitro* Nitrofen-Exposition [322]. Des Weiteren führte Nitrofen zu keiner Erhöhung des Zelltodes in Kulturen von *H441-Pneumozyten*, was in der Publikation von Gonzalez-Reyes *et al.* nachzulesen ist [572].

⁵¹⁷ *Somiten* im Halsbereich

⁵¹⁸ Als *pluripotent* bezeichnet man *Stammzellen*, welche die Fähigkeit besitzen, sich zu Zellen der drei Keimblätter (*Ektoderm*, *Entoderm*, *Mesoderm*) und der *Keimbahn* eines Organismus zu entwickeln. Sie können zu jedem Zelltyp eines Organismus differenzieren, da sie noch auf keinerlei bestimmten Gewebstyp festgelegt sind. Jedoch sind sie, im Gegensatz zu *totipotenten Stammzellen*, nicht mehr in der Lage, einen gesamten Organismus zu bilden, da pluripotente Zellen keine extraembryonalen Gewebe bilden können (42).

⁵¹⁹ *Caspasen* stellen eine Gruppe von *Proteasen* mit einem *Cystein* im aktiven Zentrum (*Cysteinproteasen*) dar. Sie spalten Peptidbindungen C-Terminal von Aspartat. Daher leitet sich der Name *Caspase* (*cysteinyl-aspartate specific protease*) ab. Zum Auslösen des Zelltods werden *Initiator-Caspasen* (z. B. *Caspase 8* und *9*) aktiviert. Diese wiederum spalten die Pro-(Vorläufer-) Form nachgeschalteter *Effektor-Caspasen* (unter anderem *Caspase 3*, *7*, *6*), die zelleigene Proteine, wie unter anderem *Aktin* und *Lamin*, spalten (43).

⁵²⁰ Die *p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38 MAPK)* sind eine Klasse von Proteinen und gehören, wie auch die *JNK*, zur Familie der *Mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK)*. Sie sind in Signalkaskaden (siehe *MAP-Kinase-Weg*) eingebunden, deren Auslöser externe Stimuli wie *Cytokine*, *Hitzeschock*, *Strahlung* und *osmotischer Schock* sind. Sie haben außerdem Bedeutung für Zelldifferenzierung, Zellwachstum und Apoptose (44).

⁵²¹ *Glutathion (GSH)*, auch *γ-L-Glutamyl-L-cysteinylglycin*, ist ein *Pseudotripeptid*, das aus den drei Aminosäuren *Glutaminsäure*, *Cystein* und *Glycin* gebildet wird. Es ist in fast allen Zellen in hoher Konzentration enthalten und gehört zu den wichtigsten, als *Antioxidans* wirkenden, Stoffen im Körper. Gleichzeitig ist es eine Reserve für *Cystein* (45).

1.12.4. Nitrofen und seine dosisabhängige Induktion der Lungenhypoplasie

*Nitrofen*⁵²² ist ein Herbizid⁵²³, welches lange Zeit in der Landwirtschaft verwendet wurde. Es wurde 1964 in den USA als Unkrautvernichtungsmittel entwickelt und weltweit, unter anderem auch in der DDR, unter den Handelsnamen *Trizilin*®, *TOK*® und *Trazalex*® vertrieben. Nitrofen-Rückstände in Eiern und Geflügel lösten im Sommer 2002 einen Nitrofen-Skandal aus [581]. Die Anwendung von Nitrofen ist seit 1980 in der Bundesrepublik Deutschland verboten. Die Europäische Union hat die Anwendung von Nitrofen 1988 ebenfalls allen ihren Mitgliedsstaaten untersagt.

Nitrofen zeigt *teratogene*⁵²⁴, und in höheren Dosen auch *kanzerogene*⁵²⁵ Effekte. Viele wissenschaftliche Erkenntnisse bezüglich der Zwerchfellhernien und der Lungenhypoplasie verdankt der Mensch der Forschung am Nitrofen-Tiermodell. Dabei sind vor allem Mäuse und Ratten zu nennen, die eine dem Menschen sehr ähnliche Lungenentwicklung aufweisen (siehe **Tabelle 4**) [581].

⁵²² 2,4-dichloro-phenyl-p-nitrophenyl-ether

⁵²³ Unkrautvernichtungsmittel

⁵²⁴ Frucht-schädigende Effekte

⁵²⁵ krebserregende Effekte

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Tabelle 4: Stadien der Lungenentwicklung bei Mensch und Maus.
Quelle: © Van Tuyl M, Post M [197]

Stadium	Mensch (Woche)	Maus (Tag)	Hauptereignisse	Status der epithelialen Differenzierung
embryonal	3,5-7	9,5-14,2	Bildung der Lungenknospen, der Trachea, des rechten und linken Hauptbronchus und der Haupt-Luftwege	Undifferenziertes Säulenepithel
pseudo-glandulär	5-17	14,2-16,6	Ausbildung des bronchialen Baumes, alle präazinären Strukturen sind gebildet	Proximal: Säulenepithel, Zilien-tragende und nicht-Zilien-tragende basale und neuroendokrine Zellen. Distal: kubisches Epithel, Präkursoren der Typ II-Zellen
kanalikulär	16-26	16,6-17,4	Bildung des zukünftigen pulmonalen Azinus, Wachstum des kapillären Bettes	Proximal: Säulenepithel, Zilien-tragende und nicht-Zilien-tragende basale und neuroendokrine Zellen Distal: Differenzierung der kubischen Typ II- zu squamösen Typ I-Zellen
sakkulär	24-38	17,4-5 postnatal	Bildung der alveolären Sacculi und Ductuli	Proximal: Zilien-tragende und nicht-Zilien-tragende Clara-Zellen, basale und neuroendokrine Zellen Distal: Typ I-Zellen flachen ab und Typ II-Zellen reifen
alveolär	36 W. -2 Jahre	5-30 (postnatal)	Bildung der Alveolen durch <i>Septierung</i> der alveolären Luftsäckchen, Ausdünnung der interalveolären Septen und Fusion des kapillären Bettes zu einem einlagigen Netzwerk	Proximal: Säulenepithel, Zilien-tragende und nicht-Zilien-tragende basale und neuroendokrine Zellen Distal: reife Typ I- und Typ II-Zellen

Nitrofen ist für die Verursachung von Lungenhypoplasie und Zwerchfellhernien bekannt. Die Studien von Cilley *et al.* am Mausmodell ergaben, dass die fetale Lungengröße umgekehrt mit der verabreichten Nitrofen-Dosis korrelierte. Morphologische Analysen dieser Lungen ließen signifikante Unterschiede in Lungengröße, Oberfläche und Zahl der Luftwege erkennen.

Eine linksseitige diaphragmatische Hernie⁵²⁶ in dorsolateraler Position, begleitet von pulmonaler Hypoplasie⁵²⁷, zeigte sich in etwa 30% der Fälle von am GD 14⁵²⁸ untersuchten Feten, deren Muttermaus zum Zeitpunkt GD 8 25mg Nitrofen erhielt [581].

⁵²⁶ DH

Ein Teil der Leber konnte in diesen Hernien gefunden werden. Die Lungen der Feten, die an den GDs 9, 10, und 11 Nitrofen exponiert wurden, erreichten eine normale Größe. Mäusefeten, die am GD 8 einer Dosis von 25 mg Nitrofen ausgesetzt wurden, zeigten eine *PH* und *DH*, während andere Dosen eine dosisabhängige *PH* alleine, oder keine (am GD 11) hervorriefen. Diese Studie von Cilley *et al.* brachte hervor, dass für das Entstehen einer linksseitigen *CDH*⁵²⁹ und *PH* an Mäusefeten, **Dosis und Zeit der Verabreichung** eine entscheidende Bedeutung haben [581].

Die linksseitigen posterolateralen Defekte des Zwerchfells („*Bochdalek Hernien*“) stellen etwa 85% der Fälle der *CDH* dar. Histologisch zeigen die, durch die sich in den Thorax vorwölbenden Baueingeweide beengten Lungen, reduzierte Zahlen an Alveolen und Bronchialästen und eine verstärkte Bildung von Muskulatur im Gefäßbett. Die Pathogenese der *CDH* und der assoziierten *PH* ist aber noch immer schwer definierbar [581].

Am Menschen erscheint die primordiale Lunge zum Zeitpunkt der 3.-4. SSW. Manche Spekulationen von Forschern deuten auf einen Verschlussdefekt des *Pleuroperitoneal-Kanals* während der 8.-10. SSW hin und sie vermuten auch eine sekundär verursachte pulmonale Hypoplasie, die durch die Beeinflussung der in den Thorax vortretenden Bauchorgane hervorgerufen werden könnte [582,583].

Eine andere Theorie besagt, dass die betroffenen Lungen primär hypoplastisch wären und dass der Zwerchfelldefekt ein konkurrierendes Ereignis, oder auch eine Konsequenz der Lungenhypoplasie, verursacht durch mangelhafte Zell-Zell-, oder Zell-Matrix-Verbindungen, darstellen könnte [584,585].

Die Untersuchungen der Ultrastruktur und biochemischen Analysen der Surfactant-Lipide und Proteine der hypoplastischen Lungen waren inkonsistent. Blackburn *et al.* kamen zu dem Ergebnis, dass hypoplastische menschliche Lungen mit einer begleitenden *CDH*, verglichen mit normalen Lungen, weniger Gesamtlipide, verringerte Phospholipide und weniger *Lezithin*⁵³⁰ pro Milligramm DNA aufwiesen.

Die *CDH*-Lungen waren hypozellulär⁵³¹, biochemisch unreif und zeigten einen Mangel an Surfactant. In einer Studie an fetalen Schafen mit *CDH* und begleitender *PH*, beschrieben Glick *et al.* verringerte Gesamtpospholipide und einen gesteigerten Proteingehalt pro Gramm Lungengewebe. Die meisten Studien ergaben, dass die Surfactant-Synthese am Rattenmodell, nach Nitrofen Verabreichung, entweder nicht beeinflusst oder aber doch beeinträchtigt war. Allerdings beschrieben Tovar und Mitarbeiter in einer einzelnen Studie auch eine Zunahme der Surfactant-Synthese [586-588].

Die von Cilley *et al.* [581] untersuchten Mäusefeten, die am GD 8 einer 25 mg Nitrofen-Exposition unterzogen wurden, bildeten alle hypoplastische Lungen, von welchen die schweren Fälle auch einen zusätzlichen Zwerchfelldefekt aufwiesen. Die Nitrofen-exponierten Feten zeigten schwammartige Körper mit signifikant reduzierter Körpergröße und reduziertem Körpergewicht, verglichen mit Feten zum Zeitpunkt GD 14, die nicht exponiert waren (siehe **Abbildung 8**).

⁵²⁷ *PH*

⁵²⁸ Schwangerschaftstag 14: *Gestational Day14* (engl.)

⁵²⁹ *LCDH*

⁵³⁰ *Phosphatidylcholin*

⁵³¹ verringerte Zellzahl



Abbildung 8:

Vergleich zwischen normalem Mäusefetus (GD 14), *Abbildung 1a*, und Nitrofen-exponiertem Mäusefetus (GD 14), *Abbildung 1b*. Die Nitrofen-Exposition der Mutter wurde hier mit 25 mg Nitrofen am GD 8 per Magensonde durchgeführt. Auffallend ist die geringere Körpergröße des Nitrofen-exponierten Fetus.

Vergrößerung: 7-fach.

Quelle: © Cilley *et al.* [581]

Diese Beobachtung wurde auch an Feten am GD 19 und an Neugeborenen gemacht. Die Abnahme des Körpergewichtes war dosisabhängig und spezifisch für den Schwangerschaftstag. Beispielsweise zeigten Feten, die geringeren Nitrofendosen ausgesetzt wurden, keine Veränderungen des Körpergewichtes und ihre Körper waren weniger vulnerabel⁵³². Außerdem hatten Nitrofendosen, die der Mäusemutter am GD 11 verabreicht wurden, keine Effekte auf die Beschaffenheit oder das Gewicht des fetalen Körpers. Ein ähnlicher Trend stellte sich bei der Beobachtung der Lungengewichte heraus [581].

Am GD 14 waren die Lungen der Nitrofen-exponierten Feten (Nitrofendosen 10-35 mg) alle hypoplastisch und alle überaus klein, aber auch **alle ohne einen nachweisbaren Zwerchfelldefekt**, wenn die mütterliche Nitrofen-Exposition am GD 9 oder 10 erfolgte. Bei mütterlicher Nitrofen-Exposition am GD 11 traten unter den Feten **keine hypoplastischen Lungen** auf. Geborene Feten mit pulmonaler Hypoplasie hatten alle eine sehr schlechte Prognose und lebten in dieser Studie nicht länger als 30 Stunden nach der Geburt.

Bei mütterlicher Verabreichung von 25 mg Nitrofen am GD 8 wurden die Feten mit hypoplastischen Lungen geboren, wobei etwa 30% **zusätzlich einen linksseitigen Zwerchfelldefekt** aufwiesen. Außerdem zeigten nicht nur die Lungengewichte, sondern auch die Größe der Lungen, die Oberfläche und das Auftreten von Zwerchfellhernien eine Abhängigkeit von der verabreichten **Nitrofendosis** und vom Schwangerschaftstag zum **Verabreichungszeitpunkt** (siehe *Abbildung 9*) [581].

⁵³² verletzlich

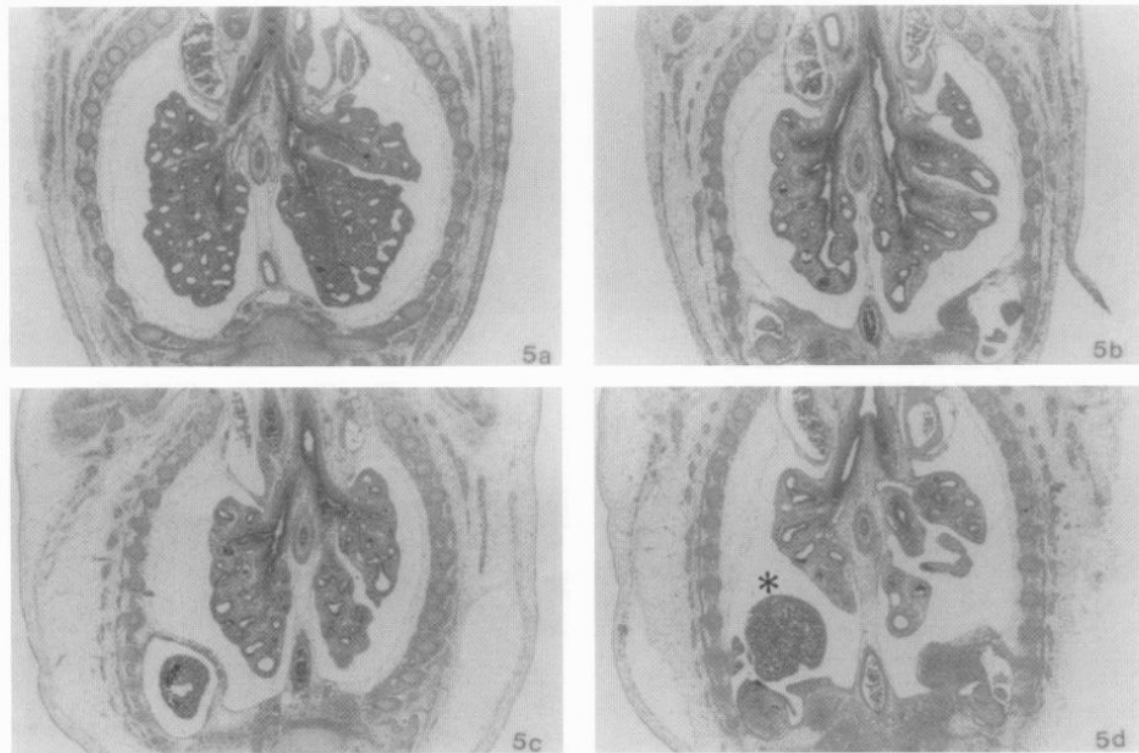


Abbildung 9: Mikroskopische Fotografien der Koronar-Ebene der Thoraxhöhle von Mäusefeten (GD 14). Die Mütter der Feten wurden am GD 8 unterschiedlichen Dosen von Nitrofen exponiert. Auffallend ist die dosisabhängige Reduktion der Größe der fetalen Lungen. Vergrößerung: 180-fach.
5a: normaler, unexponierter Fetus, **5b:** 10 mg Nitrofen, **5c:** 17,5 mg Nitrofen, **5d:** 25 mg Nitrofen. *Stern:* fehlendes Zwerchfell.
Quelle: © Cilley *et al.* [581]

Speziell die am GD 14 Nitrofen-exponierten Feten hatten schwammige Körper und zeigten mehr Kollageneinlagerungen in den Körperwänden, mit Ausnahme der am Tag 11 exponierten Feten, die eine normale Beschaffenheit der Körperwände aufwiesen. Interessanterweise zeigte sich der linksseitige Zwerchfelldefekt nur an GD 14-Feten mit schwererer linkspulmonaler Hypoplasie. In der Hernie waren minimale Leberanteile, aber keine Baucheingeweide nachzuweisen [581].

Die von Cilley *et al.* ermittelte Durchschnittslänge von normalen linken Lungen von GD 14-Feten betrug 1,8 mm, bei schwerer Lungenhypoplasie und assoziierter DH aber nur 0,8–0,9 mm und bei Lungen ohne begleitende DH 1,2–1,4 mm. Die morphologische Analyse von GD 14-Feten, unter Nitrofen-Exposition von 10, 20 und 25 mg am GD 8, brachte eine dosisabhängige Hypoplasie der linken Lungen hervor. Auch die reduzierte Lungenoberfläche und die reduzierten Lufträume waren auffallend. Die Analyse der epithelialen Zellen aus den Bronchien und azinären Strukturen ergab keine Veränderungen zwischen normalen und Nitrofen-exponierten Feten [581].

Die Ultraschalluntersuchung am GD 14 deutete auf Veränderungen in den Lungen von Nitrofen-exponierten Feten hin. Abgesehen von der unterschiedlichen Größe zeigten die normalen und Nitrofen-exponierten Lungen gewisse Gemeinsamkeiten. Beide, sowohl normale, als auch Nitrofen-exponierte GD 14-Feten, wiesen großgewachsene Epithelzellen auf. Es zeigte sich allerdings in den behandelten Lungen ein Fehlen von Glykogenzonen,

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

die in der unbehandelten Kontrollgruppe prominent vorhanden waren (siehe hierzu die **Abbildungen 10** und **11**) [581].

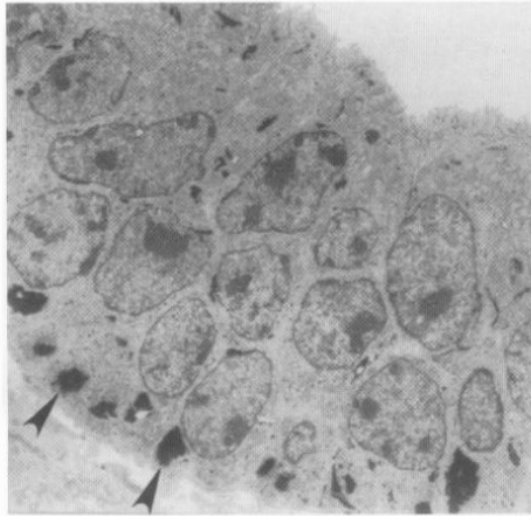


Abbildung 10:

Elektronenmikroskopische Fotografie der distalen Tubuli einer murinen fetalen Lunge (GD 14) im *pseudoglandulären Stadium*. Im Epithel zeigen sich prominente Glykogen-Zonen (*Pfeilköpfe*). Vergrößerung: 2250-fach.

Quelle: © Cilley *et al.* [581]

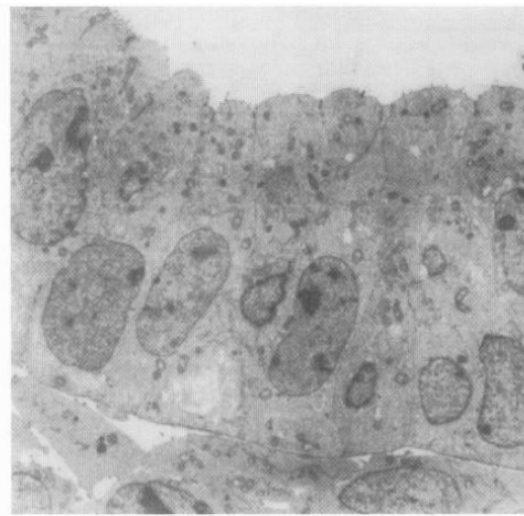


Abbildung 11:

Elektronenmikroskopische Fotografie der Lunge eines Nitrofen-exponierten murinen Fetus. Das Epithel weist, im Vergleich zu **Abbildung 10**, einen Mangel an Glykogen-Zonen auf.

Vergrößerung: 2250-fach.

Quelle: © Cilley *et al.* [581]

Die Wirkung von Nitrofen wird vermutlich auf die chemische **Strukturähnlichkeit mit dem Schilddrüsenhormon** (siehe **Abbildung 12** und **13**) zurückgeführt.

Es wird darüber spekuliert, dass Nitrofen auf eine eigene Art dem Schilddrüsenhormon entgegenwirken könnte, indem es eine Hemmung des THG⁵³³, dadurch das Ansteigen des freien Schilddrüsenhormons und folglich eine *thyreomimetische*⁵³⁴ Wirkung ausüben, oder durch direkte Stimulation der *nukleären Thyroidhormonrezeptoren* des Fetus seine Wirkung hervorrufen könnte.

In alternativen Hypothesen beschrieben Ten Have-Opbroek *et al.*, dass Nitrofen seine Effekte über eine Veränderung des Schilddrüsenhormon-Metabolismus, hervorgerufen durch eine nichtkompetitive Hemmung⁵³⁵ der Bindung des T3⁵³⁶ an den nukleären T3-Rezeptor und der damit entstehenden *thyreostatischen*⁵³⁷ Wirkung, vollziehen könnte [589,590].

Laut Kavlock *et al.* verändert die Wirkung von Nitrofen offenbar die zelluläre und biochemische Beschaffenheit der sich entwickelnden Rattenfeten durch einen anderen Effekt als jenen, der für die Verursachung der DH verantwortlich zeichnet, denn die Feten ohne eine DH wurden der gleichen Nitrofenexposition zur selben Zeit ausgesetzt und hatten kleinere Lungen als die Kontrollfeten.

⁵³³ *Thyroidhormon-bindendes Globulin*

⁵³⁴ stimulierende Wirkung auf die Schilddrüse

⁵³⁵ Ein *nichtkompetitiver Antagonist* ist eine Substanz, die in der Lage ist, die Bindung eines Agonisten an einen Rezeptor zu hemmen, ohne dass diese Substanz durch den Agonisten verdrängt werden kann (46).

⁵³⁶ *3,5,3'Triiodthyronin*

⁵³⁷ hemmende Wirkung auf die Schilddrüse (1)

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

In ihrer Studie kommen Cilley *et al.* zu einem ähnlichen Ergebnis, denn die Exposition der Muttertiere mit 25 mg Nitrofen am GD 8 führte zu DH- und auch Non-DH-Feten, die aber alle eine pulmonale Hypoplasie ausprägten. Allerdings hatten die Feten mit einem zusätzlichen Zwerchfelldefekt eine schwere linksseitige Lungenhypoplasie [581,591,592]. Es ist bekannt, dass Schilddrüsenhormone, in Kombination mit anderen Hormonen, notwendig für eine normale Lungenentwicklung sind. Eine *Thyreoidektomie*⁵³⁸ führte in Untersuchungen von Cunningham *et al.* am fetalen Schafsmodell zu einer verzögerten Lungenreifung [593]. Andererseits führte die Verabreichung von *Thyroxin*⁵³⁹ an fetale Ratten zu einer Beschleunigung der strukturellen Entwicklung der Lunge und verstärkte die Surfactant-Bildung [594,595]. Die Beobachtung, dass eine Thyreoidektomie zwar zu einer verzögerten Reifung führte, aber die Plasma-Cortisolspiegel unbeeinflusst ließ, führte zu der Annahme, dass offensichtlich sowohl Cortisol, als auch T3, für die Lungenentwicklung notwendig sein könnten [581,596,597].

Laut Untersuchungen von Brandsma und Kollegen ist es möglich, dass Nitrofen die Expression des TTF1 erhöht, indem es mit der Gen-Transkription des Thyroid-Rezeptors interferiert [598]. Diese Hypothese stützt sich auf die, bereits beschriebene, strukturelle Ähnlichkeit von Nitrofen und dem Schilddrüsenhormon [599].

Das *TTF1*-Gen enthält ein *responsives Element für das Schilddrüsenhormon*⁵⁴⁰ in seiner Promotorsequenz. Experimente von Brandsma und Mitarbeitern, die mit rekombinanten Schilddrüsenhormon-Rezeptoren durchgeführt wurden, zeigten, dass Nitrofen die Bindung von *Trijodthyronin (T3)* an die rekombinanten Formen des Schilddrüsenrezeptors ($\alpha 1$ und $\beta 1$) auf eine kompetitive Weise hemmte. Allerdings wies Nitrofen in einer weiteren Studie von Manson *et al.* keine Konkurrenz mit T3 oder *Thyroxin (T4)*, in Bezug auf die Antikörperbindung im Radioimmunoassay⁵⁴¹, auf und dadurch wurde die erwähnte Hypothese von Brandsma *et al.* in Frage gestellt [598,600].

Nitrofen könnte auch andere Bereiche in der Schilddrüsenhormon-Signalkette beeinflussen. Am Mausmodell fiel eine Reduktion der T4-Spiegel um bis zu 60% der Werte der Kontrollgruppe nach Verabreichung von Nitrofen auf. Nachdem aber Nitrofen in oben genannter Studie die Antikörperbindung im RIA nicht beeinflusste, könnten die beobachteten Ergebnisse auch auf einen Einfluss auf das TSH⁵⁴² und damit direkt auf die T4-Levels zurückzuführen sein [600,601].

Am Rattenmodell hat Nitrofen, das am Tag 11 verabreicht wurde, die mütterlichen TSH- und T4-Levels und auch die fetalen T4-Levels verringert. Eine partielle Milderung dieser Veränderungen konnte an Feten erreicht werden, denen, nach Durchführung einer *TPTX*⁵⁴³, zusätzlich zu Nitrofen auch T4 verabreicht wurde. Dies spricht für eine Beeinflussung des Schilddrüsenhormons auf *indirektem Wege* durch Nitrofen.

In einigen wenigen Fällen wurde auch über eine Assoziation der CDH mit *Hyper*⁵⁴⁴- und *Hypothyroidismus*⁵⁴⁵ berichtet [600,602].

⁵³⁸ operative Entfernung der Schilddrüse

⁵³⁹ Das *Thyroxin (3,3',5,5'-Tetraiod-L-thyronin)* ist ein Hormon, das in der Schilddrüse bei Säugetieren gebildet wird (35).

⁵⁴⁰ *Thyroid hormone binding response element*

⁵⁴¹ RIA

⁵⁴² *Thyroid stimulating hormone*

⁵⁴³ Unter einer *Thyreo-Parathyreoidectomy* versteht man eine kombinierte Entfernung der Schilddrüse und der Nebenschilddrüsen (1).

⁵⁴⁴ Schilddrüsenüberfunktion

⁵⁴⁵ Schilddrüsenunterfunktion

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Massaro *et al.* beschrieben eine Beeinträchtigung der Septierung der Lungen am Rattenmodell durch Dexamethason⁵⁴⁶.

Dexamethason und T3 haben additive Effekte in Bezug auf die Stimulation der Bildung von gesättigtem Phosphatidylcholin in fetalen Rattenlungen und auf ähnliche Weise auch in menschlichen Lungenkulturen, in welchen eine große Zahl von lamellären Körperchen nach dieser Kombinationsbehandlung nachweisbar war. Alfonso *et al.* beschrieben in ihrer Nitrofen-Studie ein verzögertes Wachstum der Lungentubuli mit fortgeschrittener Typ II-Zell-Reife, mit anderen Worten also eine transiente Stimulation der Lungendifferenzierung auf Kosten des Lungenwachstums [603-606].

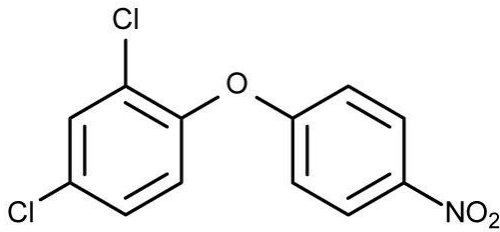


Abbildung 12:

Strukturformel von *Nitrofen*

Quelle: © Roche Lexikon Medizin,
4. Auflage [595]

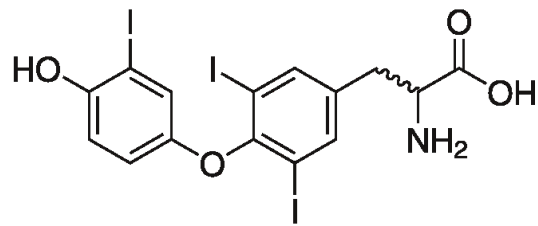


Abbildung 13:

Strukturformel von *Triiodthyronin, T3*.

Quelle: © Roche Lexikon Medizin,
4. Auflage [595]

Mütterliche Nitrofen-Exposition führt auch zu einer Verringerung der fetalen Blutgefäße in der Lunge, ungeachtet des Auftretens einer Zwerchfellhernie [607].

Basierend auf den Beobachtungen von Cilley *et al.* [581], hat die Nitrofenwirkung auf das Lungenwachstum einen dosisabhängigen und Schwangerschaftstag-spezifischen Effekt und verursacht Lungenhypoplasie mit oder ohne begleitenden Zwerchfeldefekt. Die durchschnittlichen Körpergewichte der Nitrofen-exponierten Feten waren, abhängig vom Tag der Nitrofenverabreichung, reduziert. Die Auswirkung der Exposition auf das fetale Körpergewicht war nicht dosisabhängig, aber zeigte einen zeitlichen Effekt. Die Ultrastrukturen der Lungen der GD 14-Feten, die Nitrofen-exponiert waren, zeigten eine große Ähnlichkeit zu jenen der nichtexponierten Kontrollgruppe, allerdings fehlten in der exponierten Gruppe die Glykogen-Aggregate im Lungengewebe. Die gesteigerte Kollageneinlagerung in den Körperwänden von exponierten Feten erklärte vermutlich deren schwammiges Erscheinungsbild [581].

Die Abwesenheit der Glykogenzonen in den Nitrofen-exponierten fetalen Lungen könnte mit der verzögerten Lungenentwicklung, aber auch der Wirkung von Glucocorticoiden zusammenhängen. Laut den Beobachtungen von Nakao *et al.*, stieg die fetale Plasmakonzentration von Cortisol nicht an, solange die Surfactant-Biosynthese nicht initiiert wurde.

Am Rattenmodell mit Nitrofen-induzierter CDH wurde von Suen *et al.* ein Anstieg des Gehaltes an gesättigten Phosphatidylcholinen der Lunge bei vorgeburtlicher Verabreichung von Glucocorticoiden bewiesen und auch eine ansteigende Surfactant-assoziierte Protein-mRNA, nach Dexamethason-Behandlung der Rattenfeten, wurde beobachtet. Trotz dieser

⁵⁴⁶ ein Glucocorticoid

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Studien ist nicht klar, ob Glucocorticoide den Stimulus für die Surfactant-Produktion in fetalen Lungen darstellen [581,608-610].

Feten, deren Mütter am GD 9 und 10 mit Nitrofen behandelt wurden, zeigten zwar eine pulmonale Hypoplasie, aber keine Zwerchfelldefekte, was die Autoren vermuten ließ, dass die Lunge primär hypoplastisch gewesen und dann ein Zwerchfelldefekt hinzugetreten sein könnte, oder eben auch nicht. Der Primäreffekt von Nitrofen am Mausmodell war demnach also offenbar die Lungenhypoplasie [581].

Der Zwerchfelldefekt könnte, laut Ansicht von Cilley *et al.*, ein Resultat einer fehlerhaften Interaktion zwischen der sich anormal entwickelnden Lunge und dem Zwerchfell sein. Ebenso könnte er aber auch durch eine spezifische Beeinflussung des sich entwickelnden Zwerchfells durch Nitrofen entstehen. Bei spontaner Geburt hatten die betroffenen Mäuse eine Lebenserwartung von unter 2 Tagen. Auf der anderen Seite entwickelten die Mäusefeten, bei denen die Exposition mit Nitrofen am GD 11 erfolgte, keine hypoplastischen Lungen und zeigten, im Falle einer Geburt, keine respiratorische Insuffizienz und entwickelten sich normal [581].

Wie in einer Publikation von Iritani [584] nachzulesen ist, entspricht der dorsolaterale Defekt im Zwerchfell der Maus dem posterolateralen Defekt, der am menschlichen Zwerchfell beobachtet werden kann.

1.12.5. Die Pathogenese der durch Nitrofen induzierten CDH

Wie bereits beschrieben, ist die CDH eine Entwicklungsstörung des Zwerchfells, die mit einer Beeinträchtigung der Lungenentwicklung einhergeht. In der normalen intrauterinen Entwicklungsphase bildet das Zwerchfell eine Struktur, die eine Trennung zwischen Bauch- und Brusthöhle darstellt. Im Bereich der Hernie fehlen Zwerchfellanteile. Durch diesen Defekt und den Druck in der Bauchhöhle gelangen Eingeweide durch die Hernie in die Brusthöhle und beengen dort die sich entwickelnden Lungenstrukturen [566].

Dies führt bei Neugeborenen, die unter einer CDH leiden (etwa eine von 2500 Geburten), zu pulmonaler Hypoplasie, pulmonaler Hypertension und einem Mangel an Surfactant. Die Mortalitätsrate der unter einer CDH leidenden Kinder liegt bei etwa 50% [566]. Schätzungsweise kommt es in etwa einer von 2000 Schwangerschaften aufgrund einer CDH zu einem vorgeburtlichen Tod des Kindes [611].

Obwohl die Ätiologie der CDH noch undurchsichtig ist, gibt es eine Reihe von Theorien bezüglich ihrer Pathogenese (siehe oben):

Eine Theorie von Iritani besagt, dass die Fehlbildung des Zwerchfells lediglich ein sekundärer Defekt wäre, der aus einer Fehlentwicklung des benachbarten Lungengewebes resultieren könnte [584].

In einer zweiten Theorie nimmt Iritani an, dass eine Störung der normalen Innervation des Zwerchfells durch den Zwerchfellnerv⁵⁴⁷ die normale Muskelentwicklung bremsen könnte [584].

Die dritte, häufigste Erläuterung besagt, dass eine Störung des Verschlusses des Pleuroperitoneal-Kanals⁵⁴⁸ die CDH verursachen könnte [611].

⁵⁴⁷ *Nervus phrenicus*

⁵⁴⁸ Dieser Kanal zwischen Pleurahöhle und Bauchhöhle wird später durch das Zwerchfell verschlossen.

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

In einer vierten Theorie deuten Skandalakis *et al.* eine mögliche Fehlentwicklung der *Myotubes*⁵⁴⁹ an, die im Bereich der CDH zu schwach sein und somit unter dem Druck der Bauchorgane zur Ruptur neigen könnten [612].

Jede dieser Theorien wird nur durch eine unterschiedliche Anzahl von wissenschaftlichen Daten gestützt und es besteht ein Mangel an Erkenntnissen in Bezug auf die normale Zwerchfellentwicklung [566].

Nitrofen verursacht, wenn es als Einzeldosis einer trächtigen Ratte verabreicht wird, der menschlichen CDH vergleichbare Veränderungen an den Rattenfeten [613]. Obwohl Nitrofen für erwachsene Tiere relativ ungiftig zu sein scheint, verursacht es an den Feten eine Vielzahl von tödlichen kardiovaskulären und die Lunge betreffenden Schäden [614,615].

Im Stadium E9 und E11 der Schwangerschaft als Einzeldosis verabreicht, verursacht Nitrofen, wie bereits beschrieben, in erster Linie der CDH vergleichbare Veränderungen in der Entwicklung. Für die durch Nitrofen verursachten Veränderungen ist der *Zeitpunkt* der experimentellen Verabreichung an das Muttertier von entscheidender Bedeutung [566].

Einzeldosen, die am Tag 9 verabreicht werden, verursachen hauptsächlich **linksseitige, aber selten auch rechts- oder beidseitige** Zwerchfellhernien.

Am Tag 11 verabreichte Einzeldosen rufen fast **ausschließlich rechtsseitige** Zwerchfellhernien hervor [566].

Die Anzahl der durch Nitrofen beeinflussten Feten ist dosisabhängig und kann auch bezüglich des Transfers des Teratogens zu den Feten variieren. Milde bis sehr schwere Defekte des Zwerchfells zeigen ein Fehlen der muskulären Zwerchfellanteile in einer Größenordnung zwischen 25 und 90% (siehe **Abbildung 14**).

Alle Defekte beziehen den posterolateralen Anteil, die *Region von Bochdalek*, mit ein [612].

⁵⁴⁹ Anlage der Muskulatur

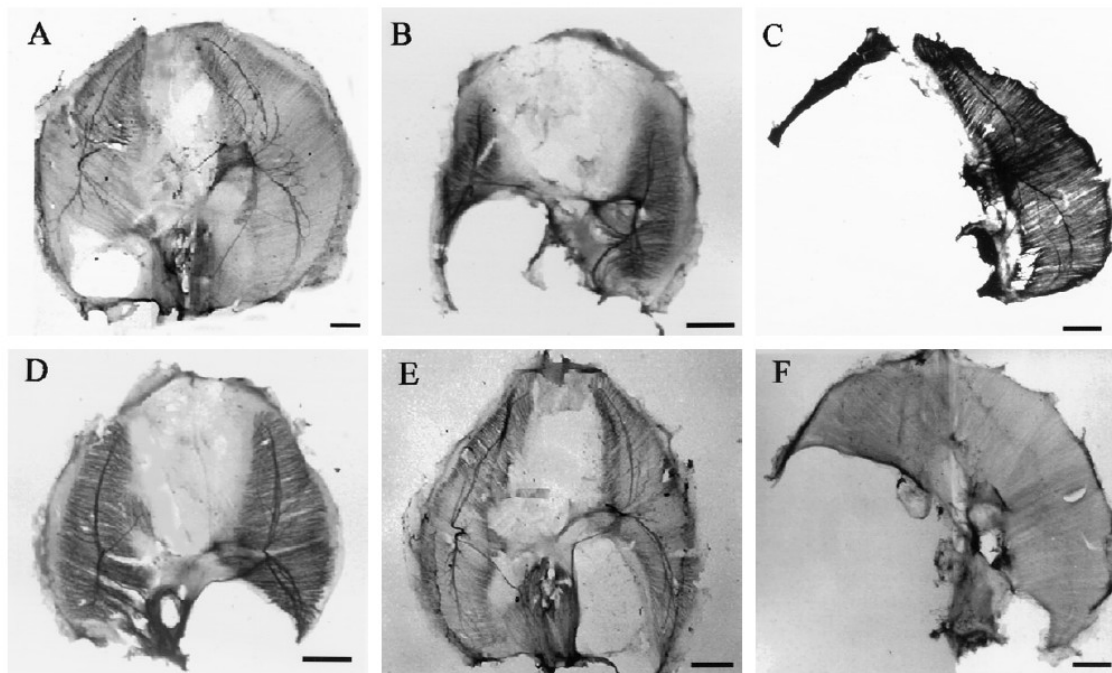


Abbildung 14:

Zwerchfeldefekte fetaler Ratten nach maternaler Nitrofenverabreichung am Gestationstag 9. Die fetalen Zwerchfelle wurden zum Zeitpunkt E15,5 (B), E16 (D), E17 (A, E), E17,5 (C) und E19 (F) entfernt und es wurde ein Immunolabeling für *PSA-NCAM* (siehe Text) durchgeführt. Linksseitige Hernien variabler Ausprägung sind in A-C zu sehen. Die Prozentsätze des fehlenden Diaphragma-Anteils variierten von 25-90%. Typische rechtsseitige Hernien sind in D-E dargestellt und betrafen gewöhnlich 15-50% der Oberfläche des Zwerchfells. F zeigt eine bilaterale Hernie. Wie im Text beschrieben, ähnelt die Nitrofen-induzierte Zwerchfellhernie des Nagetiers in Anordnung und Ausprägungsgrad in hohem Maße der menschlichen angeborenen Zwerchfellhernie (CDH). Scale bars: 500 μ m.

Quelle: © Allan *et al.* [566]

Untersuchungen der Auswirkungen der Zwerchfellhernie auf die Lunge wurden in einer Studie von Allan *et al.* an den Gestationstagen 15 und 18 durchgeführt [566]. Während sich am Tag 15 noch keine Herniation der abdominalen Organe in den Thoraxbereich zeigte, war diese zum Zeitpunkt E18 deutlich zu erkennen. Untersucht wurden DNA-Gehalt und Proteingehalt der Lunge, sowie Körper- und Lungengewichte.

Am Tag 15 zeigten sich keine Unterschiede der genannten Parameter, am Tag 18 jedoch war eine signifikante Reduktion, vor allem des Lungengewichtes, aber auch des Protein- und DNA-Gehaltes der Lunge in der Herniengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erkennen. In dieser Studie kamen Allan und Greer auch zu dem Schluss, dass die Entwicklungsstörung der Lunge eher ein *Sekundärdefekt* war, der durch die Einengung aufgrund der durch die Hernie durchtretenden Bauchorgane zustande kam, als ein der Hernie vorangehender, *primärer Defekt* [566].

Während der Zwerchfellnerv am Tag 15 sowohl *ipsi*⁵⁵⁰- als auch *kontralateral*⁵⁵¹ zur Zwerchfellhernie keine signifikanten Unterschiede zeigte, war dies am Tag 18 deutlich

⁵⁵⁰ gleichseitig

⁵⁵¹ gegenseitig

anders. Zu diesem Zeitpunkt kam es zu einer Atrophie des gleichseitigen Zwerchfellnervs, der signifikant kleiner war, als der Zwerchfellnerv der Gegenseite. Allan und Greer beschrieben eine deutliche Abnahme der Zahl der Axone des Nervs, der ipsilateral zur Hernie lag. Diese Beobachtung konnten durch die Erklärung gestützt werden, dass der größte Teil des Zelltodes der Motoneurone zwischen den Stadien E15 und E16 auftrat (siehe **Abbildung 15**) [566].

Folglich wird der Grad des Überlebens der Motoneurone innerhalb des gleichseitigen Motoneuron-Pools⁵⁵² durch die reduzierte Muskulatur und der mit ihr assoziierten *neurotrophin Faktoren*⁵⁵³ beeinträchtigt. Die Zahl der Motoneurone, inklusive des Motoneuron-Pools *ipsilateral* zur Hernie betrug in dieser Studie 67 +/- 8% der Gegenseite [566,616].

Die topographische Innervation des Zwerchfells ist bekannt und genau definiert. Die dorsalen Anteile der Muskulatur werden aus dem Pool der Neurone der C5-C6-Region innerviert. Der *sternale*⁵⁵⁴ Bereich des Zwerchfells wird aus den Segmenten C3-C4 innerviert. Folglich müsste man, ohne die Möglichkeit einer Kompensation, im Falle des Auftretens einer Hernie mit einem massiven Zelltod der Neurone kaudal der C4 Region rechnen. Dies wurde in der Studie von Allan und Greer jedoch nicht beobachtet.

Der verringerte Zugriff der Axone auf die normale Muskulatur, die eine „Zielstruktur“ darstellt, führte zu deren verringertem Überleben, das, obwohl es geringfügig stärker innerhalb der kaudalen Regionen ausgeprägt war, offenbar durch den Restbestand der Säule der phrenischen Motoneurone mitversorgt wurde. Der Nervus phrenicus schien demnach gewisse *Kompensationsmöglichkeiten* zu besitzen. Außerdem wurden immer wieder Axone beobachtet, die um die Region der Hernie, auf der Suche nach ihrem dislozierten Ziel, auswuchsen [566,617].

⁵⁵² ursprünglich angelegte Menge an Motoneuronen in der Entwicklung

⁵⁵³ *Target derived neurotrophic factors*

⁵⁵⁴ Sternum (lat.): Brustbein

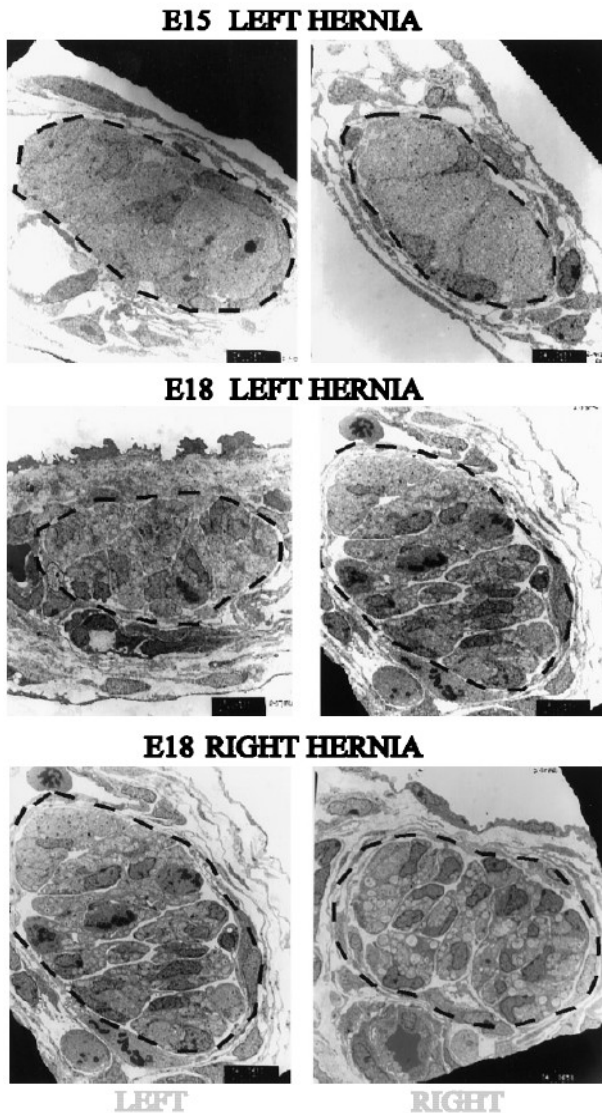


Abbildung 15:

Darstellung der Größe des *N. phrenicus* bei Tieren mit CDH. Die Fotos entstammen einer Serie von elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Querschnitten durch den *N. phrenicus* mit links-, oder rechtsseitigen Zwerchfellhernien zum Zeitpunkt *E15* (**oben**) und *E18* (**Mitte und unten**).

Die oberste Abbildung zeigt den Größenunterschied des Zwerchfellnervs (*unterbrochene Linie*) auf der linken und rechten Seite bei einem Tier mit großer linksseitiger Zwerchfellhernie.

Der Nerv ist auf der ipsi- und kontralateralen Seite zur Hernie gleich groß.

Im Gegensatz dazu, zeigt sich zum Zeitpunkt *E18* (**Mitte und unten**) bei links- und rechtsseitiger Zwerchfellhernie eine Größenreduktion des *N. phrenicus* ipsilateral zur Hernie.

Die auftretende Atrophie des *N. phrenicus* kann durch einen Verlust seiner „Zielobjekte“ (Myotubes) und eine dadurch gesteigerte, sekundär zum natürlichen Zelltod auftretende Apoptose erklärt werden (siehe Text).

Vergrößerung: 4300-fach

Quelle: © Allan *et al.* [566]

Auch der Zustand der Myotubes zeigte im Bereich der Zwerchfellhernie Veränderungen, wie sich anhand der *PSA-NCAM*⁵⁵⁵-Markierung demonstrieren ließ [618]. Die Dichte der *PSA-NCAM*-Markierungen bzw. die Zahl der Myotubes war im Bereich der Hernie deutlich höher als auf der kontralateralen Seite. Demnach war die Myotube-Bildung nur in jenen Bereichen der Hernie gestört, die die Hernie umfassten und überspannten. Die *PSA-NCAM*-Markierungen zeigten auch, dass die gewöhnliche mediolaterale Ausdehnung der Myotubes durch die Hernie versetzt war und sie sich dann eher ventrodorsal, um die laterale Grenze des defekten Bereiches ausdehnte [618].

Der rechte und linke Pleuroperitoneal-Kanal bei fetalen Ratten schließt sich, wie von Gattone und Morse publiziert, üblicherweise an den Tagen 14,75 und 15,25 [619].

Nach einer fetalen Nitrofen Exposition am Tag 9 zeigten sich am Tag 14,5 (vor dem Zeitpunkt des natürlichen Verschluss des Pleuroperitoneal-Kanals) klare Defekte auf beiden Seiten des Kanals. Außerdem lag die fehlgebildete Zwerchfellregion medial des Kanals. Folglich nahmen Gattone und Morse an, dass die Zwerchfellhernie unabhängig von einem Verschlussdefekt des Pleuroperitoneal-Kanals entstehen könnte [619].

⁵⁵⁵ Das *Polysialic Acid-Neural Cell Adhesion Molecule* wird in neonatalem und embryonalem Nervengewebe exprimiert (47).

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Das ursprüngliche diaphragmatische Muskelgewebe liegt innerhalb der pleuroperitonealen Falte. Eine Spur von Zellen innerhalb der pleuroperitonealen Falte und Vorgängerkernzellen des Zwerchfellnervs exprimieren NCAM und den Wachstumsfaktor-Rezeptor p75. Es sind dies zumeist Vorläufer von *Schwann*⁵⁵⁶- oder Muskelzellen.

An Tieren, denen Nitrofen verabreicht wurde, zeigten sich Defekte sowohl der linken, als auch der rechten pleuroperitonealen Falte am Tag 13,5 [620,621].

Der Primärdefekt in Verbindung mit der CDH liegt vermutlich in einem frühen Stadium der Bildung des primordialen⁵⁵⁷ Diaphragmas innerhalb der pleuroperitonealen Falte. Am Rattenmodell hängt die Herniation der Bauchorgane in die Thoraxhöhle sehr stark von der Größe des Defektes innerhalb der Zwerchfellmuskulatur ab [566].

Auch am Menschen variiert die Größe des Defektes und beeinflusst davon abhängig den Grad der Lungenhypoplasie und die Prognose. Zwischen der CDH des Menschen und der Nitrofen-induzierten CDH am Rattenmodell besteht eine bemerkenswerte Ähnlichkeit. Allerdings ist die menschliche CDH in etwa 30% der Fälle mit anderen Fehlbildungen vergesellschaftet.

Typischerweise treten Herzfehlbildungen, Skelettdeformitäten und ein Hydrozephalus auf, die am Rattenmodell nur bei hoher und chronischer Nitrofen-Exposition der Muttertiere beobachtet wurden. In etwa 10% der Fälle, in welchen die CDH mit anderen Fehlbildungen assoziiert ist, sind spezifische genetische Abnormalitäten vorhanden (Trisomie 13, 18, u. a.) [566,611].

Frühere Berichte deuteten an, dass die Lungenmalformation unabhängig und eventuell als Folge der Zwerchfellanomalien auftrat. Als Erster präsentierte Iritani ein Foto einer abnormen Lunge mit umgebenden Gewebeanteilen, die er als *PHMP*⁵⁵⁸ beschrieb.

Im zugrunde liegende Experiment wurde trächtigen Mutterratten Nitrofen vom Tag 5 bis 11 verabreicht und eine Vielzahl an Entwicklungsanomalien war zu beobachten.

Allan und Greer vermuteten, dass es die frühe und massive Dosis von Nitrofen war, die letztlich die Schäden in den Geweben und vor allem der Lunge verursacht haben könnte [566,584].

Kluth *et al.* überprüften, ob die Lungen von Ratten mit CDH in einem frühen Stadium (E14) Atrophien zeigten. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie war zu erkennen, dass die Lungen normal entwickelt waren, solange die Bauchorgane nicht in den Thorax verlagert wurden. Die quantitative Analyse der Lungengröße und des Zellgehalts ergab, dass die Hypoplasie der Lunge in der Tat eher ein Sekundäreffekt, als ein Primäreffekt der Zwerchfell-Fehlbildung zu sein schien. Der zweite Hinweis auf die Lunge als Quelle der Entwicklungsabnormalität war die Beobachtung, dass die kontralateral der Hernie liegende Lunge bei Neugeborenen mit CDH häufig auch hypoplastisch war. Der Grund dafür war aber wohl in einer Kompression des Mediastinums und der kontralateralen Lunge durch die in den Thorax eindringenden Bauchorgane zu suchen.

Folglich ist, den Ausführungen von Kluth *et al.* folgend, bei einer, die Anomalien minimierenden Verabreichung von Nitrofen, eine normale Lungenentwicklung in den frühen Stadien der CDH zu erwarten und die Beeinträchtigung der Lungenentwicklung tritt

⁵⁵⁶ Die *Schwann-Zelle* ist eine spezielle Form einer *Gliazelle*. Sie bildet eine Hüll- und Stützzelle, die das Axon einer Nervenzelle im peripheren Verlauf umhüllt und bei markhaltigen Fasern durch eine *Myelinhülle* elektrisch isoliert (1).

⁵⁵⁷ ursprünglich

⁵⁵⁸ *Posthepatic mesenchymal plate*

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

erst als Sekundäreffekt der CDH durch die in den Thorax drängenden Bauchorgane in Erscheinung [566,622].

Der Zwerchfellnerv, der die von der CDH betroffene Seite des Zwerchfells innervierte, erschien, laut Bericht von Allan und Greer, an Ratten nach dem Zeitpunkt E16 häufig mit schmalerem Durchmesser, als jener der Gegenseite. Allerdings schienen diese Abnormalitäten auch eher eine Folge als die Ursache der CDH zu sein [566].

Vor dem Auftreten des natürlichen neuronalen Zelltodes (E15) waren die Zahlen an phrenischen Motoneuronen und Axonen sowohl bei CDH-Feten, als auch in der Kontrollgruppe, sowie auch in ipsilateraler und kontralateraler Position zur Hernie, gleich. Dies führte zu dem Schluss, dass die Zahl von Motoneuronen und Axonen, die nach der Apoptose übrig blieben, stark vom entsprechenden Zielgewebe abhängig war. In Fällen einer schweren Herniation fehlte ein signifikanter Anteil der „Zielobjekte“ der Axone und die verbleibende Muskulatur wurde anormal arrangiert und verwies damit auf einen zunehmenden Zelltod der Motoneurone [566].

Der Verdacht, dass Myotubes in der Region der Herniation fragiler erscheinen und dann durch den steigenden Druck der darunterliegenden Eingeweide rupturieren könnten, konnte durch Allan und Greer am Rattenmodell nicht bestätigt werden. Eher war die Bildung der Myotubes in den angrenzenden Bereichen der Hernie verstärkt (siehe **Abbildung 16**) und einige von ihnen zeigten eine normale Zustandsform und Anpassung an die Hernienöffnung.

Ebenso konnte auch der Verdacht, die Hernie resultiere aus einem Fehler des pleuroperitonealen Kanalschlusses, nicht belegt werden. Erstens erscheint die Hernie oft medial des Pleuroperitoneal-Kanals und zweitens war es offensichtlich, dass exakt definierte Defekte im Zwerchfell entweder auf der rechten oder der linken Seite am Tag 14,5, also etwa 0,5 bis 0,75 Tage vor dem Verschluss des rechten und linken Pleuroperitoneal-Kanals, in Erscheinung traten [566,619].

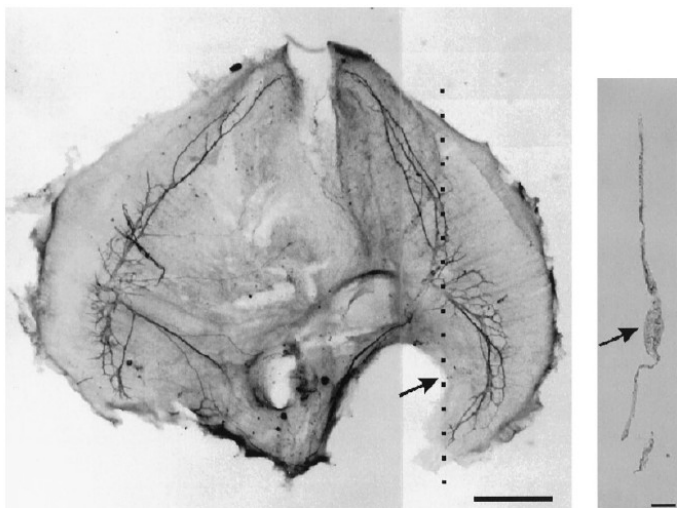


Abbildung 16:

Darstellung der Verdickung der Muskulatur in den peripheren Anteilen der Zwerchfellhernie (**Pfeil**). Hier ist eine rechtsseitige Zwerchfellhernie abgebildet.

Scale bars:

Abbildung des gesamten Zwerchfells: 500 μm ; Ausschnitt: 200 μm .

Quelle: © Allan *et al.* [566]

Die Fehlbildung der Muskulatur des Zwerchfells tritt klar in einem früheren Stadium, als der Verschluss der pleuroperitonealen Kanals und die Bildung der Myotubes auf. Das primordiale diaphragmatische Gewebe, die *pleuroperitoneale Falte*, war im Nitrofenmodell der CDH grob fehlgebildet. Als Folge migrierte der Nerv an seinem normalen Innervationspunkt vorbei, der bei linksseitigen Hernien fehlte, und innervierte

somit ventrales Gewebe. Es ist ein interessanter Aspekt, dass der phrenische Nerv, trotz des Fehlens oder der Deplatzierung seines primordialen Zielgewebes, ein Muster der Verzweigung ausbildete, das jenem der normalen Verzweigung sehr ähnlich war.

Das Gewebe, welches von Iritani als *PHMP* klassifiziert wurde, war, der Interpretation von Allan *et al.* folgend, offenbar ein Teil der pleuroperitonealen Falte. Es gab auch die Vermutung, es könnte sich eventuell um einen Anteil des *Septum transversum*⁵⁵⁹ handeln. Nach genauer Betrachtung mit Hilfe von Immunfluoreszenzmarkern war es eindeutig, dass der Zwerchfellnerv die pleuroperitoneale Falte innervierte, die in ihrer ventralen Ausdehnung mit dem *Septum transversum* fusionierte. Aktuelle Daten zeigen, dass die Zwerchfelldefekte, die mit maternaler Nitrofen-Exposition zusammenhängen, eher mit den anfänglichen, als mit den letzteren Entwicklungsstadien des Zwerchfells assoziiert sind [566].

Die Tatsache, dass linksseitige Hernien hauptsächlich bei maternaler Nitrofengabe am Tag 9 auftreten, deutet an, dass der primäre Insult offensichtlich in einem gut definierten Zeitrahmen auftritt [566].

In einer früheren Studie wurde von Costlow *et al.* beobachtet, dass Nitrofen den Fetus innerhalb von 2 h nach mütterlicher Applikation erreichte, die fetale Nitrofen-Konzentration innerhalb von 4-6 h Spitzenwerte erzielte und innerhalb von 24 h auf die Hälfte zurückging [566,623].

1.12.6. Der Nitrofeneffekt auf die Lungenentwicklung

Wie beschrieben, führt die CDH zur Entstehung von hypoplastischen Lungen, aber auch zu einem reduzierten *lung-to-body weight index*⁵⁶⁰ und reduzierter Verzweigungsmorphogenese.

Ob Nitrofen eine direkte Wirkung auf die Lungen hat, oder ob die Veränderungen das Resultat einer, durch die Zwerchfellhernie in den Thorax durchtretenden Leber und Bauchorgane, und somit daraus resultierender Kompression des Lungengewebes darstellen, wurde lange untersucht.

In einer Studie von Kluth *et al.* wurde die Leber zum determinierenden Faktor für die Lungengröße. Das Gewicht der Lungen von Embryonen, die eine Nitrofen-induzierte CDH aufwiesen, verhielt sich proportional zur Größe des Leberanteils, der in der Thoraxhöhle gefunden wurde. Demnach war die Lungenhypoplasie eine Folge der Kompression durch die Leber [622,624].

Allan und Greer zeigten in ihrer Studie, dass nur nach einer Herniation der Bauchorgane in den Thoraxbereich eine signifikante Reduktion des Lungengewichts, sowie des Protein- und DNA-Gehaltes auftrat, verglichen mit den Kontrollgruppen [1]. Weitere Studien von Guilbert *et al.* [625] und Jesudason *et al.* [626] kamen zu dem Ergebnis, dass Nitrofen seine Wirkung primär unabhängig von der Entstehung der Zwerchfellhernie auf das Lungengewebe ausübt. Es zeigte sich bereits eine Verringerung der Verzweigung der Lungenstrukturen, bevor die Herniation der Leber in den Thoraxbereich auftrat.

Von einer anderen Forschergruppe um Keijzer wurde eine „*Dual-Hit-Hypothese*“ postuliert, laut welcher Nitrofen zwei unabhängige Wirkungen auf die Lunge ausübte, eine

⁵⁵⁹ Das *Septum transversum* ist eine embryonale Struktur, die sich unterhalb der Herzanlage als horizontale Verdickung des Mesoderms bildet und den Brustraum insofern unvollständig von der Bauchhöhle abgrenzt, als eine, zu beiden Seiten des Vorderdarms als *Perikardioperitoneal-Kanal* bezeichnete, Lücke bestehen bleibt (1).

⁵⁶⁰ *Lungen-zu Körpergewichts-Index* (LBWI)

vor und separat von der Zwerchfellentwicklung, und eine andere, die die ipsilaterale Lunge betraf und *nach* dem Zwerchfelldefekt durch Kompression hervorgerufen wurde [322]. Diese ist die aktuell am besten vertretbare Hypothese und eröffnet die Möglichkeit eines umfassenden Verständnisses des *chirurgischen* (Kompression), *molekularen* (direkte Effekte von Nitrofen) und *genetischen* Modells [627].

1.12.7. Mechanismen der Nitrofen-induzierten Teratogenität

Zahlreiche Mechanismen wurden untersucht, um die teratogenen Effekte von Nitrofen zu beschreiben [573,589,600,628].

Diese umfassten Veränderungen der Proliferation, Differenzierung und Apoptose der Zellen der sich entwickelnden Lungen- und Zwerchfellgewebe.

Um das zelluläre Zielgewebe von Nitrofen zu ergründen, wurden metabolische Studien durchgeführt. Diese zeigten, dass Nitrofen initial im mütterlichen Fettgewebe angereichert und anschließend auf andere mütterliche Organe (hauptsächlich auf die Leber) und, nach 48 Stunden, auch auf die Embryonen verteilt wurde. Die für diese Analyse verwendete radioaktive Substanz, wurde zuerst nach 3 Stunden im embryonalen Kompartiment nachgewiesen und stieg dort über weitere 72 Stunden an. Nur die ursprüngliche, der Mutter verabreichte Verbindung wurde im Embryo nachgewiesen, was darauf hindeutete, dass die Teratogenität nicht durch metabolische Veränderungen (Reduktion von Stickstoff) mediiert wurde. Eine Studie von Brown *et al.* brachte auch hervor, dass Nitrofen plazentagängig ist und seinen direkten Effekt auf die embryonalen Zellen ausübt. Über das Zielgewebe von Nitrofen wurde häufig debattiert [1,564,622,565].

Wie erwähnt, kann das Zwerchfell in zwei Anteile, einen *muskulären* und einen *membranösen* Anteil unterteilt werden [629].

Um herauszufinden, ob Nitrofen den muskulären oder den membranösen Anteil beeinflusst,

wurden von Babiuk *et al.* [571] Studien an Knockout-Mäusen für das *c-met*-Gen (*c-met*^{-/-}) durchgeführt. Das *c-met*-Gen codiert die Beta-Untereinheit des Hgfr⁵⁶¹ und Mäuse, denen das Gen fehlt, können keine Myotubes synthetisieren und formen daher ein rein membranöses Diaphragma ohne Muskelanteil. Die Autoren zeigten, dass die Leber, in Abwesenheit der Muskulatur, durch das membranöse Diaphragma herniierte. Der posteriore membranöse Anteil wurde als *Target* für Nitrofen erkannt. Er entsteht, zumindest teilweise, aus der PPF⁵⁶² (wie in diesem Kapitel bereits beschrieben) [571].

Um festzustellen, ob das posteriore Diaphragma von Nitrofen beeinflusst wurde, wurden Studien an Knockout-Mäuse für das *Wt1*-Gen (*Wt1*^{-/-}) durchgeführt, aber auch am Nitrofen- und VAD-Rattenmodell [564,584,622]. Alle diese Modelle mit CDH zeigten fehlende oder fehlgebildete Bereiche der PPF zu unterschiedlichen Graden, was darauf schließen lässt, dass diese Struktur das Target in drei Bereichen (genetisch, ernährungsbedingt und teratogen) darstellt [1,564,584,622].

Über die Verwendung der Immunhistochemie sollten von Kreidberg *et al.* die bei einer CDH betroffenen Zelltypen innerhalb der PPF identifiziert werden. Da beide Arten von Knockout-Mäusen, sowohl die für das *Wt1*-Gen, als auch jene für das *Coup-tfII*⁵⁶³- Gen,

⁵⁶¹ *Hepatocyte growth factor-receptor*

⁵⁶² *Pleuroperitoneale Falte*

⁵⁶³ Gen der Kernrezeptor-Familie, das die Wirkung von Vitamin A-Säure beeinflusst, indem es Heterodimere mit dem RXR bildet (48).

abnormale PPF Varianten zeigten, wurden Antikörper gegen die Wt1 und Coup-tfII Proteine eingesetzt, um festzustellen, ob die Zellen, die diese Gene exprimierten, mit einer Komponente der PPF assoziiert waren. Beide, sowohl die für Wt1, als auch die für Coup-tfII immunopositiven Zellen, wurden nicht in Co-Lokalisation mit Pax3, einem Marker von myogenen Zellen, vorgefunden, was wiederum vermuten ließ, dass die nichtmuskulären Zellen der PPF das Zielgewebe darstellten. Des Weiteren wurden beide Proteine, sowohl Wt1, als auch Coup-tfII, in einem kleinen Bereich der PPF lokalisiert, der eine Untergruppe innerhalb des nichtmuskulären Anteils der PPF und somit das aktuelle Ziel der CDH darstellte [627,630].

Manche Studien weisen auch auf einen direkten Effekt von Nitrofen auf die Proliferation und Differenzierung von Zellen hin, die die sich entwickelnde Lunge beeinträchtigen.

Wie beschrieben, demonstrierten auch Zellproliferations-Studien, mit Hilfe der Analyse von *Bromdesoxyuridin (BrdU)* und ³*H-Thymidin*, dass beide, sowohl epitheliale, als auch mesenchymale Zellen der Lunge, nach Nitrofen-Exposition, aber vor dem Verschluss des Zwerchfells, reduziert waren, was auf einen direkten Effekt von Nitrofen auf das Lungengewebe hindeutete [579,580].

Diese Beobachtungen wurden durch Studien mit immunhistochemischer PCNA⁵⁶⁴-Detektion in fetalen Lungen und *H441-Pneumozyten*⁵⁶⁵, einer Zelllinie im Lungenepithel, bestätigt [572,322]. Das führte zu der Erkenntnis, dass Nitrofen direkt, und ohne Beteiligung der PPF, das proliferierenden Lungengewebe beeinflusste [627].

Die Mechanismen hierzu sind nicht bekannt. Eine Möglichkeit wäre, dass Nitrofen die Expression der Gene der *fibroblast growth factors*, *Fgf10* und *Fgf7*, in sich entwickelnden Lungen herabregulieren könnte [325].

Die mRNA-Expression beider Gene, sowohl jener für *Fgf10* als auch für *Fgf7*, war in CDH-Lungen verglichen mit Kontrollgruppen reduziert, was die Annahme nahelegte, dass die verminderte Synthese von *Fgf10* und *Fgf7* die pulmonale Hypoplasie verursachen könnten [325].

Dies bestätigte auch ein CDH-Mausmodell, in welchem nach Nitrofengabe eine 10-fache Abnahme der mRNA-Expression des *Fgf10* in der Lunge beobachtet werden konnte. Exogenes FGF10 führte zu einer teilweisen Verbesserung der Verzweigungen der Lunge.

Die Ursache liegt offenbar in einer Veränderung in der FGF10-Signalkaskade. Beide, sowohl FGF10, als auch FGF7, sind *Tyrosinkinaserzeptoren* und stellen Komponenten der Signalkaskade dar. Die Liganden, die FGFs, binden an ihren Rezeptor, der dann wiederum Vorgänge von *Transphosphorylierungen* und letztlich die Aktivierung der MAP-Kinase hervorruft. Bei vorhandener CDH wurde gezeigt, dass die Aktivierung der MAP-Kinasen, ERK1 und ERK2, in dem mit einer CDH assoziierten hypoplastischen Lungengewebe beeinträchtigt war [631-633].

Es war allerdings unklar, ob die reduzierte MAP-Kinase-Aktivität das Resultat von reduzierten Levels von FGF10 und FGF7 darstellte, oder die Folge einer Hemmung der ERK1/2-Aktivatoren, MEK1/2, durch *U0126*⁵⁶⁶, die ebenfalls zu einer Reduktion von ERK1/2 führen und einen Anstieg von mesenchymaler Apoptose verursachen, gewesen sein könnte [631] (siehe **Kapitel 1.9.6**).

⁵⁶⁴ Das *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen* (PCNA) ist ein Protein, das während der eukaryotischen DNA-Replikation die DNA als Ring umgibt (so genanntes *Ringklemmenprotein*). Nur durch PCNA ist es möglich, dass während der S-Phase des Zellzyklus die gesamte DNA mit hoher Geschwindigkeit und ohne größere Unterbrechungen vervielfältigt werden kann (49).

⁵⁶⁵ Zellen eines *Adenokarzinoms* der Lunge

⁵⁶⁶ *U0126* ist ein hoch sensibler Inhibitor von MEK1 und MEK2, einem Typ der MAPK/ERK Kinase (50).

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Glatte Muskelzellen sind Derivate des primordialen Mesenchyms und könnten eine Sensitivität für Nitrofen, in direkter oder indirekter Weise, ausprägen. Grund zu dieser Annahme lieferten Untersuchungen von hypoplastischen, mit einer CDH assoziierten Lungen, die eine unterbrochene *Peristaltik*⁵⁶⁷, eine glattnuskulär-medierte Aktivität, zeigten. Zusätzlich entwickelten glatte Muskelzellen in hypoplastischen Lungen in der späten Schwangerschaft eine anormal gesteigerte Kraft. Die Ursache könnte in einer verlängerten *Calcium-Plateauphase* zu suchen sein, die in Untersuchungen der hypoplastischen embryonalen Lunge vorgefunden wurde [634,635].

Die glatte Muskulatur spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation des frühen Lungenwachstums und die veränderte Peristaltik, die in CDH-Lungen beobachtet wurde, könnte aus der erhöhten Sensitivität der mesenchymalen Vorläuferzellen der glatten Muskulatur auf Nitrofen hervorgehen.

Nitrofen scheint auch die Fähigkeit der Lungenzellen, sich zu differenzieren, beeinflussen zu können. Die Verzweigung der Luftwege war in CDH-Lungen im pseudoglandulären Stadium verzögert. Es entwickelten sich sehr engen Lufträumen, die von Glykogen- und Lamellenkörperchen-reichen Typ II-Pneumozyten ausgekleidet waren. Die Kontrollgruppe zeigte hingegen flache Typ I-Pneumozyten. Ähnliche Beobachtungen wurden in einer anderen Studie gemacht, in welcher größere Zahlen von Typ II-Pneumozyten pro Oberfläche in Nitrofen-exponierten Lungen, als in normalen Lungen vorgefunden wurden, was zu der Annahme führte, dass Nitrofen-exponierte Lungen eine verzögerte Differenzierung im Unterschied zu normalen Lungen aufwiesen [627,636,637].

Andere Marker der Lungenzelldifferenzierung, die eine Verzögerung nach Nitrofen-Exposition erkennen ließen, waren die Surfactant-Proteine A, B und C. In hypoplastischen Lungen wurde, nach Nitrofen-Exposition in mittelspäter Schwangerschaft, eine reduzierte Expression der *Sp-a*-, *Sp-b*- und *Sp-c*-mRNA beobachtet. Trotzdem waren in der späten Schwangerschaft der Nitrofen-exponierten Lungen der Tiere mit CDH die Spiegel von *Sp-b* und *Sp-c* signifikant erhöht, verglichen mit den normalen Lungen der Kontrollgruppe. Da Typ II-Pneumozyten in der späten Schwangerschaft zu Typ I-Pneumozyten differenzieren, zeigt ein Nitrofen-induzierter Anstieg der Surfactant-Levels voraussichtlich eine Verzögerung dieser Differenzierung. Zusätzlich war eine Hauptkomponente des Lipidanteils des Surfactants, das *ungesättigte Phosphatidylcholin*⁵⁶⁸, in den mit Nitrofen behandelten Lungen reduziert [638-640].

Wie bereits beschrieben, wiesen die Lungen der Ratten mit CDH auch signifikant erhöhte DNA- und Glykogenkonzentrationen auf, was folgern lässt, dass die Lungen biochemisch unreif und unzureichend differenziert waren [638]. Die Effekte von Nitrofen auf *Sp-c* und auf das clara cell sekretory protein⁵⁶⁹, *CC10*⁵⁷⁰, wurden ebenfalls *in vitro* untersucht. Am Rattenmodell zeigte sich für *Sp-c* und *cc10* eine reduzierte mRNA-Expression [322].

Die Genexpression von Surfactant wird durch verschiedene Transkriptionsfaktoren geregelt und diese sind u. a. TTF1 und HNF-3 β ⁵⁷¹. Die Expression der *Ttfl*-mRNA war in Lungen von Nitrofen-behandelten pränatalen Rattenfeten reduziert. Diese Beobachtungen wurden durch eine zweite Studie bestätigt, in welcher Nitrofen die Expression von *Ttfl* und *Hnf-3 β* reduzierte. So zeigte sich, dass Nitrofen direkt die Expression von *Ttfl* und

⁵⁶⁷ wellenförmig fortschreitende Wandbewegung von Hohlorganen (1)

⁵⁶⁸ DSPC (*desaturated phosphatidyl choline*)

⁵⁶⁹ das sekretorische Protein der Clara-Zellen

⁵⁷⁰ Clara Cell-Specific 10 kD Protein (CC10) [322]

⁵⁷¹ FOXa2

Hnf-3 β sowohl in Zellkulturen (*in vitro*), als auch in beiden Lungen (*in vivo*) beeinflusste [572,641].

1.13. IGF-1 und seine Wirkung

1.13.1. Einflüsse der IGF-1 *Gen*disruption⁵⁷² auf das zelluläre Profil des Zwerchfells

IGF-1 ist der hauptsächliche Polypeptid-Wachstumsfaktor, der die wachstumsfördernde Aktion der Wachstumshormone mediiert. Die Leber ist die primäre Quelle des zirkulierenden IGF-1 und die Expression des Peptides innerhalb der Muskulatur gestattet lokale *autokrine*⁵⁷³ und *parakrine*⁵⁷⁴ Effekte [642].

IGF-1 ist ein aus 70 Aminosäuren aufgebautes 7,5 kDa⁵⁷⁵ großes Einzelstrang-Peptid, das unter Säugetieren eine hochkonservative Struktur zeigt. Es wird in zahlreichen fetalen Geweben, wie im Gehirn, in der Leber, den Lungen, den Nieren, im Dünndarm und in der Skelettmuskulatur, sowie auch in der Plazenta [643,644] produziert. Es übt seine biologische Wirkung über die Interaktion mit spezifischen Bindungsproteinen und Oberflächenrezeptoren aus. IGF-1 zeigt eine große Spanne von mitogenen Effekten und stimuliert die Proliferation von *Chondrozyten*⁵⁷⁶, Fibroblasten, Epithelzellen und glatten Muskelzellen [645]. Zusätzlich übt IGF-1 einen wichtigen Einfluss auf den fetalen Metabolismus aus, indem es die fetale und/oder plazentare Aminosäure- und Glukoseaufnahme verstärkt und die Oxidation der Aminosäuren, sowie die Laktatproduktion in der Plazenta vermindert [646].

Homozygote Mäuse mit einer gezielten Deletion des Gens des *Igf-1* wurden in der Literatur beschrieben [647,648].

Laut der Beschreibung von Florini *et al.*, spielt IGF-1 eine entscheidende Rolle in der *Myogenese*⁵⁷⁷ und in der Bewahrung des Wachstums und der Integrität der Muskelfasern [649]. Tatsächlich heben die *Knockout*-Modelle des *Igf-1*-Gens die Wichtigkeit von IGF-1 während der Embryogenese hervor, da hier von Baker *et al.* [647] eine signifikante Wachstumsrestriktion *in utero* beobachtet werden konnte.

Zum Zeitpunkt der Geburt betragen die Körpergewichte von homozygot-mutierten Mäusen für das *Igf-1*-Gen⁵⁷⁸ nur etwa 60% der Gewichte ihrer gesunden *Wildtyp*⁵⁷⁹-Geschwister [*WT Igf-1*(+/+)]. Die meisten der Mäuse mit homozygotem *Knockout* für *Igf-1* starben

⁵⁷² ist eine Form der *in vitro* Mutation, oder des *Gen-Knockouts*. Dabei wird das Gen durch eine funktionslose Kopie ersetzt (80).

⁵⁷³Die *autokrine Sekretion* ist ein Sekretionsmechanismus von Zellen, bei dem die abgegebenen Hormone und hormonähnlichen Substanzen, z. B. Wachstumsfaktoren, auf die absondernde Zelle selbst wirken (81).

⁵⁷⁴Als *parakrine Sekretion* bezeichnet man den Sekretionsmodus von Zellen, bei dem die abgegebenen Hormone und hormonähnlichen Substanzen direkt auf Zellen in der unmittelbaren Umgebung wirken. Im Gegensatz zur *endokrinen Sekretion* gelangen die Hormone also nicht über das Blut zu ihren Zielzellen (81).

⁵⁷⁵*kilo Dalton (1000 Dalton)*: ein Dalton entspricht in etwa der Masse eines Wasserstoffatoms ($1,66 \cdot 10^{-27}$ kg) und ist gleich der atomaren Masseneinheit *u* (82).

⁵⁷⁶Knorpelzellen

⁵⁷⁷Bildung der Muskulatur

⁵⁷⁸genetische Konstellation: *Igf-1*(-/-)

⁵⁷⁹Der *Wildtyp* ist die Bezeichnung für die als normal klassifizierte Ausprägung eines Gens, die in der Mehrzahl der Individuen einer Art (*Species*) vorkommt. Abweichungen von der Norm entstehen durch *Mutationen* (1).

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

während, oder kurz nach der Geburt aufgrund von Atemversagen (abhängig vom genetischen Hintergrund etwa 84 – 95%) [648,650]. Überlebende Tiere aus dieser Gruppe prägten eine **signifikante Wachstumsrestriktion** aus, wobei ihr Körpergewicht am Tag 60 nur etwa 30% der gleichaltrigen Wildtyp-Mäuse betrug [647].

In einer Studie von Powell-Braxton und Mitarbeitern [650] wurde eine Reduktion der Muskelmasse beobachtet. Bei der histologischen Evaluierung der Muskulatur des Zwerchfells, der Zunge und des Herzens an homozygoten *Igf-1(-/-)*-Mutanten, fiel eine *generalisierte Muskeldystrophie*⁵⁸⁰, die durch eine *Vakuolisierung*⁵⁸¹ der Muskelfasern und reduzierte Anteile an *myofibrillärem*⁵⁸² *Material* charakterisiert war, auf. Allerdings war die Zahl der Muskelfasern nicht reduziert.

Das Zwerchfell stellt den wichtigsten Atemmuskel dar. Deshalb kann man annehmen, dass tiefgreifende Veränderungen dieser Struktur, bezüglich der zellulären Zusammensetzung oder der Morphometrie der beteiligten Fasern, das Versagen der Atmung („*Atempumpe*“) und damit die frühe Mortalität, oder die verringerte Lebenserwartung, die bei Mäusen mit homozygotem Knockout des *Igf-1* beobachtet wurde, bedingen oder zumindest dazu beitragen könnten [650,651].

Im Alter von 2 Monaten betrug das Körpergewicht von *Igf-1(-/-)*-Mäusen, in einer Studie von Powell-Braxton und Kollegen, nur etwa 32% des Körpergewichtes ihrer normalen Wildtyp-Mitgeborenen. Außerdem zeigten die Mutanten des *Igf-1* eine proportionale Reduktion der Körperdimensionen [650].

1.13.1.1. Fasermorphologie

Basierend auf Untersuchungen der Muskulatur mit der *HE-Färbung*⁵⁸³ zeigte sich in dieser Studie von Powell-Braxton *et al.*, unter den *Igf-1*-Mutanten keine Histopathologie der Fasern des Zwerchfells. Es wurden auch, außer der durchschnittlich geringeren Größe der Fasern, keine Unterschiede bezüglich der morphologischen Struktur des Zwerchfells zwischen den Mäusen der Wildtypgruppe und der Gruppe mit *Igf-1*-Knockout gefunden [650,652].

1.13.1.2. Faserproportionen

Das *Staining* der mATPase⁵⁸⁴ erlaubt eine Klassifikation der Muskelfasern in die Typen: *I*, *Ila*, *Ilb*, *Ilx* und *Ilc*. Die Ergebnisse dieses Stainings waren zwischen den *Igf-1(-/-)*-Mäusen und den Wildtypmäusen nicht unterschiedlich. Es zeigten sich demnach keine Unterschiede in den Proportionen der Muskelfasern des Diaphragmas zwischen den beiden Tiergruppen. Allerdings zeigte sich eine Erhöhung eines kleinen Anteils von Fasern (*Typ Ilc*) nur in Zwerchfellen der Gruppe der *Igf-1*-Knockout-Mäuse, was die Frage nach dem Vorkommen von unreifen Muskelfasern aufwarf. Zur Analyse wurden von Fournier *et al.* serielle Schnitte der Muskulatur auf das Vorkommen des MyHC⁵⁸⁵-Phänotyps untersucht,

⁵⁸⁰ Unter einer *Dystrophie* (altgr. „*dys*“=schlecht und „*trophein*“= ernähren, wachsen; „Fehlernährung“, „Fehlwachstum“) werden in der Medizin degenerative Besonderheiten verstanden, bei denen es durch Entwicklungsstörungen zu entsprechenden Degenerationen kommt (1).

⁵⁸¹ Bildung von Hohlräumen (*Vakuolen*)

⁵⁸² Eine *Muskelfibrille*, auch *Myofibrille* genannt, ist in den Muskelzellen (Muskelfasern) eine Funktionseinheit auf der Ebene eines Zellorganells, die der Zelle eine aktive Verkürzung (*Kontraktion*) ermöglicht (1).

⁵⁸³ *Hämatoxylin-Eosin-Färbung* (1)

⁵⁸⁴ *myofibrilläre ATPase*

⁵⁸⁵ *Myosin Heavy Chain*: schwere Kette des Myosins. Bei dieser Technik wird mithilfe von *Anti-MyHC-Antikörpern* die Identifikation der *MyHC-Isoformen* ermöglicht (83).

was einen direkten Vergleich zwischen histochemischen und immunhistochemischen Techniken ermöglichte.

Die Typ-II-Fasern der *Igf-1*-Knockout-Mäuse zeigten eine reine *Koexpression*⁵⁸⁶ der Isoformen MyHC 1 und 2A. Es zeigte sich keine Expression der embryonalen und neonatalen Isoformen innerhalb der Zwerchfellfasern. Das MyHC-Profil des Diaphragmas korrespondierte gut mit dem mATPase-Staining [650, 652,653].

1.13.1.3. Muskelfaserquerschnitt

Die Querschnitte aller diaphragmatischen Fasern waren in der Gruppe der *Igf-1(-/-)*-Mäuse signifikant reduziert, im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. In der Gruppe der *Igf-1(-/-)*-Mäuse betragen die Querschnittsareale der Typ I-, IIA- und IIX-Fasern 63, 68 und 65% der entsprechenden Areale der Wildtyp-Gruppe. Allerdings war der Beitrag der verschiedenen Fasertypen zum gesamten Zwerchfell-Areal bezüglich ihrer Querschnittsareale und Faserproportionen in der *Igf-1(-/-)*-Gruppe erhalten [650,652].

Die Dicke des Zwerchfells war in der *Igf-1(-/-)*-Gruppe um etwa 36% **reduziert**, verglichen mit der Wildtyp-Gruppe. Auch die Zahl der Fasern, die das Zwerchfell zwischen dem thorakalen und dem abdominalen Bereich überspannten, war in der Gruppe der

Igf-1(-/-)-Mäuse verringert. Fournier *et al.* beobachteten bei den *Igf-1*-Knockout-Mäusen eine Reduktion der relativen Anzahl der Zwerchfellfasern um 25%, was das Auftreten einer **Muskelhypoplasie** im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe bedeutete (siehe **Abbildung 19**) [650,652].

Die *oxidative Kapazität* der Fasern wurde mithilfe der Quantifizierung der Aktivität der SDH⁵⁸⁷ bestimmt. Es handelt sich dabei um ein Schlüsselenzym im *Tricarbonsäure-Zyklus*⁵⁸⁸. Für die Bestimmung ihrer Aktivität wurde von Fournier und Mitarbeitern eine histochemische Reaktion herangezogen, in welcher das *NBT*⁵⁸⁹ in das unlösliche *DFZ*⁵⁹⁰ überführt wurde. Dieses dient dann als Indikator. Die Reduktion von NBT wird durch das, bei der Umwandlung von *Succinat* zu *Fumarat* freigesetzte H⁺, mediiert. Die NBT-Ablagerung in einer Muskelfaser wird dann nach dem *Beer-Lambert'schen Verfahren*⁵⁹¹ berechnet [650,652].

Die durchschnittliche SDH-Aktivität war in allen Fasertypen der *Igf-1(-/-)*-Mäuse signifikant erhöht, im Typ-I um 17%, Typ IIA um 14% und IIX um 23%, verglichen mit der Gruppe der Wildtyp-Mäuse. Die durchschnittliche Zahl der Kapillaren pro Faser⁵⁹² war im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen in der *Igf-1(-/-)*-Gruppe der Mäuse sogar um 30% reduziert. Die kapilläre Dichte⁵⁹³ ergab zwischen den Gruppen mit der *Igf-1(-/-)*-Mutation und der Wildtyp-Gruppe allerdings keine signifikanten Unterschiede [650,652].

⁵⁸⁶ gleichzeitige Expression

⁵⁸⁷ *Succinat Dehydrogenase*, Enzym im Zitronensäurezyklus, das *Bernsteinsäure* zu *Fumarsäure* oxidiert (1).

⁵⁸⁸ *Zitronensäurezyklus*

⁵⁸⁹ *nitroblaues Tetrazolium*

⁵⁹⁰ *Diformazan*

⁵⁹¹ Die *Extinktion* einer Lösung ist proportional der *Konzentration* der darin gelösten lichtabsorbierenden Substanz, der *Schichtdicke* der Lösung und abhängig vom *molaren Extinktionskoeffizienten* (1).

⁵⁹² *Capillary-to-Fibre Ratio* (engl.): *CFR*.

⁵⁹³ *Capillary Density* (engl.)

1.13.1.4. MyHC-Isoformen

Der MyHC-Phänotyp des Zwerchfells der adulten Mäuse wurde durch die *SDS-PAGE-Analyse*⁵⁹⁴ begutachtet. Die am schnellsten wandernde Bande innerhalb des Gels korrespondierte mit MyHC 1, gefolgt von MyHC 2B, MyHC 2X und MyHC 2A.

Die Proportionen dieser Isoformen waren bei den Tieren der *Igf-1(-/-)*-Gruppe nicht signifikant erhöht, im Vergleich zu den Tieren der Wildtyp-Gruppe. Allerdings beschrieben Fournier und Mitarbeiter eine Tendenz zur Erhöhung des Anteiles der Isoform MyHC 2X in der Gruppe der *Igf-1(-/-)*-Mäuse. Die Abwesenheit der Banden, die für die entwicklungsbedingten (neonatalen und embryonalen) MyHC-Isoformen charakteristisch sind, zeigte, dass nur die normalen reifen Formen dieses kontraktilen Proteins in erwachsenen *Igf-1(-/-)*-Mäusen exprimiert wurden [650,652].

Mäuse mit einer homozygoten Disruption des *Igf-1*-Gens wiesen eine Wachstumsrestriktion, Hypoplasie der Zwerchfellmuskulatur, reduzierte Größe der Zwerchfellfasern, reduzierte Zahl der Kapillaren pro Zwerchfellfaser, aber eine erhaltene Dichte der Kapillaren und gesteigerte *oxidative Kapazität* der Muskelfasern auf. Jedoch war keine Evidenz für eine Muskelfaserdystrophie oder einen Verlust der strukturellen Integrität der Fasern in der Gruppe der *Igf-1(-/-)*-Mäuse zu bemerken [650,652].

Die mitogene Antwort auf die Stimulation durch IGF-1 wurde in verschiedenen Studien und an unterschiedlichen Zelltypen gut *in vitro* untersucht, darunter waren auch Skelettmuskelzellen [650,654,655].

Aus Experimenten von Engert *et al.* an Zellkulturen ließ sich ableiten, dass die proliferative Antwort der Zellen auf IGF-1 die Muskelzelldifferenzierung einerseits anregte, und die myogenetische Differenzierung andererseits durch einen, von den proliferativen Effekten unabhängigen Prozess, hemmte [656,657]. Demzufolge könnte die reduzierte Zahl der diaphragmatischen Muskelfasern (*Hypoplasie*) in der Studie von Fournier *et al.* ein Resultat der Veränderungen der proliferativen Phase, des Differenzierungsprozesses, der Apoptose⁵⁹⁵ oder der Kombinationen dieser Entwicklungsprozesse sein [650,652].

Nachdem in Gen-Deletionsmodellen für *Igf-1*, *Igf-2* und *Igf-1r*⁵⁹⁶ eine Verschlechterung der Proliferation ersichtlich war, könnte man daraus ableiten, dass die Hypoplasie der Muskulatur das Resultat von geringeren proliferativen Ereignissen, die auf eine Veränderung der *Zellzyklus-Rate* zurückgehen, darstellen könnte.

Zum Beispiel wurde von Sell *et al.* eine Verlängerung der Zellzyklus-Dauer an Fibroblasten, die von *Igf-1r(-/-)*-Embryonen isoliert wurden, beobachtet. Eine weitere Studie, die die Dynamik des Zellzyklus *in vivo* an uterinen Zellen von *Igf-1(-/-)*-Mäusen untersuchte, berichtet über einen signifikant verlängerten Transit durch die *G₂-Phase* der *Mitose*⁵⁹⁷ [647,650,658,980].

IGF-1 aktiviert sehr früh die *Cycline*⁵⁹⁸ vom *Typ D* in kulturellen Myoblasten [656]. Demnach zeigten Mäuse, denen das *Cyclin-D1-Gen* fehlte, ein reduziertes Wachstum im Phänotyp [659]. Der Mangel an IGF-1 könnte somit auch indirekte Effekte auf Zellengröße und Zellenzahl ausüben [652].

⁵⁹⁴ *SDS-Polyakrylamidgel-Elektrophorese*

⁵⁹⁵ programmierter Zelltod

⁵⁹⁶ *Igf-1-Rezeptor*

⁵⁹⁷ Zellteilung nach identischer DNA-Replikation (1)

⁵⁹⁸ *Cycline* sind Proteine, die eine Schlüsselrolle in der Steuerung des Zellzyklus spielen. Sie sind in der Lage, mit Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdks) Komplexe zu bilden, sowie deren Kinasefunktion zu aktivieren (84).

Florini und Ewton berichteten darüber, dass die IGFs potente Stimulatoren der terminalen Differenzierung der Myoblasten *in vitro* sind und, dass IGF-1 die Expression von Myogenin, einem Transkriptionsfaktor der Familie der *MyoD-Myogenese*-Genfamilie, induziert.

Transgene Mäuse mit einer Überexpression von IGF-1 in der Muskulatur, zeigten eine schnellere myogenetische Differenzierung. Deshalb ist es nicht auszuschließen, dass die Abwesenheit von IGF-1 zu einer Verschlechterung der Differenzierung führen könnte, wie es in Muskelzell-Kulturen beschrieben wurde, in welchen *IGF-1*-Antisense-Oligonukleotide⁵⁹⁹ verwendet wurden [650,660-663].

Auch in Studien von Dwyer *et al.*, die die Auswirkungen einer *pränatalen Mangelversorgung*⁶⁰⁰ untersuchten, ergab sich eine Reduktion der Muskelfasern der Extremitäten und des Zwerchfells, was hier offenbar auf die reduzierten Levels von IGF-1 zurückgeführt werden konnte. Die Reduktion der Faseranzahl steht vermutlich in Verbindung mit der Verschlechterung der sekundären Bildung der *Myotubes*⁶⁰¹ [650,664,665].

Es gibt Daten, die darauf hinweisen, dass IGF-1 einen vorzeitigen Zelltod in vielen verschiedenen Zelltypen verhindern könnte. Am besten wurde dies von Williams *et al.* an hämatopoetischen Stammzellen untersucht und beschrieben [666].

IGF-1, IGF-2 und Insulin zeigten in Kulturen von *C2-Muskelzelllinien* einen hemmenden Effekt auf den Zelltod der *Myoblasten*⁶⁰². Darum ist es nicht auszuschließen, dass die Abwesenheit von IGF-1, in der Studie von Fournier *et al.*, zu einer beschleunigten Apoptose in *Igf-1(-/-)*-Mutanten geführt haben könnte, was sich durch eine geringere Anzahl an Myoblasten, die in sich in Richtung terminaler Differenzierung weiterentwickeln, manifestiert haben könnte [650,652,667].

Es ist auch unklar, ob und inwiefern die Anwesenheit von intaktem IGF-2 und IGF-1r während der Embryonalentwicklung den Grad der Hypoplasie, wie er an *Igf-1(-/-)*-Mutanten beobachtet werden konnte, zu kompensieren vermochte. Die stärker veränderten Phänotypen von *Igf-1(-/-)*-Mäusen und solchen, mit Knockouts der *Igf-1*- und *Igf-2*-Gene, könnten darauf hindeuten [648,650,668].

Wie bereits beschrieben, sind die IGFs potente Stimulatoren der terminalen Differenzierung der Myoblasten *in vitro* und IGF-1 induziert die Expression von *Myogenin*⁶⁰³ [660]. Die Daten der hier angeführten Studie von Fournier *et al.* bestätigten, dass eine myogene Differenzierung auftrat, was sich anhand der Abwesenheit von dystrophischen Veränderungen in individuellen Muskelfasern, der normalen Proportionen der Fasertypen, dem Vorkommen von nur adulten MyHC-Isoformen und von gleichen Anteilen des totalen MyHC und der Myofibrillen pro Gramm Diaphragma, bestätigte [652].

Dies deutet darauf hin, dass intaktes IGF-2 und intakter IGF-1R, gemeinsam mit anderen myogenen Faktoren während der Embryogenese, ausreichen könnten, um in Abwesenheit

⁵⁹⁹ Oligonukleotide, die der Transkription entgegenwirken

⁶⁰⁰ Unterernährung

⁶⁰¹ Muskelschläuche

⁶⁰² Vorläuferzellen, aus denen sich die Muskelzellen entwickeln

⁶⁰³ Myogenin ist ein Transkriptionsfaktor in Wirbeltieren, der an der Aktivierung muskelspezifischer Gene beteiligt ist (85).

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

von IGF-1 die terminale Differenzierung der Myoblasten zu ermöglichen. Trotzdem wurden in Studien an *Igf-1r(-/-)*-Mäusen qualitativ gleichwertige Transkripte von MyoD, Myogenin, Mrf4⁶⁰⁴ und Myf-5⁶⁰⁵, wie an Wildtyp-Mäusen gefunden. Es wird angenommen, dass die reduzierte Größe der diaphragmatischen Fasern auf Einflüsse nach der terminalen Differenzierung zurückzuführen sein könnte. Die IGFs fördern sowohl prä-, als auch postnatal den *Anabolismus*⁶⁰⁶ und das Wachstum durch verstärkte Aminosäure-Aufnahme und Proteinsynthese und reduzierten den Proteinabbau [648,652,669,670].

Während der Embryogenese spielen IGF-1 und IGF-2 eine Schlüsselrolle in der Wachstumsförderung. Aber nach der Geburt zeigt sich sowohl bezüglich des Serumlevels, als auch der physiologischen Rolle von IGF-2 eine Verminderung. Die signifikante Wachstumsrestriktion nach der Geburt (das Körpergewicht betrug bei der Geburt nur etwa 60% und im Alter von 2 Monaten nur etwa 30% der normalen Mäusefeten), die in den Untersuchungen von Fournier und Mitarbeitern auffiel, deutete auf die Wichtigkeit von *Igf-1* für den Erhalt des Wachstums hin [652,671].

Die von Fournier und Kollegen beschriebene signifikante Reduktion der Muskelfaser-Querschnitte in allen Fasertypen des Diaphragmas, ist mit der reduzierten Rate oder dem reduzierten Erhalt des Muskelfaserwachstums in Zusammenhang zu bringen. Die Reduktion der Größe der Fasern des Diaphragmas erschien geringer, als die der Körpergewichte der überlebenden *Igf-1(-/-)*-Mutanten [652].

Die unterschiedlichen Veränderungen können wohl nicht nur auf den Mangel an *Igf-1* zurückgeführt werden, sondern es müssen auch die Einflüsse anderer anabolischer oder repressiver Mediatoren, wie Interleukin⁶⁰⁷ 15 [672], Glial growth factor 2 [673] und Growth/differentiation factor 8 [657] berücksichtigt werden [652].

Die Proportionen der MyHC-Isoformen in den Zwerchfellen der *Igf-1(-/-)*-Mäuse waren in der hier beschriebenen Studie von Fournier und Mitarbeitern nicht signifikant erhöht, aber es zeigte sich ein Trend eines Anstieges des Anteils von *MyHC 2X*. Die funktionellen Folgen dieser Veränderung sind unklar, aber sie könnten, laut Meinung der Autoren, eine adaptive Veränderung zur Bewahrung der krafterzeugenden Anteile des Diaphragmas darstellen [652].

Auch die Zunahme der *oxydativen Kapazität* der Diaphragma-Fasern von *Igf-1(-/-)*-Mäusen stellt vermutlich eine adaptive Antwort bezüglich einer vermehrten Rekrutierung der motorischen Einheiten des Diaphragmas im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren dar.

Der Grund dieser Adaption ist unbekannt, aber sie könnte durch eine gesteigerte Arbeit des Zwerchfells, eine strukturell abnormale Lunge aufzublähen, bedingt sein, oder durch den Versuch einer Kompensation der durch die Hypoplasie beeinträchtigten schwächeren Zwerchfellmuskulatur hervorgerufen werden.

Lewis *et al.* fanden in einer früheren Untersuchung der Effekte einer IGF-1-Verabreichung auf die SDH diesbezüglich allerdings keinerlei Unterschiede [652,674].

⁶⁰⁴ Myf6 (*myogenic factor 6*, auch als MRF4 und *Herculin* bekannt), ist ein *muskelspezifischer Transkriptionsfaktor* und gehört zur Gruppe der MRFs (*myogenic regulatory factors*) (86).

⁶⁰⁵ Myf-5 ist ein Protein mit einer Schlüsselrolle in der Muskeldifferenzierung. Es gehört zur Gruppe der *myogenic regulatory factors* (MRFs) (87).

⁶⁰⁶ Aufbau-Stoffwechsel

⁶⁰⁷ Interleukin ist ein Zytokin (*Zytokine* sind Mitglieder einer Gruppe von sezernierten Substanzen, die als interzelluläre Mediatoren zur Aktivierung von Zellen beitragen) (1).

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Eine gesteigerte oxidative Kapazität der Skelettmuskulatur konnte auch von Goad *et al.* bei Mangelernährung beobachtet werden, die zu einem Abfall der Igf-1-Levels im Serum führte.

In der Untersuchung von Fournier *et al.* wurde aber angenommen, dass die erhöhte SDH-Aktivität eher auf eine gesteigerte Rekrutierung der Muskulatur, als auf direkte oder indirekte Einflüsse der *Igf-1*-Deletion zurückzuführen gewesen sein könnte [652,675].

Die möglichen Mechanismen, die eine geringere Anzahl von Kapillaren pro Faser bei den *Igf-1(-/-)*-Mäuse-Mutanten bedingen könnten, reflektieren am ehesten die Abwesenheit von Igf-1, das bekanntlich zwei, eine *direkte* und eine *indirekte angiogenetische*⁶⁰⁸ *Wirkung* hat, wobei letztere durch die Verstärkung der Genexpression von *VEGF*⁶⁰⁹ zustande kommt.

Im Gegensatz dazu existieren keine Beweise dafür, dass andere angiogenetische Faktoren, wie basic FGF, acidic FGF, PDGF und TGF- β und kürzlich beschriebenen Faktoren, wie Angiopoietin, Leptin⁶¹⁰ und Chemokine⁶¹¹, direkt durch IGF-1 beeinflusst werden [652,675,676].

Mithilfe der aktuellen Daten ist es, den Beschreibungen von Fournier *et al.* folgend, nicht möglich, die relative Wichtigkeit der *direkten* vs. *indirekten* Effekte der Abwesenheit von Igf-1 auf die Gefäße des Zwerchfells abzuwägen. Es muss erwähnt werden, dass trotz der reduzierten *capillary-to-fibre ratio*, die erhaltene *Kapillarendichte*⁶¹² eine adäquate Diffusion von Sauerstoff und anderen Substraten gewährleistete. Die erhaltene Kapillardichte des Zwerchfells bei den *Igf-1(-/-)*-Mäuse-Mutanten zeigte keine Notwendigkeit für eine weitere Adaption oder einen Anstieg der lokalen Mikrozirkulation über non-IGF-1-Signalwege [652].

Der Einfluss der Zerstörung des Targets des *Igf-1*-Gens auf das Wachstum (Körpergewicht) begann sich, den Beobachtungen von Baker *et al.* folgend, am *embryonalen Tag 13,5* zu manifestieren [647]. Zu diesem Zeitpunkt ist die primäre Bildung der Myotubes komplett und es besteht eine Lücke von zwei Tagen, ehe die zweite Generation der Myotubes entsteht [677]. Die normale Anzahl der primären Myotubes war bei den Mäusen der *Igf-1(-/-)*-Gruppe erhalten und so konnte auch die normale Anzahl an *Motoneuronen* erhalten bleiben [652].

In einer anderen Studie, die von Beck und Kollegen [678] an *Igf-1(-/-)*-Mäusen des gleichen Alters durchgeführt wurde, war die Anzahl der Motoneurone im lumbalen Rückenmark erhalten und in gleicher Weise verhielt es sich mit den phrenischen Motoneurone im zervikalen Bereich.

McLennan stellte die Vermutung auf, dass die Zahl der Motoneurone, die die Periode des normalen oder programmierten Zelltodes überlebten, mit der Zahl der primären Myotubes gekoppelt sein könnte. Demnach könnte die späte embryonale Periode abhängiger von der Anwesenheit von Igf-1, und die kleinere Anzahl der Fasern im Diaphragma von *Igf-1(-/-)*-Mäusen das Resultat einer geringeren Rate von *sekundärer Formation* der Myotubes sein [652,679].

Dies hat Auswirkungen auf die Größe der *Motorunits*⁶¹³ im Zwerchfell von *Igf-1(-/-)*-Mutanten. Die Reduktion der Größe der diaphragmatischen Motorunits könnte aufgrund

⁶⁰⁸ Gefäß-bildende Wirkung

⁶⁰⁹ *Vascular endothelial growth factor*

⁶¹⁰ Das *Leptin* (griech. „leptos“=dünn) ist ein Proteohormon, das durch das *obese-Gen* codiert und hauptsächlich von Fettzellen (*Adipozyten*) abgegeben wird (88).

⁶¹¹ Die *Chemokine* (Name abgeleitet aus *chemotaktische Zytokine*), sind eine Gruppe der *Zytokine*, also kleine Signalproteine, die bei Zellen eine Wanderungsbewegung (*Chemotaxis*) auslösen (89).

⁶¹² Zahl der Kapillaren pro Unit

⁶¹³ Zahl der Muskelfasern, die von einem Motoneuron innerviert werden

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

der Verringerung der Zielfasern, die für die Innervation zur Verfügung stehen, zustande kommen.

Die Konsequenzen daraus wären zum einen eine reduzierte Kraftproduktion jeder Motorunit (auch bedingt durch die reduzierte Größe der individuellen Zwerchfell-Fasern), und zum anderen die Notwendigkeit der Steigerung der Rekrutierung der Motorunits, um den erhöhten Kraftaufwand bei Ruheatmung oder Belastungsatmung zu bewerkstelligen.

Dies lässt die Autoren vermuten, dass die Gesamtkraft des Diaphragmas (wichtigster Atemmuskel) reduziert sein könnte und damit auch seine funktionelle Kraftreserve (vor allem unter Belastung). Die *steigende Aktivität der SDH*, wie oben erwähnt, reflektiert laut Fournier das gesteigerte Rekrutierungsverhalten des Diaphragmas [652].

Der Einfluss von niedrigen Levels von IGF-1 auf das Zwerchfell ist von großer Bedeutung, da das Zwerchfell während der gesamten Lebensspanne rhythmisch aktiv ist und nur damit eine ausreichende alveoläre Ventilation ermöglicht wird. Man vermutete in der vorliegenden Studie von Fournier *et al.*, dass die gesamte kraft erzeugende Kapazität des Zwerchfells, und auch seine Kraftreserven, reduziert waren, was sich vermutlich in der geringen Überlebensrate von etwa 5% der *Igf-1*-Knockout-Mäuse (bedingt durch Atemversagen) widerspiegelt haben könnte [652].

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass die Haupteffekte der Deletion des *Igf-1*-Gens, die *Muskelhypoplasie* (reduzierte Muskelfaseranzahl), die reduzierte Anzahl der Kapillaren und die reduzierten anabolen Effekte sind, die sich am meisten im postnatalen Stadium bemerkbar machen und zu einer reduzierten Rate des Wachstums der Muskelfasern und zu einer Reduktion der Zellgröße führen. Die reduzierte Anzahl an Fasern des Zwerchfells könnte die Einflüsse der *Igf-1*-Gendeletion auf die Zellproliferation, Differenzierung und den programmierten Zelltod, entweder alleine, oder in Kombination darstellen. Die reduzierte Anzahl der Kapillaren in der Gruppe der *Igf-1*(-/-)-Mäuse könnte aus der verschlechterten Angiogenese resultieren. Die biochemische Steigerung der oxydativen Kapazität der individuellen Muskelfasern des Zwerchfells könnte, wie erwähnt, hingegen auf eine gesteigerte Aktivierung des Zwerchfells bei den *Igf-1*(-/-)-Mutanten zurückzuführen sein [652].

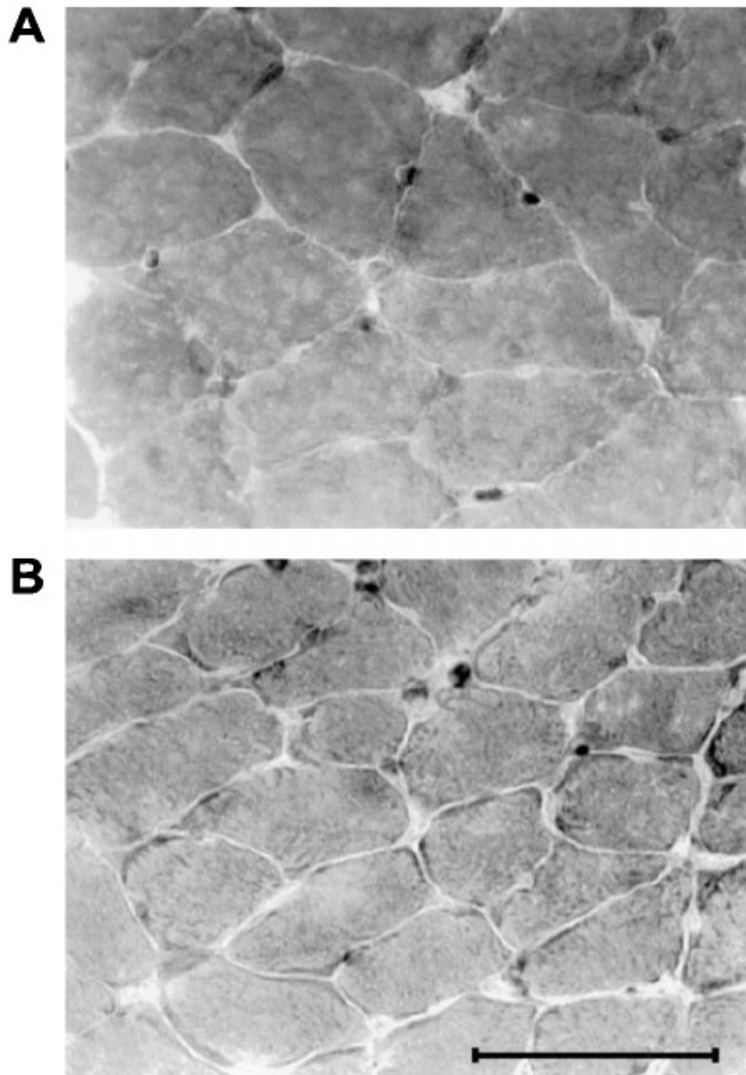


Abbildung 19:
Mikrofotografien von Gewebeschnitten des Zwerchfells (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) von Wildtyp-(A) und *Igf-1(-/-)* Mäusen (B). Es konnten keine histopathologischen Veränderungen beobachtet werden, aber es zeigte sich eine Abnahme der Zellgröße der Muskelfasern bei *Igf-1(-/-)*-Mäusen (B), im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (A).

Vergrößerung: jeweils 63-fach,
Scale Bar: 50 μ m

Quelle: © Fournier *et al.* [652]

1.13.2. Die Folgen der Blockade des IGF-1R

IGF-1 ist ein wichtiger Faktor, der in die Entwicklung und die normale Homöostase vieler Organe involviert ist. Er ist auch ein potenter Überlebensfaktor, der die Apoptose hemmen und die Proliferation in verschiedenen Zellen induzieren kann [680,681].

Regulationsstörungen des Zellüberlebens und der Proliferation sind bei vielen Lungenerkrankungen, wie dem *ARDS*⁶¹⁴ und der idiopathischen Lungenfibrose, zu beobachten [682].

Trotzdem ist über die Rolle des IGF-Signalweges in diesen Lungen noch sehr wenig bekannt. In der Lunge wurde IGF-1 von Maeda *et al.* ursprünglich als *Alveolar macrophage-derived growth factor* beschrieben [683].

Diese Studie von Maeda *et al.*, die hier näher beschrieben werden soll, ergab, dass der Gehalt an *Igf-1*-mRNA bei Mäusen, die an durch *Bleomycin*⁶¹⁵ induzierter Lungenfibrose litten, erhöht war [683].

⁶¹⁴ *Acute Respiratory Distress Syndrome*

⁶¹⁵ *Bleomycin* ist ein Antibiotikum, das aus *Streptomyces verticillus* gewonnen wird (90).

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Ein gesteigertes Immunostaining für IGF-1 wurde auch an *Lungenbiopsaten*⁶¹⁶ von Patienten mit *fibroproliferativem ARDS* beobachtet [684]. Es wurde demonstriert, dass an Patienten, die unter frühen Stadien eines ARDS litten, gesteigerte Levels von IGF-1 in der Flüssigkeit der *BALF*⁶¹⁷ vorhanden waren. Dabei wurde auch beobachtet, dass das IGF-1 in der BALF das Überleben der Lungenfibroblasten förderte, das Überleben der Epithelzellen der Lunge jedoch nicht beeinflusste [683,685].

Ein interessanter Aspekt bezüglich des ARDS ist, dass sich die Lungenveränderungen bei der Mehrheit der Patienten wieder zurückbildeten. Die Apoptose der Lungenfibroblasten spielt dabei allem Anschein nach eine entscheidende Rolle und die Abnahme der IGF-1-Levels könnte darauf einen wichtigen Einfluss ausüben [683,686,687].

Um die Rolle von IGF in der Pathogenese der Lungenveränderungen genauer zu beschreiben, wurde der Effekt einer Blockade des *Igf-1r*⁶¹⁸ an Mäusen mit durch *Bleomycin* hervorgerufener Lungenfibrose von Choi *et al.* untersucht [682].

1.13.2.1. Zeitlicher Verlauf der IGF-Expression nach Bleomycin-induziertem Schaden

In früheren Studien wurde bereits demonstriert, dass Patienten mit frühem ARDS erhöhte Levels an IGF aufwiesen, wo hingegen bei Patienten mit spätem ARDS die Levels erniedrigt waren. Bei der Analyse der *Igf-Expression* mittels quantitativer PCR, zeigte sich an Mäusen, die mit Bleomycin behandelt wurden, ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression am Tag 1 und ein siebenfacher Anstieg am Tag 7 nach der Verabreichung von Bleomycin.

Die Levels der IGF-mRNA nahmen zu späteren Zeitpunkten wieder ab, blieben aber bis zum Tag 14 im Vergleich zu den Basislevels erhöht [682,685].

1.13.2.2. Herabregulierung des *Igf-1r* an Mäusen, die mit A12 behandelt wurden

A12⁶¹⁹ hemmt den Signalweg von IGF-1 auf zwei verschiedene Arten: zum einen, durch eine Blockade der Bindung des Liganden an den IGF-1R, und zum anderen durch die schnelle Induktion der *Internalisierung*⁶²⁰ und *Degradation*⁶²¹ des IGF-1R. Um die Effizienz der Behandlung mittels A12 zu verifizieren, wurde die *Igf-1r-Expression* in den Lungen von Mäusen, die mit A12 behandelt wurden und in den Lungen der Kontrollgruppe am Tag 7 nach Bleomycin-Verabreichung untersucht. Es zeigte sich dabei eine Abnahme der *Igf-1r-Expression* bei Mäusen, die mit A12 behandelt wurden, was den vorhersehbaren Effekt der Antikörper-Verabreichung am Lungengewebe bestätigte [682,688].

Der blockierende Effekt von A12 auf den *Igf-1r* wurde in der hier wiedergegebenen Studie an mit Bleomycin behandelten Mäusen untersucht [682]. Nach Bleomycin-Behandlung zeigte sich dabei, dass bei A12-behandelten Mäusen eine signifikante Steigerung des Überlebens im Vergleich zur Kontrollgruppe auftrat. In der Kontrollgruppe wurden die meisten Todesfälle zwischen den Tagen 7 und 10 verzeichnet.

Bemerkenswert war die an A12-behandelten Mäusen auftretende Reduktion des Körpergewichtes im Vergleich zur Kontrollgruppe (20 vs. 13% am Tag 14), aber diese Mäuse zeigten geringere Anzeichen von *respiratorischem* oder *systemischem Distress*⁶²².

⁶¹⁶ Biopsien aus der Lunge

⁶¹⁷ *Bronchoalveolar Lavage Fluid*: Flüssigkeit der *bronchoalveolären Lavage*

⁶¹⁸ *Igf-1-receptor*

⁶¹⁹ monoklonaler Antikörper gegen den *IGF-1R*

⁶²⁰ Ein Rückzug (*Translokation*) von Rezeptoren und ähnlichen Strukturen (Transporter, Kanäle) von der Zelloberfläche in das Zellinnere (91).

⁶²¹ Abbau

⁶²² Insuffizienz der Atmung und des Kreislaufs

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Die Verabreichung von A12 alleine, in Abwesenheit von Bleomycin, hatte keine Effekte auf das Überleben, die Lungenhistologie, die BALF-Proteinkonzentration oder die Zellenzahl [682,689].

Um die Permeabilität der Lunge und den Grad der Entzündung zu messen, wurden in dieser Studie von Choi *et al.* der Gesamtproteingehalt, die Zellenzahl und die Zelldifferenzierung in der BALF untersucht. Wie erwartet, zeigten die Bleomycin-behandelten Mäuse einen signifikant erhöhten Gesamtproteingehalt und eine erhöhte Zellenzahl im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen. Zu den frühen Zeitpunkten (Tage 7 und 14) wurde allerdings kein Unterschied bezüglich der BALF-Proteinkonzentration zwischen Bleomycin-A12-Mäusen und Bleomycin-Kontroll-Mäusen gefunden [682].

Auch die gesamte Zellenzahl war zwischen den A12- und den Kontroll-Mäusen nicht signifikant unterschiedlich und es zeigte sich diesbezüglich keine Abnahmetendenz in der A12-Gruppe. Es waren auch keinerlei Unterschiede der Zelldifferenzierung zwischen den beiden Gruppen zu keinem Zeitpunkt der Untersuchung zu beobachten [682].

1.13.2.3. Untersuchung der Lungenfibrose

Als Marker der Lungenfibrose wurde der Gehalt der Lungen an *Hydroxyprolin*⁶²³ quantifiziert. An den Tagen 7 und 14 zeigten sich diesbezüglich zwischen den beiden Gruppen keine Unterschiede. Allerdings war am Tag 28 signifikant weniger Hydroxyprolin in den Lungen der Mäuse der A12-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe vorhanden, was, laut Vermutung der Autoren, darauf hindeuten könnte, dass die Behandlung mit A12 eher die Auflösung der Lungenfibrose, als deren Förderung bewirkte [682].

Bei histologischer Betrachtung der Lungen zeigten sich am Tag 14 in beiden Gruppen fibrotische Areale, aber es schien, als wäre ihr qualitativer Anteil in der Gruppe der A12-behandelten Mäuse reduziert. Die Unterschiede waren dann am Tag 28 wesentlich deutlicher zu sehen. An diesem Tag waren nach Bleomycin-Behandlung die rechten Mittellappen der Lungen der Kontrollgruppe kleiner und zeigten größere Abweichungen von der normalen Architektur, mehr obliterierte Luftwege und interstitielle Verdickungen, wo hingegen die rechten Mittellappen der A12-behandelten Mäuselungen eine bessere Lungenarchitektur, eine höhere Lungengröße und weniger fibrosierte Areale aufwiesen [682].

Um zu untersuchen, ob die Behandlung mit A12 auch nach der Verursachung der Lungenveränderung durch Bleomycin effektiv sein würde, wurde die Behandlung mit A12 von Choi *et al.* verspätet (7 Tage nach der Bleomycin-Behandlung) durchgeführt und dann die Fibrose am Tag 21 analysiert. Hierbei stellten die Forscher einen verminderten Gehalt an Hydroxyprolin fest, was die Vermutung nahe legte, dass die A12-Behandlung auch bezüglich der Reduktion der Fibrose, also auch nach Initiation des entzündlichen Prozesses, effektiv sein könnte [682].

1.13.2.4. Apoptose in den Lungen von Bleomycin-behandelten Mäusen

Um den Mechanismus des reduzierten Hydroxyprolin-Gehaltes genauer zu untersuchen, wurde die Zahl an apoptotischen Zellen in der Gruppe der A12-behandelten Mäuse und der Kontrollgruppe gemessen. Am Tag 14 war ein Trend bezüglich eines Anstiegs der

⁶²³ *Hydroxyprolin* (exakter *L-4-Hydroxyprolin*) ist eine α -Aminosäure, welche im Kollagen vorkommt (1).

TUNEL⁶²⁴-positiven Zellen in der mit A12 behandelten Gruppe von Mäusen zu verzeichnen, auch wenn dies keine statistische Signifikanz erreichte.

Am Tag 28 zeigten sich dann signifikant weniger apoptotische Zellen in der Gruppe der A12-Mäuse verglichen mit jenen der Kontrollgruppe [682].

Wie zuvor beschrieben, führte die Blockade des IGF-Signalweges in Fibroblasten der menschlichen Lunge zu einem Anstieg der Apoptoserate [685]. Nun zeigte sich auch durch die Blockade dieses Signalweges mittels des Antikörpers A12 ein dosisabhängiger Anstieg der Apoptose in Fibroblasten von Mäuselungen. Also deuten sowohl die Daten der *in vivo*-, als auch jene der *in vitro*-Behandlung mit A12, auf eine Zunahme der Apoptose der Fibroblasten hin [682].

Frühere Arbeiten demonstrierten eine durch IGF-1 induzierte Proliferation verschiedener Zelltypen, wie *mesothelialer Zellen* der Pleura⁶²⁵, *Myelomzellen*⁶²⁶ und *Myoblasten*⁶²⁷.

Nachdem die Proliferation der Fibroblasten eine Schlüsselrolle bei der Fibrose spielt, stellte sich auch die Frage, ob IGF-1 eine mitogene Wirkung auf Lungenfibroblasten ausüben könnte [682,690-693].

Es wurden deshalb von Choi und Mitarbeitern Vergleiche in Zellkulturen bezüglich der Zellproliferation in An- und Abwesenheit von IGF-1 (100 ng/ml) durchgeführt. Im Gegensatz zu anderen Beobachtungen zeigte sich in dieser Studie keine Zunahme der Proliferation. Also dürfte, nach Annahme der Autoren, die günstige Beeinflussung durch IGF-1 bezüglich des Überlebens der Fibroblasten eher auf ein *antiapoptotisches*, als auf ein *proliferatives* Signal zurückzuführen gewesen sein [682].

1.13.2.5. IGF-1-induzierte Migration von Lungenfibroblasten

Die Migration der Lungenfibroblasten in den intraalveolären Raum mit Ablagerung von extrazellulärer Matrix wird bei der Lungenfibrose beobachtet. Wie erwähnt, wurden in der BALF von Patienten mit akuten Lungenveränderungen gesteigerte Levels von IGF nachgewiesen. Deshalb stellten sich Choi und Kollegen die Frage, ob IGF als chemotaktischer Faktor für Fibroblasten wirken könnte. Dies wurde an Lungenfibroblasten von Mäusen unter Verwendung eines Filtersystems untersucht. Es zeigte sich hierbei, dass IGF-1 die Migration von Fibroblasten der Mäuselungen steigerte. Eine Blockierung des IGF-1r mittels A12-Antikörpern führte zu einer Annullierung dieser Migration [682].

1.13.2.6. IGF-1-Signalwege in Lungenfibroblasten

Um die durch IGF-1 aktivierten Signalwege in Lungenfibroblasten zu ergründen, wurde die Expression und *Phosphorylierung*⁶²⁸ des IGF-1r, nach Stimulation mittels IGF-1, untersucht. Der IGF-1r zeigte dabei innerhalb von einer 15-minütigen IGF-1-Stimulation eine Phosphorylierung. Die Lungenfibroblasten exprimierten sowohl IRS-1⁶²⁹, als auch IRS-

⁶²⁴ Terminal Deoxynucleotidyltransferase dUTP Nick End Labeling (92)

⁶²⁵ Lungenfell

⁶²⁶ Zellen eines *multiplen Myeloms (Plasmozytoms)*. Ein *Myelom* ist eine Krebserkrankung des Knochenmarks mit pathologischer Produktion von *Immunglobulinen* (93).

⁶²⁷ *Vorläuferzellen* der Muskelzellen (1)

⁶²⁸ Unter *Phosphorylierung* versteht man in der Biochemie das reversible (umkehrbare) Anhängen einer Phosphatgruppe an ein organisches Molekül, insbesondere an Proteine. Das Resultat sind *Phosphoproteine*. Diese Phosphorylierung stellt die wichtigste Regulation von biologischen Prozessen in der Zelle dar. Chemisch handelt es sich um die Bildung eines *Phosphorsäureesters* (94).

⁶²⁹ Das Insulinrezeptorsubstrat 1 ist an der durch Insulin hervorgerufenen Aktivierung einer Rezeptor-Tyrosinkinase beteiligt, die eine Signaltransduktion am Insulinrezeptor in Gang setzt (95).

2⁶³⁰, aber nur IRS-2 war nach der Stimulation durch IGF-1 aktiviert worden [682]. IRS-1 zeigte die gleiche Konstitution der Levels der Phosphorylierung und diese änderten sich bei der Stimulation durch IGF-1 nicht.

Andererseits zeigte IRS-2 einen Anstieg der Phosphorylierung nach 5-10 Minuten und eine Abnahme auf Höhe des Basislevels war nach 30 Minuten wieder erreicht [682].

Sowohl die Signalwege der PI3-Kinasen⁶³¹, als auch jene der MAPK⁶³² waren in den IGF-Signalweg in verschiedenen Zelltypen involviert. Es zeigte sich, dass Akt, das Substrat der PI3-Kinase, in Antwort auf die IGF-1-Stimulation innerhalb von 15 Minuten phosphoryliert wurde und in diesem Zustand bis zu 60 Minuten verweilte.

Im Gegensatz dazu war ERK⁶³³, das Substrat der MEK-1/2⁶³⁴, in Lungenfibroblasten vorhanden, wurde aber keiner Phosphorylierung unter Stimulation mit IGF-1 unterzogen. Demnach scheinen IRS-2 und PI3-Kinase die Hauptsignalwege darzustellen, die durch IGF-1 in Fibroblasten von Mäuselungen aktiviert werden [682].

Es zeigte sich in der vorliegenden Studie von Choi *et al.* auch, dass die Behandlung mit A12-Antikörpern das Überleben förderte und zu einer Beschleunigung der Auflösung der durch Bleomycin ausgelösten Lungenfibrose führte. Auch die späte Verabreichung von A12 war bezüglich der Reduktion der Lungenfibrose effektiv [682].

Die Behandlung von Fibroblasten aus Mäuselungen mit A12 induzierte die Apoptose *in vitro*.

Die Apoptose von Zellen der Fibrogenese ist essentiell für die Auflösung der Lungenveränderungen. Nachdem der Signalweg von IGF-1 eine Schlüsselrolle im Zellüberleben spielt, könnte die Herabregulierung dieses Signalweges für beide, sowohl die Auflösung, als auch die Prävention einer verlängerten fibrogenetischen Antwort, notwendig sein [694,695,682].

Da die gesteigerte Apoptose hier eine Verbesserung der Fibrose am Tag 28 bewirkte, wird angenommen, dass diese Verbesserung durch eine Elimination der fibrogenetischen Zellen verursacht wurde [682,687].

IGF reguliert eine Vielzahl von Funktionen, die für die Entwicklung einer Fibrose relevant sind. Dazu gehören die Proliferation, Kollagensynthese und das Überleben der Zellen [696]. Es zeigte sich allerdings ein gemischter Beitrag von IGF zur Fibrose am Tiermodell. An einem Modell mit chronischem Nierenversagen durch subtotale Nephrektomie, resultierte aus der Blockade von IGF ein geringeres kompensatorisches Nierenwachstum, aber es zeigten sich keine Unterschiede bezüglich der Nierenfunktion oder der Fibrose [682,697].

Transgene Mäuse, die die *Igf-1a*-Spleiß-Variante exprimierten, entwickelten eine *adenomatoide Hyperplasie*, aber keine Fibrose [698].

⁶³⁰ Das Insulinrezeptorsubstrat 2 ist ein zytoplasmatisches Signalmolekül, das die Effekte von Insulin und IGF-1 mediiert, indem es als „molekularer Adapter“ zwischen diversen *Rezeptor-Tyrosinkinasen* und deren Effektoren fungiert (96).

⁶³¹ Die *Phosphatidylinositol-3-Kinasen* stellen eine Familie von Enzymen dar, die in das Wachstum, die Proliferation, die Differenzierung, die Motilität, sowie das Überleben und den Stoffaustausch von Zellen involviert sind (97).

⁶³² Die *Mitogen-Activated Proteinkinase* ist in an der Regulierung zellulärer Aktivitäten, wie Genexpression, Mitose, Differenzierung, Proliferation und Überleben bzw. Apoptose beteiligt (98).

⁶³³ *Extracellulär-Signal-Regulierte Kinasen* (ERKs) oder *klassische MAP-Kinase*

⁶³⁴ Der *MAPK/ERK-Kinase-Pathway* beschreibt eine Kette von Zellproteinen, die an der Übermittlung eines Signals von der Zelloberfläche zur DNA im Zellkern beteiligt ist (99).

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Choi *et al.* führten den Mangel an Fibrose in diesem transgenen Modell möglicherweise auf die vermehrte Sekretion von IGF-1a, die eher in das luminale Kompartiment, als in das interstitielle Kompartiment erfolgt sein könnte, zurück [682].

IGF-1 war auch als Mitogen für Fibroblasten in der BALF von Patienten mit *Sarkoidose*⁶³⁵ [699] und *systemischer Sklerose*⁶³⁶ [700] nachweisbar.

Aber IGF trug in einer Studie von Mutsaers *et al.* nicht zur Proliferation der Fibroblasten bei Patienten mit *Asbestose*⁶³⁷ bei [682,701].

IGF-1 mediiert offenbar die Migration und das Überleben von Zellen via Interaktion mit dem IGF-1R, aber nicht deren Proliferation. Vermutlich könnte die Aktivierung der Fibroblasten durch andere Wachstumsfaktoren oder *Zytokine*, wie den TGF- β , für den proliferativen Effekt von IGF notwendig sein. Es zeigte sich, dass TGF- β , ein wichtiger Mediator der Fibrose, in Lungenfibroblasten die IGF-1-Expression steigerte [682,696]. Lungenfibroblasten exprimieren Hauptkomponenten des IGF-Signalweges, wie IGF-1R, IRS-1 und IRS-2. Interessanterweise wurde, wie bereits beschrieben, nur IRS-2 nach IGF-Stimulation vermehrt phosphoryliert. Beide, sowohl der PI3-Kinase-, als auch der MAPK-Signalweg sind in den IGF-1R-Signalweg von Karzinomzellen und anderen Zelltypen involviert.

In Myelomzellen werden sowohl die antiapoptotischen, als auch die proliferativen Signale von IGF-1 durch die PI3-Kinase mediiert. In Myoblastzellen wurde die IGF-1-induzierte Differenzierung durch die PI3-Kinase mediiert, wogegen jene der Proliferation durch die MAPK mediiert wurde [680,682,702,703].

In der Studie von Choi und Kollegen stimulierte IGF-1, wie gesagt, den IRS-2- und PI3-Kinase-Signalweg, aber nicht den IRS-1- und MAPK-Signalweg.

Ein Vorgang bei der Entstehung der Lungenfibrose ist durch die Migration der Fibroblasten in den intraalveolären Raum beschrieben, wo sie Matrixproteine sezernieren und damit zur Obliteration der normalen Architektur beitragen [682].

IGF-1 induziert die Migration von Fibroblasten und dies konnte durch die Anwendung von AK12 gehemmt werden. Die Aktivierung des IGF-1R kann die Zellmigration durch verschiedene Mechanismen beeinflussen, wie durch die Herabregulierung der adhäsiven Wirkung der Integrine, die Verteilung der Integrine an den Rand der wandernden Zellen und die Veränderung der Cadherin-Catenin-Komplexe⁶³⁸. Nachdem Patienten mit ARDS in der BALF erhöhte Levels von IGF-1 aufwiesen, lässt sich vermuten, dass IGF-1 eine chemotaktische Wirkung auf die Migration der Fibroblasten in die intraalveolären Räume ausüben und damit zur Ablagerung von Matrixproteinen und somit zur Reduktion der Lufträume beitragen könnte [682,704].

Hinsichtlich des von Choi *et al.* beschriebenen Hydroxyprolin-Gehaltes an den Tagen 7 und 14 zeigten sich keine Unterschiede, was zu der Annahme führte, dass die Unterschiede

⁶³⁵ Die *Sarkoidose* (von griech. „sarkódes“=„die fleischige Krankheit“) ist eine Erkrankung, die die Weichteile betrifft (auch *Morbus Boeck* oder *Morbus Schaumann-Besnier*). Sie ist eine systemische Erkrankung des Bindegewebes mit Granulombildung (100).

⁶³⁶ Die *systemische Sklerose* ist eine Form der *Sklerodermie (Kollagenose)* die zusätzlich die inneren Organe befällt (1).

⁶³⁷ Die *Asbestose* ist eine Krankheit der Lunge und gehört zu den so genannten *Pneumokoniosen* (Staublungenkrankheiten). Sie wird durch Ablagerung von Asbestfasern in der Lunge verursacht (1).

⁶³⁸ Beim klassischen *Cadherin-Catenin-Komplex* verbinden β -Catenin und α -Catenin ein *Cadherin-Molekül* mit dem Aktinzytoskelett. Dies ist wichtig für die Zelladhäsion (20).

bezüglich der frühen Fibrose nicht zur reduzierten Mortalität der A12-behandelten Mäuse beitragen. Die späte Verabreichung von A12 hat in dieser Studie das Überleben der Mäuse nicht beeinflusst. Diese Beobachtung überraschte die Autoren nicht, denn die meisten Todesfälle durch Bleomycin traten innerhalb der ersten zehn Tage nach der Verabreichung auf [682].

Eine Reduktion der Entzündungsvorgänge durch A12 wäre möglich, denn es zeigten sich ein reduzierter Zellgehalt und ein reduzierter totaler Proteingehalt in der BALF von A12-behandelten Mäusen, was durch ein reduziertes Vorkommen von Entzündungsvorgängen bedingt gewesen sein könnte. Dieser Aspekt erreichte laut Choi *et al.* allerdings keine statistische Signifikanz [682].

Die Behandlung mit A12 könnte die Antwort auf *oxidativen Stress*⁶³⁹ nach Bleomycin-Anwendung beeinflussen. Mäuse, die für den Igf-1r heterozygot waren, zeigten eine größere Resistenz gegenüber oxydativem Stress und wiesen eine verlängerte Lebensspanne auf, was durch eine Reduktion des Signalweges der *p66-Isoform* des *Shc*, einem anderen Signaltransduktionsmolekül von Igf-1r, hervorgerufen worden sein könnte [682,705].

Der IGF-1R stellt also, den Ergebnissen der Untersuchungen von Choi *et al.* folgend, ein potenzielles Ziel für die Behandlung von Lungenschäden und der Lungenfibrose dar [682].

1.13.3. Fetale IGF-1-Therapie bei einer IUGR

Die intrauterine Wachstumsrestriktion (IUGR) ist ein klinisch relevantes, aber bisher nur unzureichend verstandenes Problem, das in Nordamerika 3-7% und in den Entwicklungsländern bis zu 11% der Schwangerschaften betrifft. Defekte der mütterlichen Nährstoffversorgung, die vorzeitige Plazentalösung, aber auch die fetale Aufnahme der Nährstoffe tragen offenbar zu diesem Phänomen bei. Klinische und experimentelle Beobachtungen erkannten die Bedeutung des hormonellen fetoplazentaren Milieus als eine kritische Determinante des fetalen Gewebewachstums und der Gewebedifferenzierung. Von speziellem Interesse ist dabei die Rolle von IGF-1, einem Peptidhormon, das von der Plazenta und den meisten fetalen Geweben produziert wird [706-708].

IGF-1 ist, wie zuvor beschrieben, ein potenter Stimulator der Zellteilung, sowie der zellulären Differenzierung und am Menschen wurde eine Korrelation zwischen den zirkulierenden IGF-1-Blutlevels der Nabelschnur, der Größe des Neugeborenen zum Geburtszeitpunkt und dem postnatalen Wachstum beschrieben [709,710].

Der Hase erwies sich als die ideale Spezies für die Untersuchung der IUGR. Innerhalb jedes Uterushornes (links und rechts) findet man auf Position drei (gezählt vom Ende des Ovars) einen wachstumsretardierten Fetus. Im Gegensatz dazu sind die Feten auf Position eins der Uterushörner wachstumsbevorzugt. Nachdem der Uterus der weiblichen Hasen zwei Hörner aufweist, stehen pro Uterus und Wurf⁶⁴⁰ zwei Feten mit einer IUGR zur Untersuchung zur Verfügung, was vergleichende Studien zwischen den

⁶³⁹ Als *oxidativen Stress* bezeichnet man eine Stoffwechsellage, bei der eine, das physiologische Ausmaß überschreitende Menge reaktive Sauerstoffverbindungen gebildet wird. Diese reaktiven Sauerstoffverbindungen entstehen im Rahmen von Stoffwechselvorgängen der *mitochondrialen Elektronentransportkette* und der *Cytochrom-P450-Oxidasen*. Dabei handelt es sich um das *Superoxid-Anionenradikal O₂⁻*, *Wasserstoffperoxid (H₂O₂)* und das *Hydroxylradikal OH* (101).

⁶⁴⁰ Schwangerschaft

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

„Kümmerlingen“⁶⁴¹ auf Position drei der beiden Seiten ermöglicht. Der Kümmerling auf Position drei der Gegenseite dient somit der Kontrolle [706,708,711].

In der hier zusammengefassten Studie von Skarsgard und Kollegen sollte der Zusammenhang zwischen den IGF-1-Levels des Serums, der fetalen Größe und der Plazentagröße in der späten Schwangerschaft untersucht werden. Die Autoren vermuteten, dass, falls sich ein solcher Zusammenhang bestätigen würde, eine selektive Behandlung eines wachstumsretardierten Fetus mit exogenem IGF-1 zu einer Steigerung des Wachstums führen könnte und sich damit Anhaltspunkte für eine pränatale Therapie der IUGR ergeben könnten [706,708].

In diese Studie wurden jeweils die Feten auf Position drei des rechten Uterushornes (gezählt vom ovariellen Ende), die eine Wachstumsrestriktion aufwiesen, einbezogen. Der entsprechende Fetus der linken Seite des Uterushornes diente, wie zuvor beschrieben, der Kontrolle [708].

1.13.3.1. Transamniotischer Katheter

Durch einen operativen Eingriff wurde der jeweilige Fetus im rechten Uterushorn mittels eines *amniotischen Katheters*⁶⁴², der mit insgesamt 10 mg rhIGF-1⁶⁴³ befüllt wurde, behandelt. Der Kontrollfetus des linksseitigen Uterushornes erhielt einen „Scheinkatheter“ und keine Infusion. Die transamniotische Infusion wurde dann über 7 Tage durchgeführt (mit einer Dosis von 1,440 ng/Tag) [706,708].

1.13.3.2. Katheter über die uterine Arterie

Nach einem entsprechenden operativen Eingriff wurde der rechtsseitig wachstumsretardierte Fetus mittels eines Katheters über die uterine Arterie ebenfalls mit rhIGF-1 behandelt. Auf der entsprechenden Gegenseite wurde derselbe operative Eingriff mit einem Scheinkatheter durchgeführt (Kontrolle). Die Behandlungsperiode erstreckte sich auch hier über 7 Tage [706,708].

Am Gestationstag 29 und 30 wurden die Feten und auch die Plazenten operativ gewonnen und gewogen. Der Zusammenhang zwischen dem fetalen Gewicht, dem Plazentagewicht und den endogenen Levels von IGF-1 wurde in dieser Studie von Skarsgard und Kollegen an den entsprechenden Feten von sechs Mutterhasen zum Gestationstag 29-30 untersucht. Es wurde eine signifikante Korrelation sowohl zwischen dem fetalen Gewicht und den Serumlevels von IGF-1, als auch zwischen dem Plazentagewicht und den Serumlevels von IGF-1 festgestellt. Bezüglich der Gewichte der Feten, der Plazentagewichte und der IGF-1-Levels, im Vergleich von rechtem und linkem Uterushorn, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede [706, 708].

Bei der transamniotischen Katheter-Infusion wurde keine erhöhte Mortalität der behandelten Feten festgestellt. Die Infusion mit rhIGF-1 über sieben Tage war mit einem

⁶⁴¹ Feten mit einer IUGR

⁶⁴² Ein Zugang zum fetalen Fruchtwasser mittels eines Katheters.

⁶⁴³ Rekombinantes humanes IGF-1. *Rekombinante* Proteine sind Eiweiße, die mit Hilfe von gentechnisch veränderten (Mikro-) Organismen hergestellt werden. Seit dem Beginn der Entwicklung der Gentechnik wurde eine Vielzahl bakterieller Organismen, Pilze oder Säugetierzellen für die Herstellung genutzt. Bevorzugte Systeme für eine derartige Produktion sind das Darmbakterium *Escherichia coli*, verschiedene Hefearten und Säugetierzellen, dabei meistens Hamsterzellen (102).

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

signifikanten Anstieg der Serum IGF-1-Levels und der Plazentagewichte der mit IGF-1 infundierten Feten, im Vergleich zu den mit Scheinkatheter behandelten, nicht-infundierten Kontrollfeten, verbunden. Es ließ sich auch ein Trend bezüglich eines Anstieges der fetalen Gewichte der infundierten, im Gegensatz zu den nicht-infundierten Feten, feststellen. Jene Feten, die mittels Katheter über die uterine Gefäß-Arkade behandelt wurden, wiesen allerdings eine sehr hohe Mortalität auf (etwa 76%). Bezüglich der fetalen Gewichte, der Plazentagewichte und der Serumlevels von IGF-1, wurden hier keine Unterschiede der über die uterinen Gefäße infundierten Feten, im Gegensatz zu den nicht-infundierten Feten gefunden [706,708].

Die intrauterine Wachstumsrestriktion stellt ein großes medizinisches Problem dar. Kinder, die unter einer IUGR leiden, zeigen eine höhere Mortalität und ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Hypoglykämie, eines RDS und einer Sepsis. Wie bereits in dieser Einleitung erwähnt, kann in Experimenten eine fetale Wachstumsrestriktion durch eine Deletion der Gene, die IGF-1 oder seinen Rezeptor codieren, ausgelöst werden und eine spontane *IGF-1*-Gendeletion am Menschen führt zu einer IUGR und zu postnataler Wachstumsstörung [682,648,708,712,713].

Eine Korrelation zwischen den Serumlevels von IGF-1 des fetalen Nabelschnurblutes und dem Geburtsgewicht (reduzierte Levels bei Feten mit IUGR und erhöhte Levels bei Feten mit gesteigertem Wachstum) wurde von verschiedenen Forschergruppen beschrieben [709,710].

Eine Studie von Thakur *et al.* untersuchte die Ontogenese einer IUGR an fetalen Hasen und endogen appliziertem IGF-1. In dieser Studie wurden eine reduzierte Expression von gewebespezifischer *Igf-1*-mRNA und geringere Levels von IGF-1 im Serum und in der amniotischen Flüssigkeit von wachstumsretardierten fetalen Hasen im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet. Auch eine Korrelation zwischen den Serum IGF-1-Levels und dem Prozentsatz der Gewichtsveränderung wurde beschrieben.

Diese Daten und die Beobachtung von verstärkter Protein- und Fettanreicherung bei wachstumsretardierten Ferkeln, die mit exogenem IGF-1 behandelt wurden, deuten auf eine Evidenz der Wirksamkeit der antenatalen Behandlung einer IUGR mit IGF-1 hin [682, 714,715].

In der Studie von Skarsgard und Mitarbeitern wurde in einer Gruppe das rhIGF-1 über einen intraamniotischen Katheter und in der anderen Gruppe über eine intrauterine arterielle Infusion über die Gefäß-Arkaden des Uterus verabreicht. In beiden Fällen wurde das rhIGF-1 mittels einer kontinuierlichen Infusion über sieben Tage mit einem Volumen von 0,8 ml/Tag verabreicht [706,708].

Die transamniotische Behandlung mit rhIGF-1 steigerte die Serumlevels von IGF-1 und führte zu einem Anstieg der fetalen Gewichte und der Plazentagewichte in infundierten Feten, im Gegensatz zu den nicht-infundierten Kontrollfeten, die mittels Scheinkatheter behandelt wurden. Die Ergebnisse waren statistisch für die Plazentagewichte und IGF-1-Levels signifikant und auch sehr ähnlich verhielt es sich bezüglich der fetalen Körpergewichte.

Die Diskrepanz des Anstieges der Gewichte zwischen den Plazenten und den Feten in Antwort auf die exogene IGF-1-Infusion, könnte, laut Ansicht der Autoren, viele Gründe haben [706,708].

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Eine Möglichkeit wäre, dass das fetale Gewicht ein Maß für ein metabolisches „Reset“ am Fetus darstellen könnte und eine Umschaltung zum *Anabolismus*⁶⁴⁴ und damit zur Gewebereicherung beschreiben könnte. Auch wäre es für die Autoren denkbar, dass IGF-1 einen größeren direkten Effekt auf die Plazenta ausüben würde und die fetale Antwort damit mehr die verbesserte *plazentare Perfusion*⁶⁴⁵ und Funktion, als direkte Effekte von IGF-1 auf den Fetus widerspiegeln könnte. Außerdem stellt die Plazenta ein essentielles und sehr großes Blutreservoir dar und IGF-1 könnte das Gewicht der Plazenta (disproportional zum fetalen Gewicht) durch eine Zunahme der Kapazität des Blutvolumens der Plazenta durch Vasodilatation steigern.

Auf der anderen Seite gewinnt der Fetus an Gewicht durch eine Zunahme der Gewebemasse und demnach scheint es unpassend zu folgern, dass IGF-1 identische Wachstumseffekte auf die Plazenta und den Fetus ausüben würde [706,708].

Eine Beschränkung in dieser Studie ergab sich durch die Unmöglichkeit der Unterscheidung zwischen dem applizierten humanen rekombinanten IGF-1 und dem endogenen IGF-1 der Hasen. Die Autoren vermuteten, dass die fetalen Serumlevels von IGF-1 durch systemische Absorption des exogen zugeführten Hormons anstiegen (was eine bessere Erklärung darstellte, als jene einer gesteigerten endogenen Produktion) und, dass die menschliche rekombinante Form des Hormons, durch die hohe konservative Sequenz-Homologie zwischen den Spezies, auch eine biologische Wirkung am Hasen entfaltet haben könnte [706,708].

Die hohe Mortalität und das Ausbleiben von Wachstumsvorteilen der überlebenden Feten führten zur Feststellung, dass sich die Therapie mittels einer Katheterisierung der Gefäß-Arkade des Uterus als nicht vorteilhaft erwies [706,708].

Der mögliche Wirkmechanismus der hohen amniotischen Levels von exogenem IGF-1 während der letzten sieben Tage der Schwangerschaft gab in dieser Studie Anlass zu Spekulationen. Radioaktiv markiertes IGF-1 war, nach oraler Verabreichung, bereits innerhalb von einer Stunde im Serum von neugeborenen Schweinen nachweisbar [716].

Es scheint also, als würde das Hormon seine Wirkung systemisch, über die Interaktion mit Bindungsproteinen und Zellrezeptoren, im perfundierten Gewebe entfalten. Die fetalen Lungen stellen eine andere epitheliale Oberfläche dar, über welche exogenes IGF-1 absorbiert werden und so in die Zirkulation übertreten könnte. Das IGF-1 in der Amnionflüssigkeit könnte auch einen direkten Effekt auf die Plazenta ausüben, denn IGF-1-Rezeptoren wurden auch dort nachgewiesen. Die Wirkung von IGF-1 auf die Plazenta beinhaltet, wie es in der Publikation von Sorem *et. al* nachzulesen ist, die Stimulation des Aminosäure-Transfers, die *Trophoblast*⁶⁴⁶-Differenzierung und eine Reduktion der *Thromboxan*⁶⁴⁷-Produktion [706,708,717].

Eine potentielle Konsequenz der hohen Levels von exogenem IGF-1 am Fetus manifestiert sich durch die Effekte auf die endogene IGF-1-Produktion und Sensitivität der Rezeptoren.

⁶⁴⁴ Mit *Anabolismus* („Aufwurf“, griech.) bezeichnet man bei Lebewesen den Aufbau körpereigener Bestandteile. Dabei wird Energie umgewandelt, die bei chemotrophen Organismen aus chemischen, energiefreisetzenden (exergenen) Stoffumsetzungen gewonnen wird (103).

⁶⁴⁵ Durchblutung

⁶⁴⁶ Die zellige Außenwand der *Blastozyste* (Keimblase), die bei der *Nidation* (Einnistung der Befruchteten Eizelle in die Uterusschleimhaut) in das Uterusendometrium eindringt und sich in zwei Schichten, den *Zyto-* und den *Synzytiotrophoblasten*, differenziert (1).

⁶⁴⁷ zyklische Derivate der *Arachidonsäure*. Ein wichtiger Vertreter, *Thromboxan A₂*, bewirkt *Broncho-* und *Vasokonstriktion* (1).

Diese werden während der Phase der exogenen Exposition herab reguliert und könnten damit Einfluss auf die Langzeitkontrolle des fetalen Wachstums nehmen [706,708]. Zusammenfassend zeigte sich in dieser Studie von Skarsgard *et al.* ein Zusammenhang zwischen der Größe der Plazenta, des Fetus und den endogenen Serumlevels von IGF-1. Die transamniotische Verabreichung von exogenem rhIGF-1 erhöhte die Körpergewichte der Feten und der Plazenta bei wachstumsretardierten Feten, wobei die Gewichte der Plazenten sogar signifikant gesteigert wurden. Nach Meinung der Autoren, könnte die antenatale Behandlungsstrategie der IUGR, basierend auf der Wirkung von IGF-1, vielversprechend aussehen [706,708].

1.13.4. Wirkung einer Applikation von IGF an fetale Rhesusaffen (*Macaca mulatta*)

An den Feten von Säugetieren zeigt sich während der Schwangerschaft ein Anstieg der zirkulierenden IGF-1-Konzentrationen, wenn auch die Levels des freien zirkulierenden IGF aufgrund der Wirkung der *IGFBPs*⁶⁴⁸ niedrig gehalten wurden. Die *IGFBPs* haben eine hohe und sehr spezifische Affinität für IGF. Bisher sind sieben verschiedene *IGFBPs* identifiziert worden, die die Bioverfügbarkeit und die biologische Aktivität von IGF-1 und IGF-2 beeinflussen. Im Serum ist das *IGFBP-3* das prädominierende Bindungsprotein, kommt in zellgebundener und gelöster Form vor und übt eine hemmende oder potenzierende Wirkung aus [718-722].

Zusätzlich zur entwicklungsbedingten Regulation und Modulation durch die *IGFBPs* werden die IGF-Peptide durch den Einfluss der Nahrung reguliert und sie selbst beeinflussen die Verteilung der Versorgung mit Nährstoffen.

Studien am Menschen und am Tiermodell zeigten, dass die Verabreichung von IGF-1 während *kataboler Stadien*⁶⁴⁹ eine potenzielle Therapie für die Verbesserung des Gewebewachstums und des Gewichtszuwachses darstellte und dem Gewichtsverlust vorbeugte [723-727].

Ähnliche Veränderungen wurden auch an Feten beobachtet, die unter einer IUGR litten. Demzufolge könnte die Therapie mit IGF-1 eine vielversprechende Methode zur Umkehrung der Wachstumsrestriktion *in utero*, wie es auch an den bereits erwähnten Studien mit fetalen Schafen demonstriert wurde [646], darstellen. In diesen Studien zeigten sich rasche anabole und anti-katabole Effekte auf den fetalen Protein- und Kohlenhydrat-Metabolismus nach kurzzeitigen IGF-1-Infusionen [706].

In der hier zusammengefassten Studie von Tarantal *et al.* wurde IGF-1 (in einer Dosis von 80 µg/kg) *intraperitoneal*⁶⁵⁰ an gesunde Feten von Rhesusaffen, zwischen den *Gestationstagen (GD)* 110-120 und 130-140 (drittes Trimester), verabreicht. Die Schwangerschaften wurden sonographisch überwacht und fetalen und maternalen Blutproben wurden für die Analyse der Blutzellen, die biochemischen Analysen und die Immunphänotypisierung gewonnen. Die Gewinnung der Blutproben, die externe Vermessung der Feten und der Neugeborenen und die Ermittlung der Gewebe- und Organengewichte, wurden mittels einer fetalen *Nekropsie*⁶⁵¹ (GD 150) oder zum Geburtszeitpunkt (GD 160) durchgeführt [718].

⁶⁴⁸ *Insulin-like growth factor binding proteins*

⁶⁴⁹ Abbau-Stoffwechsel

⁶⁵⁰ in die Bauchhöhle

⁶⁵¹ *Sektion* von Tieren

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Der Affe stellt, wie von den Autoren beschrieben, ein exzellentes Tiermodell zur Untersuchung der Effekte von intrauterin verabreichtem IGF-1 dar, weil sich viele physiologische und entwicklungsbedingte Ähnlichkeiten im Vergleich zur menschlichen Entwicklung gezeigt haben.

Diese Ähnlichkeiten beziehen sich auf die Rate der Entwicklungsstadien, die Struktur der Plazenta, Wachstumscharakteristika und die IGF-Achse [718,728-731].

1.13.4.1. Fetales Wachstum *in utero*

Das fetale Wachstum wurde von Tarantal *et al.* durch die standardisierte Vermessung des Kopfes, Abdomens und der Extremitäten ermittelt. Die ermittelten Parameter vor, während und nach der Behandlung zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zwischen den IGF-1-behandelten Feten und den Feten der Kontrollgruppe. Die *BPDs*⁶⁵², die bei den Kontrollfeten während des frühen dritten Trimesters rasch anstiegen, zeigten vergleichbare Werte in der Gruppe der IGF-1-behandelten Feten. Die Reduktion der Beschleunigung des Schädelwachstums während der späteren Stadien des dritten Trimesters war zwischen den IGF-1-behandelten und den Kontroll-Feten vergleichbar.

Auch die fetalen Femurlängen⁶⁵³ waren in den verschiedenen Gruppen von einem gleichen Wachstumsmuster geprägt, wenngleich sich auch unter den IGF-1-behandelten Feten ein vorübergehender Anstieg zum Gestationszeitpunkt GD 140 im Vergleich zur Kontrollgruppe manifestierte. Die restlichen Parameter, wie das Volumen der Amnionflüssigkeit, die Entwicklung der Plazenta, des Skelettes und der Organe, zeigten keinerlei Unterschiede im Vergleich der IGF-1-behandelten mit der nicht-behandelten Gruppe [718].

1.13.4.2. Hämatologie und Immunologie

Die Analyse der fetalen Blutzellen zeigte signifikante Unterschiede der weißen und roten Blutzellen der IGF-1-behandelten Feten im Vergleich zur nicht-behandelten Kontrollgruppe. Die Gesamtzahl der weißen Blutzellen steigt typischerweise bei fetalen Affen während des dritten Trimesters an und die *Neutrophilen*⁶⁵⁴, sowie die *Lymphozyten* dominieren dabei. Dies entspricht den Beobachtungen am menschlichen Fetus [718,730,732,733].

Die Feten, die in dieser Studie mit IGF-1 behandelt wurden, zeigten einen Anstieg der weißen Blutzellen am Ende der ersten Periode der zehntägigen Behandlung, was sich an einer gesteigerten Zahl der zirkulierenden Lymphozyten belegen ließ. Während der gleichen Periode zeigte sich auch ein leichter Anstieg der fetalen Neutrophilen. Alle Werte kehrten zum Zeitpunkt GD 130 auf das Ausgangsniveau zurück (zehn Tage nach der ersten zehntägigen Behandlungsphase). Ein signifikanter Anstieg der Zahl der Lymphozyten trat am Gestationstag 150, zehn Tage nach der letzten intraperitonealen IGF-1-Injektion auf. Ein Anstieg der Zahl der Monozyten und der Eosinophilen wurde zu diesem Zeitpunkt ebenfalls beobachtet [718].

Außerdem hatte die fetale Verabreichung von IGF-1 signifikante Effekte auf die Parameter des roten Blutbilds zu den gleichen Schwangerschaftszeitpunkten. Im Vergleich der behandelten zu den nicht-behandelten Feten, zeigten sich an den Schwangerschaftstagen 110, 120 oder 130 keine Unterschiede, aber erhöhte Spiegel der *Erythrozyten*⁶⁵⁵ und des

⁶⁵² *biparietaler Durchmesser* des Kopfes

⁶⁵³ Längen der Oberschenkelknochen

⁶⁵⁴ neutrophile Granulozyten

⁶⁵⁵ rote Blutkörperchen

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Hämoglobins⁶⁵⁶, des Hämatokrits⁶⁵⁷, der Thrombozyten⁶⁵⁸ und der Retikulozyten⁶⁵⁹ wurden zum Zeitpunkt des GD 150 verzeichnet. In der peripheren Zirkulation gab es Anzeichen für eine verstärkte *hepatische Erythropoese*⁶⁶⁰, da in der fetalen Leber normalerweise in diesem fortgeschrittenen Entwicklungsstadium, wenn das Knochenmark seine primäre *hämatopoetische Rolle*⁶⁶¹ aufgenommen hat, keine erythropoetischen Inseln beobachtet werden [718,730].

An den mütterlichen Blutzellen wurden keine Veränderungen nach fetaler Administration von IGF-1 beobachtet.

Das Verhältnis von CD4- zu CD8-T-Zellen⁶⁶² war bei den IGF-1-behandelten Feten während und nach den beiden Behandlungsperioden unverändert, wenn man es mit jenem der Feten der Kontrollgruppe verglich [718]. Allerdings war die Anzahl der *B-Zellen*⁶⁶³ am GD 150 erhöht. In gleicher Weise zeigte sich auch bezüglich der *CD4/CD8-Ratio* der meisten fetalen Gewebe (Leber, Milz, Thymus und Knochenmark) kein Unterschied zwischen den Gruppen.

Allerdings fiel zu diesem Zeitpunkt ein Anstieg der *CD4/CD8-Ratio* in allen fetalen Lymphknoten auf (*inguinal*⁶⁶⁴, *axillär*⁶⁶⁵ und *mesenterisch*⁶⁶⁶). Die Feten, die mit IGF-1 behandelt wurden, zeigten in den Lymphknoten *CD4/CD8-Rationes*, die etwa zwei- bis dreimal so hoch waren, wie jene der Kontrollgruppe.

Diese Beobachtungen korrelieren mit der Tatsache, dass alle Lymphknoten der Feten vergrößert waren und eine gesteigerte Dichte der kortikalen Lymphozyten aufwiesen [718].

1.13.4.3. Einfluss von IGF-1 auf die fetalen Glukosespiegel

Da eine exogene Zufuhr von IGF-1 zu einer *Hypoglykämie*⁶⁶⁷ führen kann, wurden von Tarantal und Kollegen in dieser Studie auch die fetalen und maternalen Glukosespiegel während und nach der Behandlung kontrolliert und überwacht. Insgesamt zeigte sich keine Abweichung der fetalen oder maternalen Glukosespiegel nach der direkten fetalen Verabreichung von IGF-1. Die fetalen Glukosespiegel blieben zwischen den GDs 110-150 relativ konstant und bewegten sich innerhalb der Werte zwischen 34-45 mg/dl. Zum Zeitpunkt der Geburt erreichen die Glukosespiegel normalerweise Werte um 60 mg/dl. Die Glukosewerte der IGF-1-behandelten Feten zeigten einen vorübergehenden, nicht signifikanten Abfall am GD 140, mit einem erneuten Anstieg auf Werte der Kontrollgruppe am GD 150. Es ergab sich also keine Evidenz für eine, durch die Behandlung mit IGF-1 verursachte, fetale Hypoglykämie [718].

⁶⁵⁶ roter Blutfarbstoff der Erythrozyten (1)

⁶⁵⁷ Anteil der Blutzellen am gesamten Blutvolumen (1)

⁶⁵⁸ Blutplättchen

⁶⁵⁹ *Retikulozyten* sind junge Erythrozyten, die in der Entwicklung zwischen den *Normoblasten* und den reifen Erythrozyten stehen (1).

⁶⁶⁰ in der Leber erfolgende Bildung der Erythrozyten

⁶⁶¹ Rolle bei der Blutzellbildung

⁶⁶² *CD4/CD8-Ratio*: Verhältnis der *CD4-* zu den *CD8-T-Lymphozyten*

⁶⁶³ *B-Lymphozyten*

⁶⁶⁴ in der Leiste

⁶⁶⁵ in der Achselhöhle

⁶⁶⁶ im Dünndarmgekröse

⁶⁶⁷ Abfall des Blutzuckerspiegels (1)

1.13.4.4. Unterscheidung zwischen endogenem und exogenem IGF-1

Das *exogen*⁶⁶⁸ zugeführte IGF-1 konnte mit aktuellen Methoden nicht vom *endogenen*⁶⁶⁹ IGF-1 unterschieden werden. Darum wurde in dieser Studie das gesamte zirkulierende IGF-1 mittels des RIA⁶⁷⁰ gemessen.

In der Literatur wird beschrieben, dass die Konzentrationen des IGF-1 des Serums vom GD 100 bis zum GD 150 anstiegen und dann bis zum Zeitpunkt der Geburt relativ konstant blieben [718,728].

Nach der Administration von IGF-1 zeigte sich in dieser Studie ein dramatischer Anstieg der zirkulierenden Konzentrationen der behandelten Feten. Die fetalen Blutproben, die 20 Minuten nach der Administration von IGF-1 entnommen wurden, zeigten einen schnellen Anstieg des zirkulierenden IGF-1 von 80 auf annähernd 1015 ng/ml. Eine Rückkehr auf Basislevels wurde erst am GD 150, zehn Tage nach der letzten *in utero*-Applikation, verzeichnet [718,728]. Zu beachten ist hierbei, dass die Konzentrationen von IGF-2 von der Verabreichung des IGF-1 nicht beeinflusst wurden, auch nicht zu den Zeitpunkten der IGF-1-Peaks im Serum. Auch an den mütterlichen IGF-1 und IGF-2-Levels wurden während der Schwangerschaft, und auch nach sofortiger Messung nach der fetalen Administration, keine Effekte beobachtet [718].

1.13.4.5. Die Wirkung des IGFBP-3

Da IGFBP-3 der hauptsächliche Carrier⁶⁷¹ für IGF-1 im Serum ist, könnte die Unmöglichkeit der Erhaltung der erhöhten Serumlevels von IGF-1, die sich in der Studie von Tarantal *et al.* nach seiner exogenen Verabreichung beobachten ließ, auf die zirkulierenden Levels von IGFBP-3 zurückzuführen sein.

In normalen Untersuchungen des menschlichen Serums mittels des Western-Blots⁶⁷², zeigte sich eine 45/40-kDa-Doublette⁶⁷³ für IGFBP-3 mit kleineren IGFBPs bei 34, 29 und 24 kDa.

Im Gegensatz dazu, zeigte das Serum von fetalen Affen nur eine schwache Doublette für 45/40 kDa, die IGFBP-3 repräsentierte und ein prädominantes 29-kDa-IGFBP, das IGFBP-1⁶⁷⁴ repräsentiert haben könnte. Während des Fortschreitens der Schwangerschaft stieg die Intensität der 45/40-kDa-Doublette für IGFBP-3 an. Nachdem bei IGF-1-Administration keine Effekte auf IGFBP-3 beobachtet wurden, fiel allerdings auf, dass das 29-kDa-IGFBP durch IGF-1 beeinflusst wurde, was anhand der Analyse der Samples, 20 Minuten nach der IGF-1-Administration, bewiesen werden konnte. In historischen Berichten wurde anhand des RIA ein moderater Anstieg der Serum-IGFBP-3-Levels während des zweiten und dritten Trimesters beschrieben [718,728]. Im Gegensatz zu jenen von IGF-1, waren die Levels von IGFBP-3 während der IGF-1-Administration relativ konstant und lagen innerhalb der doppelten SD⁶⁷⁵ der altersbezogenen Kontrollwerte.

Die Ergebnisse des Western-Blots und des RIA bestätigten, dass IGFBP-3 die Serum-IGF-1-Konzentrationen widerspiegelte, was sich durch den Mangel des Anstiegs der IGFBP-

⁶⁶⁸ von außen

⁶⁶⁹ im Organismus produziert

⁶⁷⁰ Der *Radioimmunoassay* ist eine empfindliche und spezifische Methode für den *in vitro*-Nachweis von *Antigen-Antikörper-Reaktionen* für die Bestimmung antigener Substanzen unter Verwendung *radioaktiv markierter spezifischer Antikörper* (1).

⁶⁷¹ Transporter

⁶⁷² Der *Western-Blot* ist eine Methode zum differentiellen Nachweis von Proteinen nach *elektrophoretischer Auftrennung*, Transfer auf Membranen und spezifischer *Antigen-Antikörper-Reaktion* (1).

⁶⁷³ doppelte Bande

⁶⁷⁴ *Insulin-like growth factor binding protein-I*

⁶⁷⁵ *Standard Deviation* (engl.): Standardabweichung

Kapazität manifestierte und die Unmöglichkeit der Aufrechterhaltung der exogen erzeugten, hohen Serum-Konzentration von IGF-1 nach seiner Applikation erklärten könnte (siehe Folgeseite) [718].

1.13.4.6. Fetale Evaluierung

Zwischen den gemessenen Daten der Körpergewichte ergaben sich in dieser Untersuchung von Tarantal *et al.* keine signifikanten Unterschiede zwischen der IGF-1- und der Kontrollgruppe. Es zeigte sich allerdings ein nicht signifikanter Anstieg des Gewichts des *Thymus*⁶⁷⁶, der Milz und der Nieren und ein statistisch signifikanter Anstieg der Länge des Dünndarms. Nach der Administration von IGF-1 wurden keine Unterschiede der externen Messungen an den Feten oder der Plazentagewichte verzeichnet [718].

Alle beobachteten *Apgar-Scores*⁶⁷⁷ der IGF-1-behandelten neugeborenen Affen waren innerhalb des normalen Bereiches und es gab keinerlei Anzeichen für eine Beeinträchtigung durch die IGF-1-Behandlung *in utero* [731]. Alle Affen blieben während der postnatalen Phase gesund und prägten ein normales Wachstumsmuster während der folgenden viermonatigen Beobachtungsphase aus [718].

Die Resultate dieser Analysen von Tarantal und Mitarbeitern brachten keine Evidenz für die Entstehung einer *Hypoglykämie* der Feten oder Ihrer Mütter während der Behandlung auf. Die zirkulierenden Konzentrationen des fetalen, aber nicht des mütterlichen IGF-1, stiegen während der Behandlung von 80 auf 1015 ng/ml und es zeigten sich keine Anzeichen für eine Veränderung der Konzentrationen von IGF-2 im Serum, sowie auch kein Anstieg des IGFBP-3 im Vergleich zur Kontrollgruppe [718].

Die Verabreichung von IGF-1 (80 µg/kg) hat sich als sichere Maßnahme erwiesen und in dieser Studie zu einem vorübergehenden Anstieg der fetalen Levels von IGF-1, einem signifikanten Effekt auf die fetalen hämatopoetischen und lymphatischen Gewebe und einem selektiven Anstieg der fetalen Organengewichte geführt [718].

Diese Resultate am Affenmodell sind mit den Ergebnissen, die von Untersuchungen an fetalen Schafen stammen, vergleichbar, in welchen IGF-1 als Dauerinfusion im dritten Trimester verabreicht wurde und zu einem Anstieg des IGF-1-Spiegels im Serum und der Organengewichte der Leber, der Lunge, des Herzens, der Nieren, der Nebennieren und der Hypophyse führte [718,734].

Wie auch in humanen Studien von Gargosky und Mitarbeitern bereits beschrieben [735], führte die Verabreichung von IGF-1 zu keinem Anstieg der zirkulierenden IGF-BPs, im Speziellen zu keinem Anstieg des IGFBP-3.

IGFBP-3 spiegelt die zirkulierenden Konzentrationen von IGF-1 wieder, indem es dieses Peptid stabilisiert und seine endokrine Speicherung unterhält. Die Unmöglichkeit von exogen appliziertem IGF-1, seine zirkulierenden Konzentrationen nach der Applikation aufrecht zu erhalten, deckte sich mit der Tatsache, dass exogen zugeführtes IGF-1 zu keinem Anstieg der zirkulierenden IGFBP-3-Levels führte. So hat die klinische Verabreichung von exogenem IGF-1 sofortige und kurze Effekte und damit lässt sich, den Ausführungen der Autoren folgend, das Risiko der Entstehung einer Hypoglykämie reduzieren [718,718].

⁶⁷⁶ hinter dem *Sternum* (Brustbein) gelegenes, *lymphoepitheliales* Organ (1)

⁶⁷⁷ Punkteschema zur Beurteilung des Zustandes des Neugeborenen nach der Geburt. Abkürzung für Atmung, Puls, Grundtonus, Aussehen, Reflexe (1).

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Die Effekte von IGF-1 auf die *Hämatopoese*⁶⁷⁸ [736,737] und das Immunsystem [738,739] wurden in anderen Publikationen detailliert beschrieben. IGF-1 zeigt demnach trophische Effekte auf die Entwicklung der hämatopoetischen Zellen und übt seine mitogene Wirkung über den *IGF-1R* aus [737,738]. Der IGF-1R wurde auf immunkompetenten Zellen nachgewiesen und agiert als *auto-* und *parakriner* Faktor des Immunsystems [718,738]. Weiters zeigte IGF-1 in dieser Studie, wie oben bereits erwähnt, einen verstärkenden Effekt auf die Reifung der roten Blutzellen, einen unterstützenden Effekt auf deren Proliferation, es inhibierte die Apoptose und stimulierte die *Häm-Synthese*⁶⁷⁹. Stuart *et al.* beschrieben in einer Studie, dass 97% der *Monozyten*⁶⁸⁰ und 88% der B-Lymphozyten einen IGF-1R besitzen, wo hingegen nur 2% der T-Lymphozyten einen solchen exprimieren. Weitere Studien haben auch von einer Stimulation der *Lymphopoese*⁶⁸¹ *in vitro* und *in vivo* berichtet [740-743].

Clark *et al.* [740] zeigten in ihrer Studie, dass die chronische Verabreichung von 100 µg des rhIGF-1 für sieben Tage an adulte Mäuse die Lymphozytenzahl im Thymus, in den Lymphknoten und in der Milz steigerte. Der Anstieg der Gewichte des Thymus und der Milz wurden auf die steigende Zahl der Lymphozyten-Population in diesen Organen zurückgeführt [722].

Tarantal *et al.* demonstrierten an fetalen Affen, dass die exogene Administration von IGF-1 unter *in vivo*-Bedingungen die fetale Hämatopoese, mit einer vorwiegenden Wirkung auf die Lymphozyten und Erythrozyten, beeinflusste. Bisher ist es allerdings unklar, ob diese Effekte auf eine verstärkte zelluläre Proliferation oder Reifung, oder auf eine reduzierte Apoptose und demzufolge eine Verstärkung des Zellüberlebens zurückzuführen sind [718]. Es zeichnete sich ein wichtiger Effekt der Rolle der IGF-Achse in der Entwicklung und Erhaltung des Immunsystems ab. Dies wurde durch Beobachtungen von Frost *et al.* bestätigt, die an Kindern gemacht wurden, die mit dem *HI-Virus*⁶⁸² infiziert waren. Diese zeigten Abnormalitäten bezüglich des Wachstums und Gedeihstörungen [722,744].

Ähnliche Aspekte konnten Forscher in einem Tiermodell, in welchem fetale Affen mit dem *Simian-Immunodeficiency-Virus*⁶⁸³ infiziert wurden, beschreiben und es war dort eine signifikante IUGR zu beobachten [745].

Bei fetalen Affen führte die intermittierende Verabreichung von IGF-1 zu einer signifikanten Wirkung auf das fetale Organwachstum, wenn auch keine Effekte bezüglich der Veränderung des Körpergewichtes auftraten. Auch diese Beobachtungen decken sich mit jenen, die von Lok und Mitarbeitern an fetalen Schafen mit chronischer IGF-1-Infusionsbehandlung gemacht wurden. Die Effekte auf die Organe könnten hierbei, laut Vermutung der Autoren, durch eine direkte Wirkung des IGF-1 auf den IGF-1R, oder durch *synergistische*⁶⁸⁴ Effekte mit anderen wachstumsfördernden Faktoren ausgeübt worden sein [722,734].

⁶⁷⁸ Die *Hämatopoese* ist die Bildung der Zellen des Bluts (Blutkörperchen) aus blutzellbildenden Stammzellen und wird daher auch als *Blutbildung* bezeichnet (104).

⁶⁷⁹ Sie dient dem Aufbau des roten Blutfarbstoffs *Häm* (1).

⁶⁸⁰ Monozyten sind im Blut zirkulierende Zellen des Immunsystems und die Vorläufer der u. a. in den Geweben lokalisierten *Makrophagen*, sowie eines Teils der *Dendritischen Zellen* (105).

⁶⁸¹ Bildung der Lymphozyten

⁶⁸² Das *Human Immunodeficiency Virus* ist ein *Retrovirus*, das bei der Entstehung der Erkrankung AIDS eine Rolle spielt (1).

⁶⁸³ Das *Simiane Immundefizienz-Virus* (SIV) ist ein *Retrovirus* und gilt als Ursprungsvirus für das menschliche Immunschwächevirus HIV. SIV beschreibt eine ganze Gruppe verschiedener Viren, die aus dem Blut verschiedener Affenarten isoliert wurden (106).

⁶⁸⁴ zusammenwirkende

An infektiösen und nicht-infektiösen Modellen der IUGR an Affen wurden Veränderungen der IGF-Achse beschrieben. Diese Modelle zeigten ähnliche Effekte auf das fetale neonatale Wachstum sowie die IGF-Achse und deuteten darauf hin, dass Mechanismen, die das Wachstum einschränken, hier involviert sein könnten [718]. Wegen der Komplexität der wachstumsregulierenden Mechanismen und der Notwendigkeit, neue therapeutische Interventionen zu testen, sind Tiermodelle notwendig, die spezifische Fragen beantworten und am Menschen aus ethischen Gründen nicht durchgeführt werden können. Aufgrund seiner großen Ähnlichkeit zur menschlichen prä- und postnatalen Entwicklung, zum Wachstumsmuster, zur Hämatopoese und zur biochemischen und molekularen IGF-Achse, stellt das Affenmodell offenbar eine gute Wahl für wissenschaftliche Studien dar.

Die Verabreichung von IGF-1 scheint, den Ergebnissen von Tarantal und Kollegen folgend, eine effektive Methode zur Verbesserung des fetalen Wachstums und der Gesundheit *in utero* zu sein [718,728,730,731].

Der Anstieg von freiem IGF-1, in Abwesenheit von erhöhten IGFBP-3-Spiegeln, könnte sich, laut Tarantal, als vorteilhaft für den wachstumsbeeinträchtigten Fetus herausstellen, weil dadurch eine höhere Bioverfügbarkeit von IGF für die essentiellen Gewebe während der kritischen Phase der Entwicklung zustande kommen könnte.

Auch Feten, die bezüglich der Hämatopoese und des Immunsystems Beeinträchtigungen zeigen, könnten aufgrund der Wirkung von IGF-1 von dieser intrauterinen Behandlung profitieren [718].

1.13.5. IGF-1 verbessert die Wachstumsrate von fetalen Schafen

IGF-1 ist ein wichtiger Regulator des fetalen Wachstums und die zirkulierenden IGF-1-Konzentrationen sind, wie bereits bekannt, an Feten, die unter einer IUGR leiden, reduziert. In der hier angeführte Studie untersuchten Eremia *et al.*, ob eine von drei verschiedenen Methoden der fetalen IGF-1-Verabreichung die IUGR bei fetalen Schafen zu reduzieren vermochte [746].

Die Tiere dieser Studie wurden in fünf Gruppen aufgeteilt:

eine *unbehandelte Kontrollgruppe*, eine Gruppe mit IUGR und Applikation von *Kochsalzlösung (SAL)*, eine Gruppe mit IUGR und *i.v. Applikation* von IGF-1 (IGF-IV), eine Gruppe mit IUGR und *intraamniotischer Applikation* von IGF-1 (IGF-AF) und eine Gruppe mit IUGR und *intraamniotischer Applikation* von IGF-1 und *Nährstoffen* (IGF-NUT). Die wöchentliche Dosis von IGF-1 betrug 360 µg in jeder der behandelten Gruppen [746].

Die IUGR der fetalen Schafe wurde in dieser Studie durch eine *Embolisation*⁶⁸⁵ der Plazenta, an den Schwangerschaftstagen 93 und 99 erzeugt. Dazu wurden die maternalen Arterien des Uterus zweimal täglich mit *Polystyrol-Mikrosphären*⁶⁸⁶ (20-50 µm Durchmesser) embolisiert und dadurch eine eingeschränkte fetale Blutversorgung hervorgerufen. Die Embolisation verursachte eine asymmetrische IUGR mit reduzierter

⁶⁸⁵ Die therapeutische *Embolisation* ist der künstliche Verschluss von Blutgefäßen durch Verabreichung von z. B. flüssigen Kunststoffen, Kunststoffkügelchen oder Fibrinschwämmen über einen Katheter (107).

⁶⁸⁶ kleine, kugelförmige Molekülaggregate aus Polystyrol, einem transparenten *amorphem* oder *teilkristallinen* Thermoplasten (auch *Plastomer* genannt. Plastomere sind Kunststoffe, die sich in einem bestimmten Temperaturbereich verformen lassen) (108).

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

fetaler Wachstumsrate und reduzierten fetalen Körper- und Organgewichten, steigerte aber die *Gehirngewicht zu Lebergewicht-Ratio* (post mortem) [746].

Die embolisierten Feten zeigten eine *Hypoxämie*⁶⁸⁷ und *Hypoglykämie* und reduzierte zirkulierende Konzentrationen von IGF-1 und *Insulin*. In den Behandlungsgruppen IGF-AF und IGF-IV zeigte sich eine signifikante Steigerung der fetalen Wachstumsraten, aber **nur die IGF-AF-Applikation** steigerte das fetale Lebergewicht signifikant, verglichen mit den Feten, die mit Kochsalzlösung behandelt wurden (*SAL*) [746].

Die fetalen Körpergewichte und die *Gehirngewicht zu Lebergewicht-Rationes* lagen bei allen Feten, die mit IGF-1 behandelt wurden, zwischen jenen der Kontroll- und *SAL*-Gruppe. Die Verabreichung von Nährstoffen reduzierte die Effekte von amniotisch verabreichtem IGF-1 und steigerte die Konzentrationen von fetalem Hämoglobin und *Laktat*⁶⁸⁸. Die Behandlung veränderte die fetalen Plasmakonzentrationen von Insulin und IGF-1 nicht [746].

Diese Studie von Eremia *et al.* war die Erste, die von einer intrauterinen Behandlung einer IUGR berichtete, die die fetale Wachstumsrate signifikant steigerte [746].

Die IUGR ist, wie bereits beschrieben, eine Hauptursache von perinataler Mortalität und Morbidität. Viele Kinder, die unter einer IUGR leiden, zeigen in der Kindheit ein verringertes Wachstum und haben ein höheres Risiko für die Ausprägung von Entwicklungsstörungen und kognitiven Problemen. Sie weisen auch ein höheres Risiko auf, einen *Typ II-Diabetes mellitus*⁶⁸⁹, eine *Hypertension*⁶⁹⁰ und eine Herzerkrankungen zu entwickeln [746-749].

Bei fetalen Schafen konnte die Entwicklung einer IUGR durch intravenösen oder *intra gastrischen*⁶⁹¹ Nährstoffersatz verhindert werden. Allerdings wurde bis jetzt von keiner kompletten Reversibilität einer bereits etablierten IUGR berichtet [746,750].

Das Wachstum des Fetus in der späten Schwangerschaft wird hauptsächlich durch endokrine Faktoren und durch die Ernährung reguliert. Der endokrine Faktor, der die wichtigste Rolle dabei spielt, ist IGF-1. Er stimuliert die fetale und plazentare Nährstoffaufnahme und verhindert den Abbau von Proteinen [706]. Das Geburtsgewicht korreliert mit den IGF-1-Levels des Blutes aus der Nabelschnur und die zirkulierenden fetalen IGF-1-Levels waren bei Analysen der menschlicher IUGR reduziert [751-754]. Außerdem führte die Deletion des *IGF-1*-Gens in Studien zu schwerer Wachstumsrestriktion an der Maus und am Menschen [755,756].

Die Regulation von IGF-1 ist sehr eng mit der Ernährung verknüpft. Am Schafmodell verursachte die Unterernährung des Muttertiers eine Wachstumsrestriktion des Fetus, die mit reduzierten fetalen IGF-1-Levels einherging [757]. Dieser Effekt konnte durch die Verabreichung von Glukose aufgehoben werden [758].

Auch eine fetale *Pankreatektomie*⁶⁹² reduzierte die fetalen IGF-1-Spiegel [759] und die Infusion von fetalem Insulin hob sie wieder an [758]. Dies deutete laut der Interpretation von Eremia darauf hin, dass das fetale Wachstum in der späten Schwangerschaft eng mit der *Glukose-Insulin-IGF-1-Achse* zusammenhängen könnte [746].

⁶⁸⁷ Erniedrigung des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks (1)

⁶⁸⁸ Das *Laktat* ist das Salz der Milchsäure und Produkt der *anaeroben Glykolyse*, das bei Muskelarbeit und Zuständen mit *Hypoxie* ansteigt (1).

⁶⁸⁹ *NIDDM (non-insulin-dependent diabetes mellitus)*, insulinunabhängiger Diabetes mellitus (1)

⁶⁹⁰ Bluthochdruck

⁶⁹¹ in den Magen verabreicht

⁶⁹² operative Entfernung des Pankreas (Bauchspeicheldrüse)

Die meisten Fälle von IUGR werden von plazentaren Faktoren, die zu einer fetalen Minderversorgung mit Nährstoffen führen, hervorgerufen. Deshalb ist es wenig überraschend, dass die Versuche, das Wachstum von Feten mit einer IUGR durch Optimierung der mütterlichen Ernährung zu verbessern, wenig Erfolg zeigten. Eine intrauterine Behandlung der IUGR, unter Umgehung der Plazenta, könnte somit bessere Chancen auf Erfolg zeigen [746,760,761]. Einer dieser *paraplazentaren Wege* führt über die Amnionflüssigkeit.

Wie bereits früher beschrieben, verschluckt der Fetus große Mengen von Fruchtwasser und macht sich die hiermit aufgenommenen Nährstoffe und Wachstumsfaktoren zu Nutze. Eine Ligatur⁶⁹³ des Ösophagus an fetalen Schafen, die die Aufnahme von amniotischer Flüssigkeit verhinderte, führte zur Entstehung einer IUGR und diese konnte durch die enterale Verabreichung von IGF-1 aufgehoben werden. Auch eine enterale Verabreichung von Nährstoffen während einer maternalen Nahrungsrestriktion beugte der Entstehung einer IUGR am Fetus vor und niedrig dosierter, intraamniotischer IGF-1-Ersatz hob die Effekte der IUGR am fetalen Darm auf [746,762-766].

In der vorliegenden Studie von Eremia *et al.*, sowie auch in anderen Studien, zeigte sich, dass die intravenöse Behandlung auch erfolgreich zur Beeinflussung des fetalen Wachstums verwendet werden konnte. Ein chronischer intravenöser Ersatz von Nährstoffen verhinderte die Entstehung einer Wachstumsrestriktion an fetalen Schafen während einer Embolisation der Plazenta [765]. Eine chronische, hochdosierte intravenöse Infusion von IGF-1 an normal gewachsenen fetalen Schafen, führte in der späten Schwangerschaft zu selektivem Organwachstum ohne das fetale Gewicht zu verändern, wie in der Publikation von Lok *et al.* nachzulesen ist [734]. Eine IGF-1-Infusion in niedriger Dosierung veränderte das fetale Wachstum oder den Metabolismus nicht, obwohl die Morphologie der Plazenta und die Transportkapazität davon beeinflusst wurden [767]. Diese experimentellen Daten suggerieren, dass eine IUGR durch einen Hormon- oder Nahrungsmitteleratz über den *paraplazentaren Weg* umkehrbar sein könnte [746].

Zusammengefasst haben Eremia *et al.* in ihrer Studie folgende Beobachtungen gemacht: bezüglich des Überlebens der Feten in den verschiedenen Behandlungsgruppen zeigten sich in dieser Studie keine Unterschiede.

Die Embolisierung verringerte die fetale Wachstumsrate um 22-30%, gemessen am Brustumfang im Vergleich zur Kontrollgruppe, und reduzierte das fetale Gewicht in der SAL-Gruppe (post mortem) um den gleichen Betrag.

Die *Scheitel-Steiß-Länge* (SSL) war um 10% verringert, aber der biparietale Durchmesser, der totale Brust- und Bauchumfang und die Länge der Extremitäten waren nicht signifikant verändert. Das Gewicht der fetalen Leber, des Herzens, der Hypophyse, der Schilddrüse und des *perirenal Fettgewebes*⁶⁹⁴ waren in absoluten Werten reduziert, aber nicht in relativem Verhältnis zum Körpergewicht.

Das Verhältnis des Gehirngewichtes zum Lebergewicht⁶⁹⁵ war gesteigert. Die Embolisierung beeinflusste das Gewicht des Uterus, der fetalen Membranen, der fetalen Flüssigkeiten oder der Plazenta nicht signifikant. Es zeigte sich auch kein Unterschied hinsichtlich des Verhältnisses des Plazentagewichtes zum Körpergewicht [746].

⁶⁹³ operative Unterbindung

⁶⁹⁴ das die Nieren umgebende Fettgewebe

⁶⁹⁵ *Brain-to-liver weight ratio* (engl.), *BLWR*

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Während der Behandlungsphase war der fetale Brustumfang in der SAL-Gruppe um 12% geringer, als in der Kontrollgruppe. Der Brustumfang stieg in der IGF-IV- und IGF-AV-Gruppe an und war signifikant höher, als jener der SAL-Gruppe und blieb auch in der IGF-NUT-Gruppe geringer. Die fetalen Gewichte in allen Gruppen, die mit IGF-1 behandelt wurden, lagen zwischen jenen der SAL- und jenen der Kontrollgruppe und waren untereinander nicht signifikant unterschiedlich. Die SSL blieb nur in der IGF-IV-Gruppe niedriger.

Es zeigten sich keine Unterschiede bezüglich des biparietalen Durchmessers, des Brustumfangs, des Bauchumfangs und der Länge der Vorder- und Hinterbeine zwischen den Gruppen [746].

Trotz des Anstiegs des fetalen Wachstums und der partiellen Korrektur des fetalen Gewichtes in allen mit IGF-1 behandelten Gruppen, beschrieben Eremia und Kollegen die Effekte auf die Organgewichte als sehr unterschiedlich. Das Gewicht der Leber war signifikant höher in der Gruppe der IGF-AF-Feten, als in der Gruppe der SAL-Feten, jedoch wurde dieser Effekt durch die Verabreichung von Nährstoffen aufgehoben (IGF-NUT-Gruppe). Die Lebergewichte der IGF-IV-Gruppe lagen dazwischen.

Beide durchgeführten amniotischen Behandlungen (IGF-AF und IGF-NUT), aber nicht die Behandlung mit IGF-IV, steigerten das Gewicht des perirenal Fettgewebes im Vergleich zur SAL-Gruppe signifikant und führten das Gewicht der fetalen Lungen auf Werte zwischen der Kontroll- und der SAL-Gruppe zurück. Keine der Behandlungen beeinflusste das Gewicht der fetalen Schilddrüse oder das Gewicht der Plazenta, des Uterus, der fetalen Membranen oder der fetalen Flüssigkeiten. Wenn die Organgewichte pro Kilogramm Körpergewicht berechnet wurden, zeigten nur die reduzierten Lungengewichte in der IGF-IV-Gruppe einen signifikanten Unterschied [746].

Die Konzentration der Glukose im fetalen Plasma war in der Kontrollgruppe gesteigert, aber in der Gruppe der Feten mit Embolisation während dieser Periode verringert. Die fetalen Laktat- und Harnstoffwerte im Plasma stiegen in allen Gruppen während dieser Periode an. Die mütterlichen Glukose- und Harnstoffwerte des Plasmas waren während der Periode der Embolisation gesteigert, aber die mütterlichen Laktatwerte des Plasmas zeigten sich unverändert. In der Amnionflüssigkeit waren die Harnstoff- und Laktatkonzentrationen erhöht, hingegen waren die Glukosekonzentrationen in allen Gruppen während der Embolisationsperiode verringert. Während der Behandlungsperiode ließen sich erhöhte Glukosespiegel im fetalen Plasma der Kontrollgruppe, die höher waren, als in den anderen Gruppen, messen [746].

Die fetalen Plasmakonzentrationen von Laktat waren in der Kontrollgruppe, der IGF-AF- und IGF-NUT-Gruppe während der Behandlungsperiode gesteigert, wobei sie in der SAL- und IGF-NUT-Gruppe höher als in der Kontrollgruppe waren. Die fetalen Konzentrationen von Harnstoff im Plasma veränderten sich über die Zeit nicht, aber waren in der SAL-Gruppe niedriger, als in der Kontroll- und IGF-IV-Gruppe und in der IGF-NUT-Gruppe niedriger als in der Kontrollgruppe.

Die mütterlichen Glukosekonzentrationen im Plasma waren in allen Gruppen gleich und verringerten sich signifikant in der SAL-Gruppe während der Behandlungsperiode, wohingegen die mütterlichen Plasmakonzentrationen von Laktat in der Kontroll-, SAL- und IGF-IV-Gruppe anstiegen.

Die Harnstoffkonzentrationen im mütterlichen Plasma waren in der SAL-Gruppe niedriger, als in der Kontroll- und IGF-IV-Gruppe [746].

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Die fetale Plasmakonzentration von Insulin stieg während der Periode der Embolisation innerhalb der Kontrollgruppe an, aber zeigte dann bei den embolisierten Tieren einen Abfall. Die fetalen Plasmawerte der IGF-1-Konzentrationen stiegen innerhalb der Kontrollgruppe auf wesentlich höhere Werte an, als in der Gruppe der embolisierten Tiere. Die mütterlichen Plasmakonzentrationen von Insulin und IGF-1, sowie die IGF-1-Konzentrationen in der Amnionflüssigkeit, waren bei allen Tieren während der Periode der Embolisierung gesteigert [746].

Während der Behandlungsperiode stiegen die Plasmakonzentrationen von IGF-1 der Feten innerhalb der Kontrollgruppe. Nach einem anfänglichen Anstieg zeigte sich innerhalb der Gruppe der Embolisation allerdings diesbezüglich ein Abfall. Die fetalen Plasmakonzentrationen von IGF-1 und Insulin blieben in der Kontrollgruppe höher, als in allen anderen Gruppen.

Keine der Behandlungen änderte die fetalen Plasmalevels von IGF-1 oder Insulin. Die mütterlichen Plasmakonzentrationen von IGF-1 und Insulin waren aber in der IGF-IV-Gruppe höher, als in der IGF-NUT-Gruppe. Die IGF-1-Konzentrationen in der Amnionflüssigkeit nahmen während der Behandlungsperiode innerhalb der Kontroll- und SAL-Gruppe ab und stiegen innerhalb der IGF-AF- und der IGF-NUT-Gruppe auf das Elf- bzw. Fünffache [746].

In der hier beschriebenen Studie von Eremia und Kollegen zeigte sich, dass alle angewandten Methoden der fetalen IGF-1-Behandlung zu einer Reduktion der IUGR, die durch die plazentare Embolisation hervorgerufen wurde, führten. So verursachte die Embolisation in allen Gruppen eine Abnahme des Brustumfanges, aber dieser normalisierte sich nach der Behandlung mittels IGF-AF und IGF-IV.

Alle Behandlungen verbesserten die fetalen Gewichte (post mortem) auf Werte, die zwischen denen der Kontroll- und SAL-Gruppe lagen. Ein gesteigertes Wachstum der Leber wurde in der IGF-AF-Gruppe festgestellt, was die höheren Lebergewichte (post mortem) bestätigten. Dieser Effekt zeigte sich nicht, wenn die IGF-1-Applikation mit der Verabreichung von Nährstoffen kombiniert, oder intravenös gegeben wurde [746]. Die Effekte von IGF-1 auf das Leberwachstum schienen zum Teil dosisabhängig zu sein.

In einer früheren Studien von Bloomfield *et al.* wurde von einer Reduktion der Gewichte der fetalen Leber, der Milz und des Thymus nach amniotischer IGF-1-Verabreichung berichtet. Allerdings wurden dabei weniger als 40% der Dosis der vorliegenden Studie von Eremia *et al.* verabreicht. Eine postnatale enterale Verabreichung von IGF-1 führte zu einem Anstieg des Gewichtes der Leber in anderen Spezies.

In ähnlicher Weise führte die intravenöse Verabreichung von IGF-1 in einer 50-fach höheren Dosis als in der vorliegenden Studie, zu einem Anstieg der Lebergewichte, aber dieser Effekt zeigte sich bei niedrigeren Dosen nicht [734,746,766,768,769].

Eremia und Kollegen beschreiben, dass das Gewicht des perirenenalen Fettgewebes, infolge der Embolisation, reduziert war und auch dieser Effekt konnte durch intraamniotische Verabreichung von IGF-1 (sowohl mit, als auch ohne die gleichzeitige Verabreichung von Nährstoffen) vermindert werden, aber dies zeigte sich bei intravenöser Applikation von IGF-1 nicht [746].

Igf-1 ist für die Zellteilung und Differenzierung des fetalen braunen Fettgewebes in Ratten sehr wichtig. Es ist nicht geklärt, weshalb sich, bei gleicher Dosis von IGF-1, bei intravenöser Verabreichung nicht der gleiche Effekt auf das Organwachstum zeigte, wie bei intraamniotischer Verabreichung. Dies könnte allerdings, wie Eremia vermutet, an

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

einer höheren Effektivität bezüglich der Förderung des Wachstums der viszeralen Organe bei der Aufnahme von IGF-1 über die Pfortader liegen [746,770,771].

Die Effekte, die die Behandlung mit IGF-1 auf das fetale Organwachstum und den fetalen Rumpf ausübte, wurden in keiner Behandlungsgruppe von einem korrespondierenden Anstieg der zirkulierenden IGF-1-Konzentrationen begleitet. Die Embolisierung führte in allen so behandelten Gruppen zu einem Abfall der zirkulierenden Levels der Feten. Allerdings war innerhalb der ersten Behandlungswoche ein anfänglicher Anstieg der fetalen Plasmakonzentrationen von IGF-1 innerhalb aller Gruppen mit einer Embolisierung zu verzeichnen, aber dieser war vermutlich eher das Resultat der Embolisierung, als der IGF-1-Behandlung, denn er wurde auch in der SAL-Gruppe beobachtet. Nach einem anfänglichen Anstieg, sanken die fetalen Plasmakonzentrationen von IGF-1, trotz der Verabreichung wieder ab [746].

Diese Beobachtung wird auch durch die Studie von Bloomfield *et al.* bestätigt [767], in welcher eine intraamniotische Verabreichung von IGF-1 zu einer, paradoxerweise Suppression der fetalen zirkulierenden IGF-1-Konzentrationen führte. Es fielen dabei auch die mRNA-Levels für *IGF-1* in der Leber, der Muskulatur und der Plazenta signifikant ab, was dadurch erklärt werden könnte, dass *exogen* zugeführtes IGF-1 die *endogene Expression* von IGF-1 supprimieren könnte [746,772].

In einer weiteren Studie von Bloomfield *et al.*, die in diesem Kapitel (siehe unten) beschrieben wird, zeigte sich, dass radioaktiv markiertes IGF-1, welches in die amniotische Flüssigkeit verabreicht wurde, in intakter Form über den fetalen Darm in die Zirkulation der Pfortader aufgenommen wurde und so auch die fetale Leber direkt erreichen konnte [773].

Kind *et al.* schilderten, dass aus ihren Forschungen eine Reduktion der mRNA-Expression von *IGF-1* in der Leber, nach intravenöser Verabreichung höherer Dosen von IGF-1 während einer Periode von zehn Tagen, resultierte [774]. Demnach, so vermuten Eremia *et al.*, könnte die Unterdrückung der hepatischen mRNA- und Protein-Expression die molekulare Basis für den Mangel der Effekte der zirkulierenden IGF-1-Konzentrationen bilden [746].

Ein anderer möglicher Mechanismus, der die wachstumsfördernden Effekte der amniotischen IGF-1-Behandlung in Abwesenheit erhöhter zirkulierender IGF-1-Levels erklären könnte, wäre eine mögliche Freisetzung bisher unbekannter Mediatoren aus dem fetalen Darm in Antwort auf die IGF-1-Verabreichung. Eine Möglichkeit stellt *Ghrelin*⁶⁹⁶ dar, eine Substanz, die dem GH⁶⁹⁷ ähnlich ist. Dieses wurde erstmals im Magen von Ratten identifiziert. Ghrelin könnte auch im Magen von fetalen Schafen exprimiert werden und scheint in die Regulation des fetalen Wachstums, in Abwesenheit anderer endokriner Stimuli, involviert zu sein. Andere potentielle Peptide könnten *Inkretine*⁶⁹⁸, wie das Glucagon-like-peptide-1 und -2, darstellen [746,775-777].

⁶⁹⁶ *Ghrelin* (Akronym für engl. **G**rowth **H**ormone **R**elease **I**nducing, d. h. die Wachstumshormonfreisetzung einleitend) ist ein appetitanregendes Hormon, welches in der Magenschleimhaut produziert wird. Neben der Appetitanregung hat das Hormon eine Reihe anderer Wirkungen (109).

⁶⁹⁷ *Growth Hormone* (engl.): Wachstumshormon

⁶⁹⁸ Hormone, die vom Darm gebildet werden. Zunächst wurde das von den *K-Zellen* der Zwölffingerdarmschleimhaut gebildete *glukoseabhängige insulinotrope Peptid* (GIP) gefunden, das eine insulinfreisetzende Wirkung ausübt. Mitte der 1980er Jahre wurde dann das *Glucagon-Like Peptid 1* (GLP-1) beschrieben, das von den *L-Zellen* der Darmschleimhaut produziert wird. Die höchste Dichte dieser Zellen findet man am Ende des Dünndarms, dem sogenannten *Ileum*, sowie dem als *Caecum* bezeichneten Anfang

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Es ist ein interessanter Aspekt, dass, laut den Berichten von Eremia *et al.*, die zirkulierenden Konzentrationen des mütterlichen IGF-1 innerhalb der IGF-IV-Gruppe gesteigert waren. Das mütterliche IGF-1 beeinflusst die Entwicklung der Plazenta und auch das fetale Wachstum. Die Effekte des intravenös verabreichten IGF-1 auf das Wachstum des fetalen Rumpfes könnten daher durch die mütterlichen IGF-1-Konzentrationen, trotz der unveränderten zirkulierenden fetalen IGF-1-Levels, mediiert worden sein [746,778]. Mutterschafe der IGF-IV-Gruppe unterschieden sich von jenen anderer Gruppen durch einen höheren PaO_2 ⁶⁹⁹, höhere Insulinkonzentrationen und einen niedrigeren $PaCO_2$ ⁷⁰⁰. Keiner dieser Unterschiede ließ sich aber alleine durch die fetale IGF-1-Supplementation erklären [746].

Unerwarteter Weise wurden die wachstumsfördernden Effekte der amniotischen IGF-1-Behandlung auf die fetale Wachstumsrate und das Lebergewicht durch die Zugabe von Nährstoffen reduziert. Der fetale PaO_2 war in der IGF-NUT-Gruppe nicht reduziert, was, laut Meinung der Autoren, darauf schließen lässt, dass die verabreichten Nährstoffe die *metabolische Kapazität*⁷⁰¹ des Fetus nicht überstiegen. Der wachstumshemmende Effekt der Nährstoffe könnte deshalb durch andere Mechanismen, wie etwa durch eine Erhöhung der Bindungskapazität für IGF-1, hervorgerufen worden sein [746].

Am Fetus gibt es Anzeichen einer Regulation der IGF-BPs durch Nährstoffe, aber ein direkter Effekt der Nährstoffe auf die IGF-BP-Aktivität wurde bisher nicht beschrieben. Bei Schafen scheint IGF-BP-3 das innerhalb der Amnionflüssigkeit am reichlichsten vorhandene Bindungsprotein zu sein und die fetale IGF-BP-3-Produktion wird durch Nährstoffe, Insulin und IGF-1 reguliert [746,773,779,780].

Ein Anstieg der amniotischen IGF-BP-Konzentrationen könnte, laut den Beschreibungen von Eremia *et al.*, die Bioverfügbarkeit des amniotischen IGF-1 reduziert und somit seine Aufnahme durch den Fetus und damit auch sein Wachstum verringert haben. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Zufuhr der Nährstoffe zu einer Herabregulierung der umbilicalen Nährstoffaufnahme⁷⁰² geführt haben könnte. Charlton und Reis fanden bei ihren wissenschaftlichen Untersuchungen heraus, dass die über den Magen verabreichte Glukose bei Feten die umbilicalen Glukoseaufnahme supprimierte. Allerdings war die verabreichte Dosis der Glukose in dieser Studie bis zu 35-mal höher, als in der vorliegenden Studie von Eremia *et al.* und steigerte auch den arteriellen Glukosegehalt des Fetus. Dies könnte den mütterlich-fetalen Konzentrationsgradienten und damit die Aufnahme aus der Nabelschnur reduziert haben. Eremia und Mitarbeiter beobachteten keine Veränderungen der fetalen arteriellen Glukosekonzentrationen durch die Verabreichung der Nährstoffe [746,781].

Die fetalen Hämoglobinwerte stiegen während der Behandlungsperiode innerhalb der IGF-NUT-Gruppe an. Eine vergleichbare *Polyzythämie*⁷⁰³ konnte auch durch prolongierte fetale Hypoxie hervorgerufen werden und die Verabreichung von Glukose an den Fetus steigerte den fetalen Sauerstoffbedarf in Experimenten [746,782,783].

des Dickdarms. Es konnte beobachtet werden, dass die GLP-1-Wirkung additiv zur Wirkung des GIP ist (110).

⁶⁹⁹ arterieller Sauerstoffpartialdruck

⁷⁰⁰ arterieller CO_2 -Partialdruck

⁷⁰¹ Kapazität des Stoffwechsels

⁷⁰² Nährstoffaufnahme über die Nabelschnur

⁷⁰³ *Polyglobulie*: Vermehrung der Erythrozyten im Blut (1)

Auch wenn die Feten der IGF-NUT-Gruppe während der Behandlung nicht hypoxämisch waren, was sich bei Beobachtung des fetalen PaO₂ und des Sauerstoffgehaltes zeigte, so war doch eine Erhöhung der Laktatwerte in ihrem Amnion und Plasma zu verzeichnen, was einen kleinen, aber langsamen Anstieg des oxydativen Metabolismus, als Antwort auf die Nährstoffverabreichung, widerspiegeln könnte [746].

Praktisch alle IGF-1-Behandlungen führten, wie von der Forschergruppe um Eremia beschrieben, zu einer Reduktion der Effekte der Embolisation auf das fetale Gewicht, allerdings wurden die **vielpersprechendsten Ergebnisse** nach **intraamniotischer Verabreichung** von IGF-1 alleine, ohne zusätzlich verabreichte Nährstoffe, erzielt. Diese Behandlung führte zu einer signifikanten Verbesserung der fetalen Wachstumsraten, der fetalen Leber- und perirenal Fettgewichte und des Rumpfwachstums, ohne dabei die fetalen Blutgase, IGF-1- oder Insulin-Konzentrationen zu beeinflussen. Die amniotische Behandlung mit IGF-1 könnte somit eine Basis für eine zukünftige klinische Behandlung der IUGR bilden [746].

1.13.6. Das Schicksal von intraamniotisch appliziertem IGF-1

Wie bereits beschrieben, werden große Mengen von amniotischer Flüssigkeit in der späten Schwangerschaftsphase vom Fetus geschluckt und die *Turnover-Zeit*⁷⁰⁴ der Amnionflüssigkeit beträgt etwa 24 Stunden [762]. Die AF⁷⁰⁵ enthält Wachstumsfaktoren, wie IGF-1 und EGF⁷⁰⁶, aber auch Nährstoffe, die durch den fetalen Gastrointestinaltrakt aufgenommen werden [784].

IGF-1 stellt, nach Ausführungen von Pitkin *et al.*, vermutlich den dominierenden fetalen Wachstumsfaktor in der späten Schwangerschaft dar. Bloomfield und Kollegen demonstrierten, dass die einmal tägliche, intraamniotische Verabreichung von IGF-1 über zehn Tage zu einem Anstieg des Darmwachstums führte, aber dabei die zirkulierenden Levels von IGF-1 und das Wachstum von Milz, Leber und Thymus abnahmen. Die IGF-1-Levels blieben bis zu 24 Stunden nach der Injektion erhöht [785,786].

Die gastrointestinale Aufnahme von direkt in den Darm verabreichtem IGF-1 wurde an mehreren Studien an verschiedenen Spezies demonstriert und auch die Aufnahme von EGF wurde an der fetalen Ratte untersucht [787-789].

Hier sollen die Ergebnisse der Studie von Bloomfield *et al.* zusammengefasst werden, in welcher sieben trächtige Schafe einem chirurgischen Eingriff an den Schwangerschaftstagen 110-112 unterzogen wurden. Dabei brachte die Forschergruppe jeweils Katheter in die fetalen tarsalen⁷⁰⁷ Arterien und Venen, die Pfortader⁷⁰⁸, die Nabelvene und die mütterliche Carotis⁷⁰⁹ und Vena jugularis ein. Im Bereich des fetalen Nackens wurde ein oberer Amnion-Katheter angebracht, der zweite, untere Amnion-Katheter, im Bereich der fetalen Hinterbeine.

Am Tag 124 wurde aus den Kathetern Blut und Fruchtwasser entnommen, um mit Hilfe des RIA die IGF-1-Levels, und mit Hilfe der Blot-Analyse die Levels der IGFBPs

⁷⁰⁴ Es handelt sich um die Zeitspanne, die bis zur vollständigen Erneuerung des Fruchtwassers vergeht.

⁷⁰⁵ Amnionflüssigkeit

⁷⁰⁶ Epidermal growth factor

⁷⁰⁷ zur Fußwurzel gehörend

⁷⁰⁸ Vena portae

⁷⁰⁹ Halsschlagader

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

untersuchen zu können. Radioaktiv markiertes ^{125}I -IGF-1 wurde über den oberen Amnion-Katheter verabreicht [773].

Bei der Durchführung der Studie ließ sich feststellen, dass die Mischung des applizierten ^{125}I -IGF-1⁷¹⁰ im Fruchtwasser schnell voranging, wobei sich ein Unterschied in den Konzentrationen der oberen und unteren Bereiche des Fruchtwassers (gemessen mit Hilfe der beiden Amnion-Katheter) nur während der ersten drei Stunden zeigte. Die Halbwertszeit von ^{125}I -IGF-1 im Fruchtwasser betrug etwa 24 Stunden [773].

Die zehn Minuten nach der Injektion gemessene Höhe des an seine Bindungsproteine gebundenen Anteils von ^{125}I -IGF-1 variierte stark unter den verschiedenen Tieren. Die Chromatogramme ergaben, dass bei den meisten Versuchstieren der Peak des gebundenen ^{125}I -IGF-1 anfangs prominenter wurde, während der Gesamtwert des gebundenen IGF-1 in allen Peaks mit der Zeit sank. Trotzdem war auch 144 Stunden nach der Injektion noch ein bemerkenswerter Teil der gebundenen Fraktion vorhanden [773].

Etwa 6 Stunden nach der Injektion von ^{125}I -IGF-1 traten Peaks mit kleinerem Molekulargewicht auf, die offenbar *Degradationsprodukte*⁷¹¹ von IGF-1 darstellten. Ein Blot von Samples aus der AF und dem Plasma, die kurz vor Verabreichung des ^{125}I -IGF-1 abgenommen wurden, zeigte, dass das vorherrschende Bindungsprotein in AF und Plasma eine Molekulare Masse (M_r) von 38-44 kD aufwies und in der Position von IGFBP-3 lief.

Die Banden mit einer M_r von 34, 28-30 und 24 kD liefen in der Position für IGFBP-1, -2 und -4. Die Levels aller IGFBPs waren im Plasma höher als im Fruchtwasser. Der Blot ergab auch, dass eine kleine Menge IGFBP-1 im Fruchtwasser vorhanden war [773].

Die durchgeführte Analyse erbrachte Hinweise auf eine sehr hohe Korrelation zwischen der Prozentzahl des gebundenen ^{125}I -IGF-1 und der Dichte der IGFBP-3-Bande im Fruchtwasser. Daher hatten Tiere mit überwiegend ungebundenem ^{125}I -IGF-1 nur sehr schwache Banden im Blot bezüglich der Region des Molekulargewichtes für IGFBP-3. **IGFBP-3** war offenbar für den **größten Anteil des gebundenen IGF-1 verantwortlich** [773].

Die chromatographischen Profile von Samples aus den fetalen Arterien und den portalen Venen zeigten, bis auf die Tatsache, dass die Zahlen innerhalb der ersten 48 Stunden in den portalen Venen höher waren, keine Unterschiede. Im Fruchtwasser, wie auch im fetalen Plasma, war die Proportion von intaktem und gebundenem ^{125}I -IGF-1 sehr variabel und wies einen unterschiedlich hohen ungebundenen Anteil unter den verschiedenen Versuchstieren auf. Der Prozentsatz des gebundenen ^{125}I -IGF-1 im Plasma korrelierte am besten mit der relativen Dichte der Bande des IGFBP-1 [773].

Die Chromatographie der Samples aus den fetalen Arterie und den portalen Venen bewies die Anwesenheit von freiem und gebundenem ^{125}I -IGF-1 mit zunehmendem Auftreten von Degradationsprodukten bei fortschreitender Versuchsdauer. Diese waren hier früher und in größerer Höhe, als im Fruchtwasser nachzuweisen [773].

Die relative Dichte der IGFBP-3-Banden in der AF und dem Plasma korrelierte nicht mit den fetalen arteriellen Glukosekonzentrationen und dem Sauerstoffgehalt, oder mit der postmortal gemessenen fetalen Körpergröße. Jedoch korrelierte sie in der AF gut mit den IGF-Levels des Fruchtwassers.

Die Plasma IGF-1-Levels korrelierten weder mit der IGFBG-3-, noch mit der IGFBP-1-Dichte der plasmatischen Banden [773].

⁷¹⁰ Mit radioaktivem Iod (I^{125}) markiertes IGF-1

⁷¹¹ Abbauprodukte

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Bloomfield und Mitarbeiter berichteten über ein früheres Ansteigen der Werte von ^{125}I -IGF-1 im portalen Venenblut, als dies im arteriellen Blut der Fall war und diese Werte blieben dann für 48 Stunden erhöht.

Die Werte im portalen Venenblut von Tieren mit normalem Darm waren innerhalb der ersten 12 Stunden signifikant höher, als jene Werte von Tieren mit *Darmstenosen*⁷¹². Eine Stenose führte zu einem verspäteten Anstieg und der Peak wurde ebenfalls später erreicht [773].

Die Messwerte für ^{125}I -IGF-1 stiegen im maternalen Plasma 12 Stunden nach der Injektion, was auf den Verlust über die Plazenta hindeutete [773].

Sehr geringe Werte wurden bei der postmortem Untersuchung im fetalen Gewebe, 72-144 Stunden nach der Injektion von ^{125}I -IGF-1, außer im fetalen Darm auch in der maternalen und fetalen Schilddrüse gefunden. Der Darminhalt enthielt höhere Werte, als die Darmwand. Die Werte des Darminhaltes waren in den distalen Darmabschnitten höher und erreichten bis zu fünffach höhere Werte im Colon⁷¹³, als in den übrigen Darmabschnitten. Sie waren im normalen Darm höher, als im stenotischen Darm (bei Messung im distalen Jejunum⁷¹⁴).

Das chromatographische Profil des Darminhaltes bei normalem Darm ergab, dass das Profil des Mageninhaltes mit jenem des Fruchtwassers der postmortem Untersuchung vergleichbar war. Im Gegensatz dazu, zeigte sich bei Tieren mit stenotischem Darm, dass das Profil des Mageninhaltes eher dem des distalen Darmes ähnelte, mit geringen Zahlen von an IGF-BPs gebundenem ^{125}I -IGF-1 [773].

Dies deutet laut Meinung der Autoren darauf hin, dass bei Tieren mit normalem Darm kaum eine Degradation des Inhaltes auftrat, während bei Tiere mit stenotischem Darm eine solche zu verzeichnen war.

Die Werte, die mit Degradationsprodukten in Verbindung gebracht wurden, stiegen sowohl bei Tieren mit normalem, als auch bei jenen mit stenotischem Darm, von proximal nach distal an. Der Inhalt des Colons zeigte bei Tieren mit normalem Darm jeweils einen Anteil an freiem und an gebundenem ^{125}I -IGF-1, aber hauptsächlich Abbauprodukte mit geringem Molekulargewicht und daneben auch freies ^{125}I . Bei Tieren mit Darmstenose waren die Werte des Inhaltes des Colons deutlich geringer, als bei Tieren mit normalem Darm und sie wiesen nur einen kleinen Anteil an nachweisbarem ^{125}I -IGF-1 auf [773].

Die Daten dieser Studie von Bloomfield *et al.* ergaben, dass sich das intraamniotisch verabreichte ^{125}I -IGF-1 schnell im Fruchtwasser verteilte, vom Fetus geschluckt und über den Darm in die portale Vene aufgenommen wurde. ^{125}I -IGF-1 verweilte im Fruchtwasser für mindestens 6 Tage in gebundener und freier Form. Dies ließ eine anhaltende Freisetzung von ^{125}I -IGF-1 aus dem Fruchtwasser in systemische Zirkulation des Fetus nach einer einzelnen Injektion vermuten. Das gute Verteilungsverhalten von IGF-1 im Fruchtwasser entspricht auch der Beobachtung von Tomoda und seinen Mitarbeitern [773,790].

Die Chromatographie ergab, dass ein signifikanter Anteil des injizierten ^{125}I -IGF-1 sowohl im Fruchtwasser, als auch im Plasma einiger Tiere für die Dauer des Experimentes ungebunden blieb. Der größte Teil des gebundenen ^{125}I -IGF-1 zeigte sich in der Blot-

⁷¹² *Einengung* des Darmes (1)

⁷¹³ Hauptanteil des *Dickdarmes* (1)

⁷¹⁴ *Leerdarm*: an den Zwölffingerdarm anschließender Teil des Dünndarmes (1)

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Analyse in der Fraktion vor dem 66kD-Marker. Diese Fraktionen könnten, nach Vermutung der Autoren, Aggregaten von Bindungsproteinen mit ^{125}I -IGF-1, oder Aggregaten von ^{125}I -IGF-1 alleine entsprochen haben [773,791].

Der von Bloomfield und seinen Mitarbeitern beobachtete **hohe Korrelationskoeffizient** zwischen der **Dichte der IGFBP-3-Bande** im Blot des Fruchtwassers und dem Prozentsatz des **in vivo gebundenen ^{125}I -IGF-1** deutete darauf hin, dass diese hochmolekularen Gewichtsfractionen IGFBG- ^{125}I -IGF-1-Komplexe enthielten und ließ auch vermuten, dass das **IGFBP-3 das wichtigste IGFBP** im Fruchtwasser sein könnte [773].

Dies steht im **Gegensatz zum menschlichen Fruchtwasser**, in welchem Wathen *et al.*, ihren Beobachtungen folgend, **IGFBP-1** eine führende Rolle zuschrieben [792].

Die Variabilität der IGFBP-3-Levels in der AF und der Grad des gebundenen ^{125}I -IGF-1 *in vivo* ist unter den verschiedenen Tieren nicht klar, aber könnte seine Ursache in der *Proteaseaktivität*⁷¹⁵ haben. Das Vorhandensein von Proteasen, speziell einer *Serin-Protease*, ist im menschlichen Fruchtwasser bekannt und diese degradiert IGFBP-3, -4 und -5 [793].

Im Gegensatz zum nachgeburtlichen Leben, in welchem die IGFBP-3-Levels im Plasma durch Wachstumshormone geregelt werden, sind die fetalen Plasmalevels durch Nahrung und andere Hormone, wie Insulin und IGF-1 geregelt. Die Regulation der amniotischen IGFBP-3-Levels ist nicht bekannt [773,779].

Die Levels von IGF-1 könnten von Bindungsproteinen, oder auch umgekehrt, die Levels der Bindungsproteine von IGF-1 beeinflusst und geregelt werden. IGFBP-3 spielt mit großer Wahrscheinlichkeit eine wichtige Rolle bei der Regulation der Levels von IGF-1 im Fruchtwasser. Die Bioverfügbarkeit von ^{125}I -IGF-1 belief sich in einer Studie von Kimura *et al.* auf etwa 9% der verabreichten Dosis. Zwei weitere Untersuchungen, von welchen eine an Ratten, die andere an Schweinen durchgeführt wurde, beschrieben höhere radioaktive Werte im portalen, als im systemischen Blut und wiesen damit stark auf die Aufnahme der Substanz über den Darm hin [773,787,794,795].

Das verspätete Auftreten der Radioaktivität bei Tieren mit Darmstenosen deutet auf eine gastrointestinale Aufnahme hin und zeigt auch, dass andere Formen der Aufnahme, wie über die Lunge, die Haut und anderen epithelialen Oberflächen, sehr gering zu sein scheinen. Sechs Tage nach der Injektion konnten nur mehr 13,5 % des injizierten *Tracers*⁷¹⁶ bei der postmortem Untersuchung gefunden werden. Dieser Rest des Tracers wurde offenbar auf das mütterliche und kindliche Gewebe verteilt, oder durch die Mutter ausgeschieden [773,774,796,797].

Die Mechanismen der Aufnahme von Hormonen aus dem Darm sind noch nicht klar. Drei Tage nach der Injektion von IGF-1 konnte in Vesikeln der *Enterozyten*⁷¹⁷ von fetalen Schafen das Vorhandensein von IGF-1 mittels der Immunhistochemie nachgewiesen werden [798]. Auf die gleiche Weise konnte auch EGF in Vesikeln der Enterozyten von Rattenfeten kurz nach der direkten intraluminalen Injektion nachgewiesen werden [773,799].

Die von Bloomfield *et al.* analysierten Chromatogramme der Darminhalte von Schafen mit normalem Darm, zeigten eine ansteigende Menge von Degradationsprodukten vom

⁷¹⁵ Aktivität proteinabbauender Enzyme

⁷¹⁶ die radioaktiv-markierte Substanz

⁷¹⁷ Darmzellen

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

proximalen in Richtung des distalen Darmabschnittes. 145-150 Stunden nach der Injektion waren noch kleine Mengen an gebundenem und freiem ^{125}I -IGF-1 nachweisbar. An Tieren mit Darmstenose zeigte sich ein anderes Resultat. Es konnten auch Werte unterhalb der Stenose gemessen werden, eventuell bedingt durch progressive Obstruktion nach der Unterbrechung der Blutversorgung. Die gemessenen Werte der Tiere mit stenosierte Darm waren im distalen Darm viel kleiner, aber die gemessenen Werte von degradierten Fragmenten und freiem ^{125}I waren wesentlich höher und es zeigte sich fast kein Anteil an intaktem ^{125}I -IGF-1 [773].

Verschlucktes ^{125}I -IGF-1 könnte durch den stenosierten Darm weniger schnell aufgenommen werden und dadurch über längere Zeit dem Einfluss proteolytischer Enzyme ausgesetzt sein, was eine höhere Degradation ermöglichen würde. Die Tatsache, dass die Werte, gemessen in den portalen Venen, bei Tieren mit stenosierte Darm, wenn auch verspätet, die gleiche Höhe wie bei normalen Tieren erreichten, deutete darauf hin, dass es keine Differenzen bezüglich des Verschluckens oder des Volumens gab [773].

Ein extensiveres Abbauen von IGF-1 durch Enzyme innerhalb des bei Tieren mit Stenosen vorkommenden kleineren Darmes, könnte auch die Unterschiede im chromatographischen Profil des Coloninhaltes erklären. Trotzdem war das Vorkommen von intaktem ^{125}I -IGF-1 im Colon bei Tieren mit normalem Darm überraschend und legte wiederum die Vermutung nahe, dass zuvor absorbiertes ^{125}I -IGF-1 wieder in den Darm sezerniert⁷¹⁸ worden sein könnte [773].

In Experimenten von Kong *et al.* konnten, zwei Stunden nach einer intravenösen Injektion von ^{125}I -IGF-1 an Ratten, 2% der verabreichten Radioaktivität in der Galle nachgewiesen werden. Ein Anteil von 30% dieser Radioaktivität korrespondierte in der Gelchromatographie mit nativem IGF-1. Die Konzentration von IGF-1 in der Galle von Ratten war während der neonatalen Entwicklung am höchsten, sank aber, wenn die Ratte sich weiter entwickelte. Deshalb wäre es, den Ausführungen von Bloomfield *et al.* folgend, denkbar, dass die *enterohepatische Zirkulation*⁷¹⁹ von ^{125}I -IGF-1 zu den nach 6 Stunden immer noch erhöhten Werten von intaktem ^{125}I -IGF-1 im Darm beigetragen haben könnte. Die Aufnahme von ^{125}I -IGF-1 aus dem Darm vollzog sich bei normalen Tieren über eine Periode von bis zu 18 Stunden und bei Tieren mit stenosierte Darm über bis zu 36 Stunden [773,800,801].

Die Halbwertszeit von IGF-1 im Fruchtwasser von 24 Stunden, das portalvenöse⁷²⁰ Peak-Level von 18 Stunden und die persistierenden Levels von Radioaktivität im Fruchtwasser für einige Tage deuteten, laut Vermutung der Autoren, darauf hin, dass die amniotische Verabreichung des IGF-1 eine plausible Applikationsmöglichkeit, mit einem Dosierungsintervall von 24 Stunden darstellen könnte [773].

⁷¹⁸ *Sekretion*: Abgabe von Produkten durch Drüsen oder drüsenähnliche Zellen (1)

⁷¹⁹ Zirkulation zwischen Darm und Leber

⁷²⁰ in der *Vena portae* (Pfortader)

1.13.7. Der Transport von IGF-1 über Zellmonolayer

Epitheliale Zelllinien aus dem Darm (IEC⁷²¹-6), der Niere (MDBK⁷²²) und der Lunge (Mv1Lu⁷²³), besitzen hoch-affine, funktionelle Rezeptoren für IGF-1 und formten in Experimenten von Bastian *et al.* in Monolayer⁷²⁴-Zellkulturen *tight junctions*⁷²⁵ [802].

Um den Transport von IGF-1 genauer zu untersuchen, wurden in der hier zusammengefassten Studie von Bastian und Kollegen diese drei Zelllinien auf einem Zweikammer-Filtersystem mit Mikroporen gezüchtet.

Im Vergleich zu Filtersystemen ohne Zellen, zeigte sich, dass IEC-6- und MvLU1-Zellemonolayer die Passage von ¹²⁵I-IGF-1 und ³H-Inulin⁷²⁶ einschränkten, während die MDBK-Zellen nahezu keine Passage zuließen [802].

Der Transport von ¹²⁵I-IGF-1 war signifikant geringer, als der von ³H-Inulin, weshalb die Autoren vermuteten, dass er durch die Bindung des ¹²⁵I-IGF-1 an IGF-Rezeptoren oder IGF-Bindungsproteine verzögert worden sein könnte. Zusätzlich hat sich gezeigt, dass der Transport von ¹²⁵I-IGF-1 durch die Anwesenheit eines Überschusses von unmarkiertem IGF-1 nicht beeinflusst wurde. Die Ergebnisse geben Anzeichen dafür, dass freies IGF-1 einer eingeschränkten Diffusion über epitheliale Zellmonolayer in Darm, Niere und Lunge unterliegen könnte, die über *parazelluläre*⁷²⁷ oder niedrig-affine *transzelluläre*⁷²⁸ Wege stattfinden könnte [802].

Der Transport von *Makromolekülen*⁷²⁹ über epitheliale Oberflächen wird entweder durch aktive *transzelluläre* oder passive *parazelluläre* Wege bewerkstelligt. Für Proteine wie Meerrettichperoxidase⁷³⁰, Insulin, Immunglobulin G⁷³¹ und Beta-Lactoglobulin⁷³² zeigte

⁷²¹ *Intestinal Epithelial Cells*

⁷²² *Madin-Darby bovine kidney* (engl.): eine bovine Nierenepithelzell-Linie [786]

⁷²³ *Mustela vison (mink) lung* (engl.): eine Lungeneithelzell-Linie aus dem Nerz [786]

⁷²⁴ Der Begriff *Monolage* (*Monolayer*, engl.) oder *Monoschicht* bezeichnet eine Schicht von Zellen auf einer Oberfläche, wobei die Schichthöhe nur eine Zelle beträgt. Es liegen in der Monolage demnach keine gleichen Zellen übereinander (111).

⁷²⁵ *Tight Junctions* (engl. „dichte Verbindungen“, lat. „*Zonulae occludentes*“) sind schmale Bänder aus Membranproteinen, die Epithelzellen vollständig umgeben und mit den Bändern der Nachbarzellen in enger Verbindung stehen. Auf diese Weise verschließen die *Tight Junctions* den Zellzwischenraum und bilden eine Diffusionsbarriere, die den Fluss von Molekülen über das Epithel kontrolliert (20).

⁷²⁶ *Inulin* (auch *Alantstärke*) ist ein Gemisch von Polysacchariden aus Fructosemolekülen mit einer Kettenlänge von bis zu 100 Molekülen und einem endständigen Glucoserest. Niedermolekulares Inulin ist in warmem Wasser löslich. Es wird in der physiologischen Forschung zur Bestimmung des *extrazellulären Raums* eingesetzt, da es leicht in das *Interstitium* eindringt, nicht jedoch in die Zellen. Die Messung der *Inulin-Clearance* kann man zur exakten Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) der Nieren benutzen. Dies ist deshalb möglich, weil Inulin im Glomerulum vollständig filtriert wird, im Tubulus-System aber weder sezerniert noch reabsorbiert wird (112). *Tritium* (³H), mit dem das Inulin markiert wird, ist ein natürliches *Isotop* des Wasserstoffs. Sein Atomkern wird auch *Triton* genannt, er besteht aus einem Proton und zwei Neutronen (³H). Tritium wird aufgrund seiner Masse auch als „*Überschwerer*“ oder „*Superschwerer*“ Wasserstoff bezeichnet (113).

⁷²⁷ Beim *parazellulären Transport* über ein Epithel werden Stoffe durch die Zwischenräume zwischen den Zellen transportiert. Er erfolgt *passiv* und kann durch die *tight junctions* zwischen den Zellen verhindert bzw. reguliert werden (114).

⁷²⁸ Beim *transzellulären Transport* (*Transzytose*) werden Stoffe direkt durch die Zelle transportiert (z. B. durch *Exo-* und *Endozytose* oder durch *rezeptorvermittelten Membrantransport*) (114).

⁷²⁹ *Makromoleküle* sind große Moleküle, die aus vielen, bis zu mehreren hunderttausend, gleichen oder unterschiedlichen Bausteinen (Atome oder Atomgruppen) bestehen und damit eine relativ große Molekülmasse (über 1000 u) haben (115).

⁷³⁰ Die *Meerrettichperoxidase* - meist als HRP (von engl. *Horseradish*) abgekürzt - ist eine Peroxidase aus dem Meerrettich, die als so genanntes *Marker-Enzym* in der Biotechnologie-Forschung eingesetzt wird (116).

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

sich ein aktiver Transport in kleinen membrangebundenen *Vesikeln*⁷³³ über das Epithel, der nach Bindung an Zell-Oberflächenrezeptoren oder andere Bindungsstellen zustande kam. Im Gegensatz dazu, ließ sich für eine Komponente der Meerrettichperoxidase eine passiv-interzelluläre Diffusion beschreiben [802-804].

Einige Wachstumsfaktoren, wie Insulin, EGF, NGF⁷³⁴ und IGF-1 werden vom Darm aktiv aufgenommen [805,806]. IGF-1 ist ein potenter Promotor des Wachstums, Metabolismus und der Differenzierung vieler Zellen, auch der epithelialen Zellen [807].

Systemisch verabreicht, führte IGF-1 zu Wachstum und Reifung des Darmes und oral verabreicht führt es zur Stimulation der Darmproliferation [808,809]. Die IGFs wurden auch in der Milch verschiedener Spezies nachgewiesen [810,811].

Oral verabreichtes ¹²⁵I-IGF-1 wird vom Darm absorbiert und erscheint intakt in der Zirkulation. Um seine mitogene Wirkung auszuüben, bindet IGF-1 an den Typ-1-IGF-Rezeptor (IGF-1R) an den Zielzellen. Diese wurden an der intestinalen Mucosamembran von Schweinen, an basolateralen Membranen von Enterozyten von Ferkeln und an den Epithelien der Krypten und Villi⁷³⁵ von Ratten gefunden. Intestinale Zelllinien, die von jejunalen Krypten der Ratte (IEC-6), sowie auch dem Kolon der Ratte, des Hasen und des Menschen stammen (Caco-2⁷³⁶), exprimieren ebenfalls IGF-1R [812-819].

In der hier zusammengefassten Studie von Bastian *et al.*, wurde der Transport von ¹²⁵I-IGF-1 über aus intestinalen Epithelzell-Linien der Ratte stammende Monolayer untersucht und mit dem beobachteten Transport in Zelllinien der Niere und Lunge verglichen. Es zeigte sich eine Evidenz für eine eingeschränkte parazelluläre, oder niedrig-affine transzelluläre Diffusion von IGF-1 über diese epithelialen Zell-Monolayer [802].

In kompetitiven Studien war zu beobachten, dass epitheliale Zelllinien von IEC-6 und Mv1Lu 3,7 und 4,1%, aber MDBK-Zelllinien 23% des gesamten zugesetzten ¹²⁵I-IGF-1 banden. Ein Anteil von 50% des gebundenen ¹²⁵I-IGF-1 wurde durch 3,6; 3,8 und 6,0 ng/ml von unmarkiertem IGF-1 von den MvLu1-, IEC-6- und MDBK-Zellen verdrängt [802].

Um die Bindungsstellen von IGF in jeder der Zelllinien besser charakterisieren zu können, verbanden Bastian und Mitarbeiter das gebundene ¹²⁵I-IGF-1 mit Zell-Oberflächenrezeptoren in Anwesenheit und Abwesenheit von gesättigten Konzentrationen von unmarkiertem IGF-1, IGF-2 und Insulin (*Cross-Linking*). Die Rezeptor-Ligand-

⁷³¹ *Immunglobulin G* (IgG) oder *Gammaglobulin* ist ein Glykoprotein, das von *B-Lymphozyten* bzw. *Plasmazellen* nach Kontakt mit einem Antigen produziert wird (117).

⁷³² Das *Beta-Lactoglobulin* in der Milch von Säugetieren ist nahe verwandt mit dem *Glycodelin*. Dies ist ein Protein, das im *Endometrium* von Primaten produziert wird. Es hat modulierende Funktion auf das Immunsystem. Aufgrund seiner Zugehörigkeit zu der Familie der *Lipocaline* hat es wahrscheinlich die Funktion eines Transportproteins (118).

⁷³³ *Vesikel* (lat. „*vesicula*“=Bläschen) sind intrazelluläre (in der Zelle gelegene) sehr kleine, rundliche bis ovale Bläschen, die von einer einfachen oder doppelten Membran oder einer Proteinschicht umgeben sind. Die Vesikel bilden eigene Zellkompartimente, in denen unterschiedliche zelluläre Prozesse ablaufen. Ihre Größe beträgt etwa einen Mikrometer (119).

⁷³⁴ *Nerve growth factor*

⁷³⁵ Darmzotten sind blatt- bis fingerförmige Erhebungen der Dünndarmschleimhaut und dienen vor allem der Resorption (120).

⁷³⁶ Die *Caco-2 Zelllinie* besteht aus heterogenen humane Zellen des colorektalen Adenokarzinoms (121).

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Komplexe wurden für beide, die IEC-6- und die MvLu1-Zelllinie, via *SDS-PAGE*⁷³⁷ als Banden bei 140 und 270 kDa visualisiert. Beide Banden stellten die Verdrängung dar, wenn das *Cross-Linking* in Anwesenheit von unmarkiertem IGF-1, IGF-2 oder Insulin durchgeführt wurde. Die molekularen Massen dieser beiden Banden waren mit der querverbundenen Typ-1-IGF-Rezeptor-Untereinheit- α und Dimeren dieser α -Untereinheit konsistent. Es wurde keine Querverbindung von ¹²⁵I-IGF-1 in den MDBK-Zelllinien beobachtet [802].

Die Anwesenheit von funktionsfähigem Typ-1-IGF-Rezeptor wurde mittels ³H-Thymidin⁷³⁸, einem Marker der DNA-Synthese, untersucht. Alle getesteten Konzentrationen von IGF-1 steigerten den Einbau von ³H-Thymidin in die DNA von MvLu1-Zellen signifikant (siehe **Abbildung 20**). Bei der höchsten verwendeten Konzentration (100 ng/ml), wurden die MvLu1-Zellen zur Steigerung ihrer ³H-Thymidin-Aufnahme um $74 \pm 2\%$ stimuliert. Die Inkorporation von ³H-Thymidin in die IEC-6- und MDBK-Zelllinien konnte erst nach Verwendung einer Dosis von 100 ng/ml IGF-1 signifikant, auf $20 \pm 4\%$ und $80 \pm 3\%$ gesteigert werden [802].

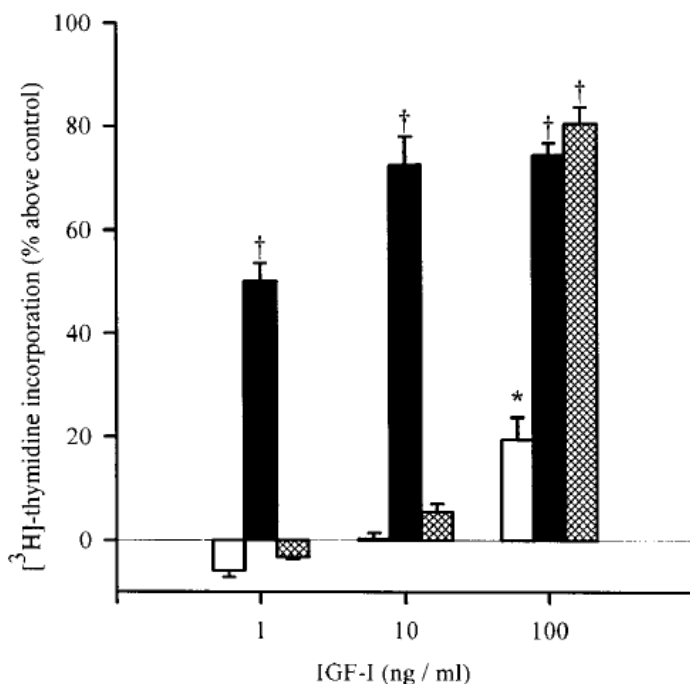


Abbildung 20:

Einbau von ³H-Thymidin in IEC-6-Zellen (leere Balken), MvLu1-Zellen (schwarze Balken) und MDBK-Zellen (schattierte Balken), die mit den angegebenen Konzentrationen von IGF-I behandelt wurden. Die Resultate wurden als Prozentsatz der Inkorporationen angegeben, die unter serumfreien Bedingungen beobachtet werden konnten.

Quelle: © Bastian *et al.* [802]

Die Applikation von ¹²⁵I-IGF-1 auf der apikalen Seite des IEC-6-, MvLu1- und MDBK-Monolayers, resultierte in einer zeitabhängigen Zunahme der Menge dieses Peptids, das dann in intaktem Zustand im basolateralen Raum nachzuweisen war. Nach zwei Stunden waren $7,9 \pm 0,8\%$, $10,8 \pm 0,7\%$ und $1,2 \pm 0,2\%$ des gesamten ¹²⁵I-IGF-1 von den IEC-6-, MvLu1- und MDBK-Zellmonolayern transportiert worden.

Der Flux von ¹²⁵I-IGF-1 über Filter ohne Zellmonolayer betrug $34,1 \pm 0,9\%$ und war somit bedeutend größer. Dies ließ den Schluss der Autoren zu, dass die IEC-6- und MvLu1-

⁷³⁷Die *SDS-PAGE* (Abkürzung für englisch sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) ist eine Variante der Polyacrylamid-Gelelektrophorese, einer analytischen Methode der Biochemie zur Trennung von Stoffgemischen im elektrischen Feld (122).

⁷³⁸ Der Einbau von ³H-Thymidin in die zelluläre DNA wird verwendet, um die Rate der DNA-Synthese und Zellproliferation zu beurteilen (123).

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Zellen den Transport stark reduziert und die MDBK-Zellen den Transport nahezu aufgehoben hatten (siehe **Abbildung 21**).

Zusätzlich zeigte sich der Flux von ^{125}I -IGF-1 über epitheliale Zellmonolayer signifikant geringer, als jener von ^3H -Inulin [802].

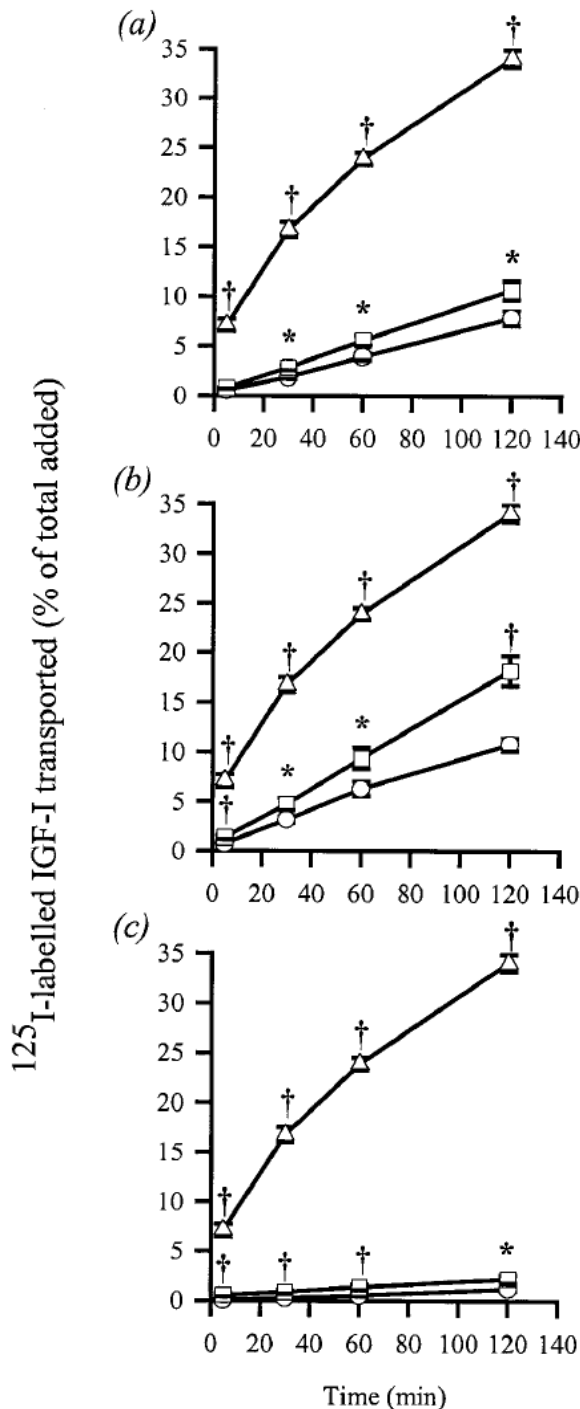


Abbildung 21:

Transport von ^{125}I -IGF-1 (O) und ^3H -Inulin (□) über (a) IEC-6-, (b) Mv1Lu- und (c) MDBK-Zellmonolayer.

Transport von ^{125}I -IGF-1 (Δ) über Filter ohne Zellen (in jeder Abbildung).

Der Transport von ^{125}I -IGF-1 und ^3H -Inulin wird als Prozentsatz des gesamten und intakten ^{125}I -IGF-1 ausgedrückt, das zum Zeitpunkt 0 dem apikalen Bereich der Monolayer zugesetzt wurde.

P<0,05 (*), p<0,01 (†) vs. ^{125}I -IGF-1 über die Epithelzellmonolayer.

Quelle: © Bastian *et al.* [802]

Um zu sehen, ob der Transport von ^{125}I -IGF-1 konzentrationsabhängig war, wurde ein 1000-fach erhöhter Spiegel von unmarkiertem IGF-1, 30 Minuten vor der Zugabe des ^{125}I -IGF-1, apikal zugesetzt. Wie sich dann zeigte, änderte die Zugabe des übersteigerten und unmarkierten IGF-1 den Transport von ^{125}I -IGF-1 über die Membran nicht, woraus die

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Autoren auf das Vorhandensein eines nicht-sättigungsfähigen Fluxes von intaktem ¹²⁵I-IGF-1 über die Epithelbarriere schlossen [802].

Die Hauptaufgabe eines Epithels liegt darin, eine selektive Barriere für die Bewegung von Stoffen, Peptide und Proteine eingeschlossen, darzustellen.

Der Flux der Stoffe über das Epithel kann entweder auf transzelluläre, unter Einbeziehung der apikalen und basolateralen Transportsysteme, oder auf parazelluläre Weise, via interzelluläre Räume erfolgen [802].

IgG wird mittels eines Rezeptor-Wegs durch den Darm in die Zirkulation aufgenommen. Die intestinale Absorption von metabolisch-aktivem Insulin wird auf transzellulärem Weg bewerkstelligt, was bei Ratten zu signifikanter Verringerung des Blutzuckerspiegels und erhöhten zirkulierenden Insulinwerten führte [802,820,821].

Die intestinale Absorption von IGF-1, verbunden mit steigenden IGF-1-Plasmalevels, wurde in Studien an Kälbern, denen IGF-1 oral verabreicht wurde, beobachtet. An Kälbern, die einen Tag alt waren, führten supraphysiologische Dosen von IGF-1 oder ¹²⁵I-IGF-1, die in ein abgeklemmtes Segment des Jejunums appliziert wurden, zu einem Anstieg in der dieses Segment drainierenden Mesenterialvene⁷³⁹ [812,822]. Oral verabreichtes ¹²⁵I-IGF-1 wurde von Ferkeln und Kälbern absorbiert, etwa 20% der gesamten Plasmaradioaktivität erschienen als intaktes ¹²⁵I-IGF-1 und die Mehrheit wurde an IGFBPs gebunden [802,813,823].

Donovan *et al.* berichteten darüber, dass nach oraler Verabreichung von ¹²⁵I-rhIGF-1 an Schweine, 18-20% der Gesamtradioaktivität im portalen und arteriellen Blut intakt waren, was einem Anteil an absorbiertem ¹²⁵I-rhIGF-1 in Höhe von 0,205% des gesamten Plasmapools entsprach. Philips *et al.* demonstrierten, dass neugeborene Ratten, denen man Milch mit einem Substitut von ¹²⁵I-rhIGF-1 verabreichte, mehr Gewicht, gesteigertes Gehirnwachstum und feuchtes Lebergewicht, sowie einen erhöhten Leberproteingehalt aufwiesen und, dass ihre Serum-IGF-1-Levels bis zu zweifach über denen der mit normaler Rattenmilch ernährten Tiere lagen. Damit wurde die Absorption von metabolisch-aktivem IGF-1 nachgewiesen [802,823,824].

Die von Bastian und Kollegen beschriebene, gesteigerte Sensitivität der *MvLul*-Zellen für IGF-1, könnte die reduzierte Produktion oder Sekretion von IGFBP-Levels, verglichen mit anderen Zelllinien, reflektiert haben. Auch IEC-6-Zellen besitzen IGF-1 Rezeptoren [802,825,826]. Interessanterweise konnte die in der Studie von Bastian *et al.* gemachte Beobachtung, dass MDBK-Zellen IGF-1 Rezeptoren besitzen, nicht auf ihre *Cross-Link-Experimente* übertragen werden.

In Studien mit kulturell angezüchteten Kaninchen- und Opossumzellen aus dem proximalen Tubulus der Niere, konnten Typ-1- und Typ-2-IGF-Rezeptoren nachgewiesen werden. Während laut Berichten von Hammerman *et al.* die Typ 2-Rezeptoren gleichmäßig über die basolateralen und Bürstensaum-Areale verteilt waren, war die Verteilung der Typ 1-Rezeptoren im basolateralen Bereich unregelmäßig und zeigte eine einige Male höhere Bindungskapazität. Da MDBK-Zellen ähnliche Eigenschaften, wie proximale Tubulusepithelzellen der Niere aufweisen, wäre es, laut Vermutung der Autoren möglich, dass der Radioligand während des Zeitraums der *Cross-Link-Analyse* keinen Zugang zu den basolateralen Rezeptoren fand [802,827,828].

⁷³⁹ Vene, in die das Blut aus diesem Darmsegment abfließt

Bezüglich des transepithelialen elektrischen Widerstandes, beobachteten Bastian *et al.* bei den MDBK-Monolayern wesentlich höhere Werte, als bei den MvLu1- und IEC6-Monolayern.

MDBK-Zellen stammen von proximalen Tubuluszellen ab, die nicht am Transport von Proteinen beteiligt sind, sehr wohl aber auf der Seite der Reabsorption der Aminosäuren aus dem *glomerulären Filtrat*⁷⁴⁰.

Die IEC-6- und die MvLu1-Zellen zeigten ein niedriges transepitheliales elektrisches Potential, obwohl sie die Passage von ¹²⁵I-IGF-1 oder ³H-Inulin, im Vergleich zu Filtern ohne Zellen, stark einschränkten. IEC-6- und MvLu1-Zellen ähneln stark den epithelialen Zellen, die ebenfalls *tight-junctions* bilden und ein geringes, transepitheliales elektrisches Potential zeigen und so den Transport von Makromolekülen behindern [802,829].

Die Studie von Bastian *et al.* brachte schließlich folgende Erkenntnisse hervor: die Mehrheit des an jeden der drei Zell-Rezeptor-Monolayer gebundenen ¹²⁵I-IGF-1, wurde durch nicht markiertes IGF-1 verdrängt. Der Transport von ¹²⁵I-IGF-1 über epitheliale Zellmonolayer war, in Anwesenheit dieser übersteigerten Menge an unmarkiertem IGF, unverändert. Dies ließ die Autoren, wie beschrieben, auf einen *nicht-sättigungsfähigen* Transport-Mechanismus schließen. Es führte auch zu der Annahme, dass ¹²⁵I-IGF-1 die Barriere von IEC-6-, MvLu1- und MDBK-Zellmonolayern mittels eines *parazellulären*, oder *niedrig-affinen transzellulären* Mechanismus, und somit *nicht-rezeptormediert*⁷⁴¹ überqueren könnte. Da der Transport von ¹²⁵I-IGF-1 über jeden Zellmonolayer wesentlich geringer, als jener von ³H-Inulin war, musste, nach Annahme der Autoren, der Transport durch die Bindung an Oberflächenrezeptoren für IGF oder IGF-BPs verzögert worden sein [802].

1.14. Vitamin A-Mangel und sein Zusammenhang mit teratogenen und chirurgischen Modellen der CDH

Auch Vitamin A (*Retinol*) spielt offenbar eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der CDH. Es geht dabei vor allem um die *Vitamin A-Homöostase*⁷⁴² und die Rolle von *Vitamin A-Säure*⁷⁴³ in der fetalen Entwicklung [830].

1.14.1. Vitamin A und Vitamin A-Säure in der fetalen Entwicklung

Retinol und sein Derivat, die Vitamin A-Säure, spielen eine wichtige Rolle bei der fetalen Entwicklung, wie durch Versuche am Tiermodell mit *VAD*⁷⁴⁴ und *Knockout* des *Vitamin A-Säure-Rezeptors* bewiesen wurde [831,832].

Nitrofen-Exposition führt interessanterweise zu ähnlichen Veränderungen und Defekten an Feten, wie man sie auch bei *VAD-Diäten* und *Knockouts* des *Vitamin A-Säure-Rezeptors* findet. Die Verbindung zwischen Teratogenen und dem Vitamin A-Säure-Signalweg ist somit unübersehbar. So zeigen sich bei der Entstehung der CDH verschiedene Störungen der Vitamin A-Homöostase und des Vitamin A-Säure-Signalwegs [830].

⁷⁴⁰ Filtrat der Glomeruli der Niere

⁷⁴¹ nicht über Rezeptoren reguliert

⁷⁴² Gleichgewicht

⁷⁴³ *Retinoic Acid (RA)*, oder auch *Tretinoin* genannt (1)

⁷⁴⁴ *Vitamin A-Defizienz*

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Alle *Retinoide* müssen aus der Nahrung aufgenommen werden, entweder als bereits vorhandenes *Retinoid*⁷⁴⁵, oder als *Proretinoid*⁷⁴⁶, häufig als β -Karotin [830,833].

Diese Substanzen werden modifiziert und dann gemeinsam mit anderen Nahrungsmittellipiden durch das Enzym LRAT⁷⁴⁷ in den *Enterozyten*⁷⁴⁸ in *Chylomikronen*⁷⁴⁹ verpackt [834].

Der Hauptteil wird von der Leber aufgenommen und in speziellen Zellen, den *Ito-Zellen* oder *Lipozyten*, als *Retinylester*⁷⁵⁰ gespeichert. Dieser hepatische Speicher an *Retinol* kann an das Plasma durch Bindung an das RBP-4⁷⁵¹ abgegeben werden (**siehe Abbildung 22**) [830].

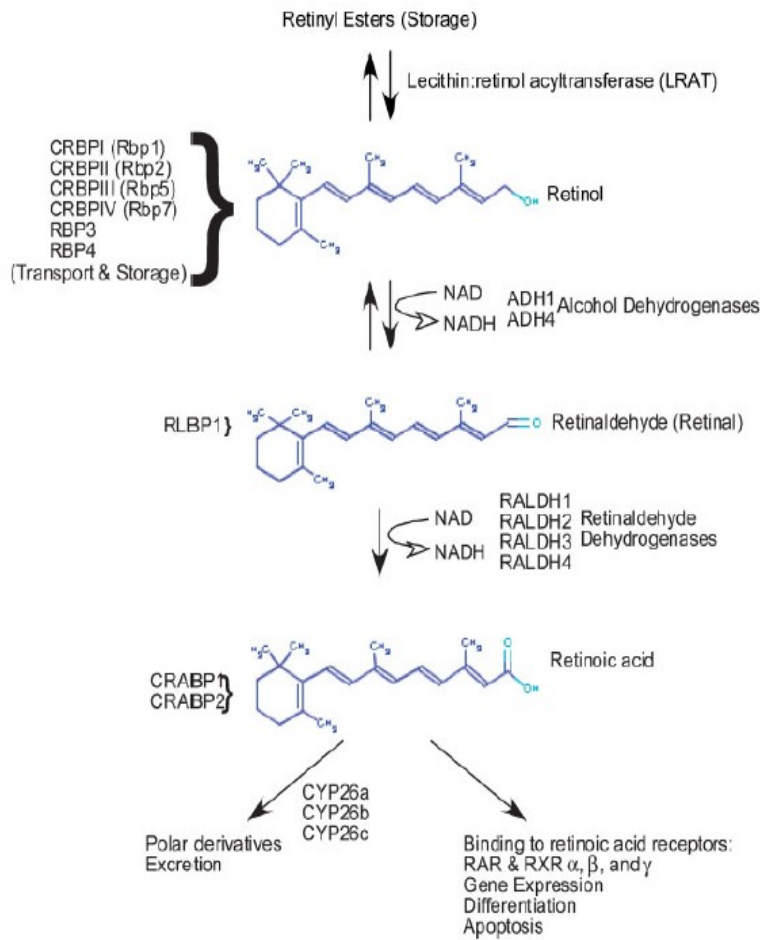


Abbildung 22:

Metabolismus von Vitamin A (*Retinol*), Retinaldehyd (*Retinal*) und Vitamin A-Säure (*Tretinoin*).

Die *Retinylester* werden primär zur Leber transportiert und dort gespeichert. Sie werden dann durch Hydrolyse zu *Retinol* mobilisiert und durch Bindung an RBP-4 zu den peripheren Geweben transportiert. In den Zielgeweben oxidiert die *Alkohol-Dehydrogenase* *Retinol* zu *Retinaldehyd* und schließlich wird es, durch die *Retinaldehyd-Dehydrogenase*, zu *Tretinoin* (*Vitamin A-Säure*) oxidiert. Die *Vitamin A-Säure* bindet an ihre Rezeptoren und induziert damit die Gentranskription. Überschüssiges *Tretinoin* wird oxidiert und dann ausgeschieden.

Quelle: © Kling *et al.* [830]

Andere Gewebe können *Retinol* aus diesem *Retinol-RBP-Komplex*, oder auch aus postprandialen⁷⁵² *Chylomikronen* aufnehmen und sind dazu befähigt, es zu *Retinal*⁷⁵³ oder

⁷⁴⁵ *Retinol- oder Retinylester*

⁷⁴⁶ *Karotinoid*

⁷⁴⁷ *Lecithin-Retinol-Acyltransferase*

⁷⁴⁸ *Darmepithelzellen*

⁷⁴⁹ Die *Chylomikronen* sind *Lipoproteine* mit einer Dichte von <0,95 g/ml (Lipidanteil 98-99,5%), die in der Darmmucosa synthetisiert werden (1).

⁷⁵⁰ *Fettsäureester* des *Retinols*

⁷⁵¹ *Plasma-Retinol-Binding-Protein-4*

⁷⁵² nach dem Essen

⁷⁵³ *Retinaldehyd*

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

zu Vitamin A-Säure zu oxidieren. Die meisten Gewebe besitzen die Fähigkeit zur Veresterung und Speicherung von Retinol [830].

Im Zielgewebe wird Retinol zuerst mit Hilfe der *Alkoholdehydrogenase 1 und 4* zu *Retinal* oxidiert und schließlich durch die Wirkung der RALDHs⁷⁵⁴ 1-4 in *Tretinoin* überführt. Das Haupttranskript des *Raldh* war, in Untersuchungen mittels *In-Situ-Hybridisierung*⁷⁵⁵, *Raldh2* und es wurde im *viszeralen Dottersack* von frühen Mäuseembryonen und mesothelialen Zelllinien von *viszeraler* und *parietaler Pleura*⁷⁵⁶ in der späteren Schwangerschaft vorgefunden. Die Inaktivierung des *Raldh2*-Gens führte zu embryonaler Letalität, die hauptsächlich durch Herzfehler an den Tagen 9,5-10,5 hervorgerufen wurde. Das führte zur Annahme, dass die Enzyme RALDH, und besonders RALDH2, eine „*Wächterposition*“ bezüglich der Regulation der Vitamin A-Säure-Synthese in den Geweben, aus denen letztlich das Herz und die Lungen hervorgehen, haben könnte [830,835-838].

Die Signaltransduktion der Vitamin A-Säure wird durch die Bindung des Liganden geregelt und damit wird die Expression von *responsiven Genen* gesteuert. Die Vitamin A-Säure-Rezeptoren sind in zwei Gruppen, nämlich RARs und RXRs, vorhanden und von ihnen existieren jeweils wieder die Untervarianten: α , β und γ . Diese werden durch ihre spezifischen Gene codiert. Durch *alternatives Spleißen* mit der Verwendung unterschiedlicher *Promotoren*, können die verschiedenen Isoformen dieser Rezeptoren entstehen. Die Vitamin A-Säure-Rezeptoren regulieren die Genexpression durch Bindung an Promotorregionen der entsprechenden *genresponsiven Elemente der Vitamin A-Säure*⁷⁵⁷. Individuelle Experimente mit Gen-Knockouts haben keine Veränderungen ergeben, allerdings fanden sich bei *Double-* und *Tripel-Knockouts* der *Rar*-Gene starke Entwicklungsanomalien, was darauf hindeutete, dass offensichtlich multiple Varianten dieser Gene eine *Redundanz*⁷⁵⁸ zeigen [831,839-842].

Interessanterweise zeigte sich an einer Gruppe von Mäusen, bei denen ein Knockout für die Gene *Rar- α/β 2* verursacht wurde, die Entstehung einer CDH in 25% der Fälle [830,831,843,844].

Die Konzentrationen der Vitamin A-Säure sind offensichtlich streng reguliert, was sowohl durch die Kontrolle ihrer Synthese, als auch durch ihren Abbau bewerkstelligt wird. Zu diesen kontrollierenden Enzymen gehören: Cytochrom P450 (CYP), CYP26A1, CYP26B1 und CYP26C1, die für die Oxidation der Vitamin A-Säure zu anderen Metaboliten, die keine biologische Funktion zu haben scheinen, zuständig sind.

Ein Entwicklungsarrest wurde von der Forschergruppe um Taimi an Embryonen von Knockoutmäusen für *Cyp26a1* [*Cyp26a1(-/-)*] am Tag 8,5 festgestellt, der offensichtlich durch die Entstehung von *Ödemen*⁷⁵⁹ und kardiovaskulären Anomalien bedingt war. Die

⁷⁵⁴ *Retinaldehydrogenasen*

⁷⁵⁵ Die *In-situ-Hybridisierung* (ISH) ist eine molekularbiologische Methode, um Nukleinsäuren, also RNA oder DNA, in Geweben, einzelnen Zellen oder auf Metaphase-Chromosomen nachzuweisen. Dabei wird eine künstlich hergestellte *Sonde* aus einer Nukleinsäure eingesetzt, die über Basenpaarungen an die nachzuweisende Nukleinsäure *hybridisiert*, also bindet. Die Bezeichnung „*in situ*“ wird verwendet, da der Nachweis direkt in der jeweiligen Struktur durchgeführt wird, und nicht etwa biochemisch im Reagenzglas (124).

⁷⁵⁶ Lungenfell

⁷⁵⁷ RAREs: Retinoic Acid Response Elements (engl.)

⁷⁵⁸ *Redundanz* bedeutet, dass mehrere Gene für eine Entwicklung oder die Ausprägung eines Merkmals vorhanden sind bzw. zusammenwirken (1).

⁷⁵⁹ Ansammlung wässriger (seröser) Flüssigkeit in den Gewebespalten (1)

starke Beeinflussung der fetalen Phänotypen bei *Raldh2*- und *Cyp26a1*-Knockout-Mäusen deutete darauf hin, dass die Levels der Vitamin A-Säure in den Zielgeweben während des fetalen Stadiums und der embryonalen Entwicklung sehr streng geregelt waren [830,845].

1.14.2. Modelle der Vitamin A-Defizienz

Studien von Warkany *et al.* aus den 1940er-Jahren zeigten, dass Feten, die intrauterin einem Vitamin A-Mangel ausgesetzt waren, mit einer Häufigkeit von 25 bis zu 60% eine CDH ausbildeten. Zusätzlich zeigten diese Rattenfeten andere Anomalien, am häufigsten im Bereich der Augen und der Nieren, aber auch des Aortenbogens, eine Lungen-Hypoplasie und/oder -Agenesie sowie genitalen Fehlbildungen⁷⁶⁰ [830,846,847].

Es fiel auch auf, dass die CDH und andere Anomalien, die unter einer VAD entstanden, durch die Gabe von Retinol oder anderen Substanzen, die Retinol enthielten, wie z. B. *Heilbutleber-Öl*, reduziert oder sogar verhindert werden konnten. Erstaunlicherweise war die Effizienz dieser Therapie umso besser, je früher die Substitution in der embryonalen Entwicklung erfolgte (E10 und E11), was wiederum auf die wichtige Bedeutung und den absoluten Bedarf von Retinol in diesen Phasen hindeutete. Vitamin A kann somit die Aufrechterhaltung des normalen epithelialen Gewebes, die Synthese von *Mucopolysacchariden*⁷⁶¹ und den Anstieg der Umwandlung von *Cholesterol*⁷⁶² in *Corticosteron*⁷⁶³ erleichtern und nicht durch die Verabreichung von Vitamin A-Säure ersetzt werden [830,846,848-850].

In Fällen einer unvollständigen Heilung war es nicht klar, ob diese durch die Unmöglichkeit der effizienten Plazentaüberquerung für Vitamin A-Säure bedingt war, oder ob ein absoluter Bedarf für Retinol bestand. Die Plazentaüberquerung von Vitamin A-Säure und deren Metaboliten variierte unter verschiedenen Tierspezies relativ stark. Zur Charakterisierung der *Ätiologie*⁷⁶⁴ der VAD-induzierten angeborenen Defekte gibt es nur wenige Studien. Eine dieser Studien, die von Scribner und Kollegen durchgeführt wurde, zeigte eine reduzierte hepatische Expression des Gens *Pepck*⁷⁶⁵ in VAD-Mäusen, aber diese konnte durch die *in vivo*-Verabreichung von Vitamin A-Säure wiederhergestellt werden [830,851,852].

1.14.3. Parallelen zwischen dem Nitrofen- und dem VAD-Modell

Nitrofen ist wohl das am besten beschriebene Teratogen, das für das Hervorrufen einer CDH bekannt ist. In Nagetiermodellen wurde allerdings, wie in dieser Einleitung bereits angesprochen, auch eine Vielzahl an anderen Teratogenen und deren Wirkungen dokumentiert [853-855].

⁷⁶⁰ Fehlbildungen der Geschlechtsorgane

⁷⁶¹ *Glykosaminoglykane* (GAG) oder *Mucopolysaccharide* sind linear aus sich wiederholenden Disacchariden aufgebaute, saure Polysaccharide (125).

⁷⁶² *Cholesterin* ist ein lebenswichtiges *Sterol* und ein wichtiger Bestandteil der Plasmamembran. Es erhöht die Stabilität der Membran und trägt gemeinsam mit Proteinen dazu bei, Signalstoffe in die Zellmembran einzuschleusen und wieder hinauszubefördern (126).

⁷⁶³ *Corticosteroide* (lat. „cortex“ = Rinde; griech. „stereos“ = fest), kurz *Corticoide* oder *Cortine*, veraltet *Kortikosteroide* bzw. *Kortikoide*, sind eine Gruppe von ca. 50 in der *Nebennierenrinde* (NNR) gebildeten Steroidhormonen, sowie chemisch vergleichbarer synthetischer Stoffe. Alle Corticoide entstehen dabei aus dem Ausgangsstoff *Cholesterin*. Gemeinsames Grundgerüst der Hormone ist das *Progesteron* (127).

⁷⁶⁴ Ursache

⁷⁶⁵ *Phosphoenol-Pyruvat-Carboxykinase*

1.14.3.1. Nitrofenwirkung und die Induktion der CDH-Frequenz

Nitrofen wurde, wie bereits genauer beschrieben, in der EU und den USA um 1980 vom Markt genommen, aber es zeigt sich ein immer noch vorhandener Gebrauch dieses Teratogens in Asien und auch in den Ländern des ehemaligen Ostblocks.

Die Substanz Nitrofen wirkt am Nagetiermodell mild krebserregend, aber stark teratogen und führt zu verschiedenen Anomalien, wie der CDH, verschiedenen Herzdefekten und Defekten bzw. Anomalien der *Harder'schen Drüse*⁷⁶⁶. Die Harder'sche Drüse umgibt den Nervus opticus wie eine Membran und ist bei Nagetieren größer als beim Menschen.

Sie produziert *Melatonin*⁷⁶⁷, Lipide und *Protoporphyrin IX*⁷⁶⁸, wobei die Bildung des Letzteren zumeist durch Stress hervorgerufen wird [830,856-859].

An Mäusemodellen variieren sowohl die Häufigkeit der CDH, als auch die mit ihr assoziierten angeborenen Defekte sehr weit.

Zum Beispiel führten Gray *et al.* [860] eine Studie durch, in welcher am Mäusemodell Dosen von Nitrofen in Höhe von 6,25 bis zu 200 mg/kg/Tag verabreicht wurden. Die Häufigkeit der beobachteten CDHs war nur 6% und wurde nur unter den höchsten Dosen erreicht. In einer anderen bereits erwähnten Studie, berichtete Iritani von einer CDH-Frequenz von bis zu 80%, die unter Verabreichung einer Nitrofendosis von 2,5 mg/g Futter für variable Zeitphasen erreicht wurde [584]. Wickman und Mitarbeitern berichten von einer CDH-Frequenz von 25%, nach Verabreichung einer Nitrofendosis von 500 mg/kg/Tag (insgesamt ca. 17,5 mg Nitrofen) [861].

Demnach scheint die Frequenz einer CDH zumindest teilweise von der **Nitrofendosis** abzuhängen (genaueres hierzu: siehe **Kapitel 1.12.4**) [830].

Am häufigsten wurde die CDH an Mäusen beobachtet, die in frühen Stadien der Schwangerschaft, am besten vom Stadium E0 an, mit Nitrofen behandelt wurden. Dies betonte auch wieder den zeit- und dosisabhängigen Aspekt der Nitrofenwirkung. Zu den häufigsten durch Nitrofen induzierten Defekten gehören: Defekte der *Harder'schen Drüse*, Nierenagenesie, Lungenhypoplasie, *Hypertelorismus*⁷⁶⁹, *Mikrognathie*⁷⁷⁰ der Maxilla, sowie verspätete *Chondro*⁷⁷¹- und *Osteogenese*⁷⁷². Die Defekte und Größenreduktion der Harder'schen Drüse traten erst bei Mäuseembryonen auf, deren Mütter nach dem Tag 8 mit Nitrofen behandelt wurden [584,830].

Am Rattenmodell wurde die Nitrofenwirkung auch sehr genau untersucht. Die Frequenzen der hervorgerufenen CDHs waren sehr unterschiedlich und lagen laut Berichten von Kang *et al.* zwischen 11 und 89%. Die Ursachen dafür sind nicht hinreichend bekannt, es zeigte sich jedoch ebenfalls eine Dosisabhängigkeit in Bezug auf die Frequenz der CDH. Eine Dosis von 73 mg ergab eine Frequenz der CDH von 18%, während eine Dosis von 393 mg zu einer CDH-Frequenz von 89% führte. Allerdings war ein weiteres Ergebnis dieser

⁷⁶⁶ Die *Harder'sche Drüse* ist eine Drüse, die im Augenbereich liegt und ein klares Sekret bildet, das sich bei Erkrankungen rot-bräunlich färbt. Im Krankheitsfall erkennt man dieses Sekret an den Augen (speziell von Ratten und Mäusen), an der Nase und an roten Spritzern im Käfig. Oft wird dieses Sekret mit Blut verwechselt (128).

⁷⁶⁷ *Melatonin* ist ein Hormon, das von den *Pinealozyten* in der *Zirbeldrüse* (Epiphyse) – einem Teil des Zwischenhirns – aus *Serotonin* produziert wird und den *Tag-Nacht-Rhythmus* des menschlichen Körpers steuert (129).

⁷⁶⁸ *Protoporphyrin IX* ist ein Zwischenprodukt der *Häm-Synthese*.

⁷⁶⁹ Schädelanomalie mit vergrößertem Abstand der Augen (1)

⁷⁷⁰ abnorm kleiner Oberkiefer (1)

⁷⁷¹ Knorpelbildung

⁷⁷² Knochenbildung

Studien, dass die Dosis alleine nicht die einzige Variable war, die die Frequenz der CDH beeinflusste.

Auch hinsichtlich des unterschiedlichen Stammes der Ratten ergaben sich Differenzen bezüglich der CDH. Kang et al. untersuchten dies in ihrer Studie. Die Ratten vom Stamm der *Sprague-Dawley (SD)*, wie auch die *Virus-Antibody-Negative (VAN-SD)*, zeigten relativ höhere Zahlen einer CDH, als die Ratten der *Long-Evans-Hooded (LEH)*. Allerdings traten beim Stamm der *LEH-Ratten* gesteigerte Fälle von Nierenanomalien auf, während in diesem Stamm weniger Herzfehlbildungen, als bei den beiden anderen Stämmen verzeichnet wurden. Dies dürfte auf den unterschiedlichen genetischen Hintergrund zurückzuführen sein [600,830,862-867].

Wie bereits in diesem Kapitel erwähnt, hatte der **Zeitpunkt der Nitrofenverabreichung** einen klaren **Effekt auf die Seite**, auf welcher die Zwerchfellhernie auftrat, die sogenannte „*Sidedness*“ (siehe **Kapitel 1.12.5**).

Interessant ist die Tatsache, dass dieses Phänomen auch in *VAD-Modellen* an Ratten auftrat, in welchen Retinolverabreichung zu frühesten Zeitpunkten vorwiegend zu linksseitigen Zwerchfellhernien führte, während spätere oder keine Verabreichung von Vitamin A zu rechtsseitigen Hernien führte. Demnach spielt der Zeitpunkt der Nitrofen- bzw. der Vitamin A-Verabreichung eine entscheidende Rolle in Bezug auf die *Sidedness*⁷⁷³ der CDH-Entstehung [830,867].

Der Zeitpunkt der Nitrofenverabreichung scheint auch das Spektrum der mit einer CDH assoziierten Anomalien zu beeinflussen. Viele dieser Defekte betrafen nach den Schilderungen von Yu *et al.* das kardiovaskuläre System, wenn die Nitrofengabe am Tag 9,5 durchgeführt wurde. Die betroffenen Feten zeigten ein verringertes Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht, Anomalien der *Arteria subclavia*, *atrioventrikuläre Septumdefekte*, *Transposition der großen Arterien (TGA)*, *Fallot'sche Tetralogie*, Agenesie des *Ductus arteriosus Botalli* und *Defekte des Ausflusstraktes der Aorta*. Zu späteren Zeitpunkten (E8-16) verabreichtes Nitrofen führte vorwiegend zu Anomalien der *Harder'schen Drüse* [830,865,866,868].

Nitrofen könnte, in Bezug auf seine Wirkung, auch in die Vitamin A- und Vitamin A-Säure-Homöostase eingreifen. Thebaud *et al.* vermuteten, dass Nitrofen die CDH über eine Interferenz mit dem Signalweg der Vitamin A-Säure während der fetalen Entwicklung hervorrufen könnte [864]. Diese Hypothese stützte sich auf die Beobachtung von Babiuk *et al.*, dass die Frequenz der Nitrofen-induzierten CDH durch gleichzeitige Verabreichung von Retinol oder Vitamin A-Säure reduziert werden konnte [329,830]. Vitamin A-Säure scheint, wie von Montedonico und Mitarbeitern beobachtet, auch die mit der CDH assoziierte pulmonale Hypoplasie, über eine Induktion der Steigerung von Verzweigungsvorgängen des Lungengewebes, mildern zu können [869].

Andere Studien an Mausembryonen führten zu den Ergebnissen, dass Nitrofen den Signalweg der Vitamin A-Säure durch die Expression von responsiven Elementen der Vitamin A-Säure (RARE-lacZ), die ein Reporter-Konstrukt bildeten, zu hemmen vermochte. Um den Mechanismus der Inhibition der Vitamin A-Säure durch Nitrofen genauer zu beschreiben, wurde die Hypothese aufgestellt, dass Nitrofen direkt die Oxidation von Retinaldehyd zu Vitamin A-Säure hemmen könnte. Mey *et al.* zeigten, dass Nitrofen mit der *Retinaldehyd-Dehydrogenase* zu interferieren vermochte und ihre

⁷⁷³ die Seitlichkeit

Aktivität beeinflussen konnte. Diese war die erste Studie, die den Nitrofenmechanismus und seinen direkten Eingriff in den Retinol-Signalweg aufzeigte [570,574,830].

Eine weitere Annahme, die von Nakazawa *et al.* aufgebracht wurde besagte, dass Nitrofen auch in den Mechanismus der *Retinol-Speicherung* eingreifen könnte. Retinol wird primär, nach Veresterung zu *Retinaldehyd* durch die LRAT⁷⁷⁴, in der Leber gespeichert. Nakazawa und Kollegen fanden heraus, dass die Menge der *Lrat*-mRNA in Lungen nach Nitrofen-Exposition im Vergleich zur Kontrollgruppe abnahm. Dies führte laut Angabe der Autoren zu einer verringerten Speicherkapazität für Retinol und damit zu einem verringerten Gesamt-Retinol (Retinol und Retinylester). Die niedrigen Retinol-Levels in der Lunge könnten auch durch eine verminderte Retinol-Aufnahme aus dem Serum oder eine vermehrte Oxidation zu Vitamin A-Säure zustande kommen. Sowohl die Retinol-Levels im Serum, als auch die Expression von *Crbp1*⁷⁷⁵, *Aldh1a3*⁷⁷⁶, *Rarα*, *Rarβ* und *Rxra*, waren in den Lungen der Nitrofen-Gruppe erhöht, so dass beide oben genannten Möglichkeiten in Frage kommen. Allerdings spricht die in der Nitrofen-Gruppe beobachtete Abnahme der mRNA des oxydativen Enzyms *Cyp26β1* gegen eine vermehrte Oxidation von Retinol zu Vitamin A-Säure [830,870,871].

Die Reduktion der Größe der Harder'schen Drüse wurde in beiden Modellen, sowohl dem Nitrofen-, als auch dem VAD-Modell beobachtet. Interessanterweise war eine Agenesie der Harder'schen Drüse auch unter Knockout-Mäusen des *Rarg* zu finden, was wiederum für einen durch Nitrofen geänderten Vitamin A-Säure-Signalweg spricht [830,872,873].

1.15. Herabregulierung des IGFBP-3 und -5 an Lungen mit Nitrofen-induzierter Hypoplasie

Der Signalweg der Vitamin A-Säure könnte, wie bereits zuvor beschrieben, eine Rolle bei der Entstehung der CDH spielen. Wenn Vitamin A-Säure einmal in der Zelle synthetisiert wurde, wandert sie in den Zellkern und führt dort zu einer Veränderung des Musters der Genaktivität, indem sie an Liganden-aktivierte nukleäre Transkriptionsfaktoren bindet [874].

Es gibt, wie zuvor erwähnt, zwei Klassen der Transkriptionsfaktoren: RAR und RXR. Die RAR-RXR-Heterodimere arbeiten als funktionelle Einheit bei der Übersetzung des Signals auf der Genebene. Regulationsstörungen und Abweichungen im Vitamin A-Säure-Signalweg wurden bei der CDH und der mit ihr assoziierten Lungenhypoplasie beschrieben. Allerdings ist hierbei der exakte Mechanismus der CDH-Wirkung noch nicht geklärt [874-875,876,877].

Das System der IGFs⁷⁷⁷, das aus IGF-1, IGF-2 und ihren Rezeptoren, IGF-1R, IGF-2R und dem IR⁷⁷⁸ besteht, spielt eine Schlüsselrolle in der kindlichen Lungenentwicklung.

Die IGFs im Serum und den extrazellulären Flüssigkeiten werden mit einer Vielzahl von Bindungsproteinen, den IGF-BPs⁷⁷⁹ komplexiert, die durch ihre Bindungsfähigkeit für die verschiedenen IGFs charakterisiert sind. Sechs verschiedene IGF-BPs (IGFBP-1 bis -6) binden die IGFs mit einer hohen Affinität und sind mittlerweile gut bekannt.

⁷⁷⁴ *Lecithin-Retinol-Acyltransferase*

⁷⁷⁵ das Cellular Retinol Binding Protein 1 ist an der zytoplasmatischen Bindung von Retinol beteiligt (130).

⁷⁷⁶ *Raldh1a3: Retinaldehyd-Dehydrogenase 3*

⁷⁷⁷ Insuline-like growth factors

⁷⁷⁸ Insulin-Rezeptor

⁷⁷⁹ Insulin-like growth factor binding-proteins

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Die IGF-BPs 2 bis 5 wurden auch in der fetalen Lunge gefunden. Alle IGF-BPs hemmen die Wirkung der IGFs, aber IGF-BP-3 und IGF-BP-5 können die Wirkung der IGFs auch potenzieren.

Durch die Modulation von IGF-abhängigen, extrazellulären Mechanismen steuern IGF-BP-3 und IGF-BP-5 das Zellwachstum und auch intrazelluläre Mechanismen sind bekannt, die von ihnen durch einen Signalweg über Zelloberflächen-Rezeptoren von IGF-BPs gesteuert werden. In der sich entwickelnden Rattenlunge werden *Igfbp-3* und *-5* nicht nur im proximalen Epithel der Luftwege, sondern auch im interstitiellen und perivaskulären Mesenchym exprimiert und es zeigte sich ein Anstieg dieser Expression mit fortschreitender Schwangerschaft [874,878-881].

Schedlich und Mitarbeiter berichteten über eine Interaktion von IGF-BP-3 und *-5* mit dem Vitamin A-Säure-Signalweg (RSP) via Bindung an den RXR- α ⁷⁸⁰ und die Aktivierung seiner transkriptionellen Funktion [882].

Deshalb nahmen Rutenstock *et al.* an, dass die Störung des RSP durch die reduzierte Expression von *Igfbp-3* und *-5* in der Nitrofen-induzierten, fetalen hypoplastischen Lunge zustande kommen könnte [874].

1.15.1. Die mRNA-Expression des *Igfbp-3* und *Igfbp-5* in fetalen Rattenlungen

Es zeigte sich in der hier beschriebenen Studie von Rutenstock und Mitarbeitern, die an Nitrofen-exponierten Ratten durchgeführt wurde, eine signifikante Reduktion der mRNA-Levels des *Igfbp-3* am D21⁷⁸¹ in den Lungen der fetalen Nitrofen-Gruppe, im Vergleich zur fetalen Kontrollgruppe. Allerdings konnten die Autoren diese Differenzen bezüglich der Expression der mRNA-Levels zum Zeitpunkt D18 nicht erkennen.

Die Levels der mRNA-Expression des *Igfbp-5* der Feten der Nitrofen-Gruppe waren am Tag 18 im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls signifikant reduziert, allerdings zeigten sich hier keine solchen Unterschiede am Tag 21 [874].

1.15.2. Proteinexpression von *Igfbp-3* und *-5*

Um herauszufinden, ob sich die Reduktion der Transkripte von *Igfbp-3* und *-5* auch auf die Immunreaktivität der Proteine auswirkte, wurden von den Autoren in dieser Studie auch immunhistochemische Analysen durchgeführt. Die Untersuchung ergab, dass am Schwangerschaftstag 18 eine diffuse Expression des *Igfbp-3*-Proteins, sowohl im proximalen alveolären Epithel, als auch im mesenchymalen Kompartiment der Lungen vorgefunden wurde, jedoch fielen dabei keine Unterschiede in der Immunreaktivität auf. Hingegen zeigte sich am Tag 21 die Immunreaktivität von *Igfbp-3* in den CDH-Lungen deutlich reduziert, während man in den Lungen der Kontrollgruppe eine starke *Igfbp-3*-Proteinexpression beobachten konnte [874].

Am Tag 18 war die Proteinexpression von *Igfbp-5* im proximalen alveolären Epithel und dem mesenchymalen Kompartiment lokalisiert und es zeigte sich eine Abnahme der Immunreaktivität von *Igfbp-5* in den CDH-Lungen. Hingegen fiel den Autoren am Tag 18 in der Kontrollgruppe eine starke Expression von *Igfbp-5* in beiden Kompartimenten auf. Im Gegensatz dazu, wurden diesbezüglich am Tag 21 keine Unterschiede beschrieben [874].

⁷⁸⁰ Retinoid-Rezeptor-Alpha

⁷⁸¹ Schwangerschaftstag 21

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Vitamin A und seine Derivate, die Retinoide, sind für die fetale Lungenentwicklung von essentieller Bedeutung. Das Nitrofen-Rattenmodell der CDH wurde wissenschaftlich untersucht, um herauszufinden, inwiefern sich eine Veränderung im Vitamin A-Säure-Signalweg auf die Pathogenese einer Lungenhypoplasie auswirken könnte.

In einer solchen Studie fanden Mey *et al.* an genetisch veränderten Mäusen eine Suppression der *retinoid-responsiven Elemente* durch Nitrofen heraus. Es fiel diesen Forschern auch auf, dass Nitrofen die RALDH2, das Enzym, das für den letzten Schritt in der Vitamin A-Säure-Synthese verantwortlich ist, *in vitro* hemmt [570,874,883,884].

In früheren Studien wurde bereits vermerkt, dass Nitrofen die Speicherung von Vitamin A und die Expression von Genen, die im RSP involviert sind, in hypoplastischen Lungen veränderte. Ebenso wurde, wie bereits erwähnt, bestätigt, dass die Verabreichung von Vitamin A-Säure die Nitrofen-induzierte Lungenhypoplasie an Lungenexplantaten sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* aufzuheben vermochte. Diese Beobachtungen weisen stark darauf hin, dass Retinoide in die Pathogenese der hypoplastischen, mit einer CDH assoziierten Lunge, involviert sein könnten und Nitrofen seine Wirkung über eine Interferenz mit dem RSP ausüben könnte [869,874,885].

Die IGFBPs gehören einer Familie von Proteinen an, die die IGFs hochspezifisch und -affin binden und damit die IGF-Aktivität modulieren, indem sie die Bindung von IGF an den IGF-Rezeptor inhibieren, oder aber auch potenzieren [881].

IGFBP-3 und -5 sind für ihre Fähigkeit bekannt, extrazelluläre IGFs reversibel zu *sequestrieren*⁷⁸² und damit das Zellwachstum zu modulieren. In einigen wissenschaftlichen Berichten wurde allerdings die Ansicht vertreten, dass IGFBP-3 und -5 auch sehr wichtige IGF-unabhängige *Effekte* auf das Zellwachstum durch die Modulation der Genexpression ausüben könnten [880]. So wurde von Liu und Kollegen darüber berichtet, dass IGFBP-3 und -5 z. B. mit dem Rezeptor RXR- α , einem nukleären Transkriptionsfaktor im Vitamin A-Säure-Signalweg, IGF-unabhängig interagieren könnten [874,886].

Internalisiertes IGFBP-3 oder -5 bindet an Importin- β ⁷⁸³ und wird so durch den *Kernporenkomplex*⁷⁸⁴ in den Zellkern transloziert, wo es auf den RXR verstärkend wirkt und die transkriptionelle Aktivität der RXRE⁷⁸⁵-abhängigen Genen beeinflusst. Nachdem RXR- α in fetalen Lungen exprimiert wird, könnten IGFBP-3 und -5 das Lungenwachstum durch Stimulation der transkriptionellen Aktivität von RXR- α modulieren [874,879,887].

In der hier zusammengefassten Studie von Ruttenstock *et al.* wurde, wie oben beschrieben, eine signifikante Abnahme der *Igfbp-3*-Genexpression am Gestationstag 21 in den Nitrofen-exponierten, hypoplastischen CDH-Lungen im Vergleich zur Kontrollgruppe bemerkt. Ein ebenfalls signifikanter Abfall betraf die *Igfbp-5*-Genexpression am Tag 18 im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die immunhistochemischen Untersuchungen deuteten auf eine Abnahme der *Igfbp-3*-Immunoreaktivität, sowohl in den proximalen alveolären

⁷⁸² Unter *Sequestrierung* wird das intrazelluläre Einlagern von Rezeptoren (u. ä.) nach deren *Internalisierung* (Rückzug von Rezeptoren von der Zelloberfläche in das Zellinnere) verstanden (131).

⁷⁸³ *Importine* sind Proteinkomplexe in Eukaryoten, die den Transport von Proteinen vom Cytoplasma einer Zelle in ihren Zellkern erleichtern. Importine erkennen und binden die *NLS-Sequenz* auf Proteinen und der so entstandene Komplex bindet seinerseits an den *Kernporenkomplex (NPC)*, der unter Energieverbrauch in den Zellkern geschleust wird (132).

⁷⁸⁴ *NPC: Nuclear Pore Complex* (engl.), Kernporenkomplex

⁷⁸⁵ *Retinoid X-DNA-Response Element* (engl.): Retinoid X-DNA-responsives Element

Epithelzellen, als auch in den mesenchymalen Zellen am D21 in den Nitrofen-exponierten hypoplastischen Lungen hin. Ebenso war die Intensität der Proteinexpression von Igfbp-5 am D18 in den hypoplastischen Lungen reduziert [874].

Die mRNA-Expressionen des *Igfbp-3* und *-5* variierten im Verlauf der Schwangerschaft und jene des *Igfbp-3*-Gens wurde nur in späteren Schwangerschaftsstadien mittels einer Analyse der *In-Situ-Hybridisierung* sichtbar. Es zeigte sich in dieser Studie erstmalig eine Herabregulierung der Gen- und Proteinexpression von Igfbp-3 und *-5* während der späteren Schwangerschaftsstadien in Nitrofen-induzierten hypoplastischen Lungen. Nach den Ergebnissen dieser Studie vermuten die Autoren, dass Nitrofen die pulmonale, mit einer CDH assoziierte Hypoplasie über eine Herabregulierung der Genexpression des *Igfbp-3* und *-5* während der mittleren bis späten Phase der Lungenentwicklung durch eine Interferenz mit dem durch RXR- α mediierten Vitamin A-Säure-Signalweg induzieren könnte. Es sind hier allerdings laut Meinung der Autoren noch genauere Untersuchungen erforderlich [874,880].

1.16. IGF-1 und -2, deren Rezeptoren und ihre Wirkung auf die fetale Lungenentwicklung

Sowohl IGF-1, als auch IGF-2 und deren Rezeptoren IGF-1R und IGF-2R spielen vor allem während später Stadien der fetalen Lungenentwicklung eine entscheidende Rolle. Die Expression der *IGF-1*-mRNA wurde hauptsächlich in mesenchymalen Zellen des Lungengewebes, und jene der *IGF-2*-mRNA vorwiegend innerhalb des fetalen Lungenepithels nachgewiesen [800].

Die IGFs sind kleine Peptidhormone und weisen bezüglich ihrer Sequenz eine Ähnlichkeit von nahezu 62% auf. Sie sind homolog zu Proinsulin und werden von fast allen Körperzellen produziert. Wie in einem Review von Hiden *et al.* [888] beschrieben, besteht aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit eine gewisse Überlappung in Bezug auf ihre Rezeptor-Bindungsaffinität auf der einen, und eine Wechselwirkung zwischen Insulin und den IGFs auf der anderen Seite. Allerdings binden Insulin und IGF-1 hauptsächlich an den Insulinrezeptor (IR) und den IGF-1R.

Im Gegensatz dazu, bindet IGF-2 ebenfalls an den IGF-1R, aber auch an eine IR-Isoform, die durch ein Fehlen des Exons 11 charakterisiert ist und darum als IR 11- bezeichnet wird. Die Affinität zwischen IGF-2 und dem IR 11- ist dabei nur wenig geringer, als jene zwischen diesem Rezeptor und Insulin, während die Bindung von IGF-1 an den IR 11- keine physiologische Relevanz erreicht.

Die Bindungsaffinität von IGF-2 bezüglich des IGF-1R ist jener von IGF-1 vergleichbar, aber Insulin bindet dort nur schwach.

Die IGFs modulieren, wie bereits beschrieben, die Proliferation und Differenzierung der Gewebe auf auto-, oder parakrinem Signalweg und regulieren damit das schnelle Lungenwachstum in der embryonalen Periode.

Wie in dieser Einleitung bereits erwähnt, verursachte eine Deletion, sowohl der Igfs, als auch der Igfrs, an transgenen Mäusen eine verzögerte Lungenreifung und pulmonale Hypoplasie, die den perinatalen Tod durch Atemversagen zur Folge hatte. Man stellte fest, dass etwa 60% der *Igf-1*-Knockout-Mäuse aufgrund eines Atemversagens in der perinatalen Periode verstarben. Bei *Igf-2*-Knockout-Mäusen beobachtete man eine unreife Lunge mit dickeren alveolären Septen und dürftig entwickelten Alveolen, wenn man sie mit Wildtyp-Mäusen verglich.

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Die Mäuse mit einem Knockout des *Igf-2r* wiesen im Schnitt ein um 30% höheres Gewicht als die Wildtyp-Mäuse auf, verstarben aber, den Beobachtungen von Wang *et al.* folgend, in der Neonatalperiode an Lungenanomalien und zahlreichen Organfehlbildungen [648,888-896,967].

Die sechs bisher beschriebenen IGFBPs zirkulieren im Plasma und binden die IGFs mit einer höheren Affinität, als ihre Rezeptoren und sequestrieren sie dadurch. So wird ein endokriner IGF-Transport ermöglicht und die Halbwertszeit der IGFBP-gebundenen IGFs verlängert.

Außerdem wurde beobachtet, dass die IGFBPs mit Zellmembranen oder der extrazellulären Matrix assoziiert sein können und damit den lokalen Pool der IGFs zu regulieren vermögen. Die IGF-Bindung kann durch Modifizierung der IGFBPs durch Proteolyse, Phosphorylierung und Glycosylierung beeinflusst werden.

An nicht-schwangeren Frauen konnte beobachtet werden, dass IGF-1 einen Bestandteil eines Komplexes aus IGFBP-3 und einer säurelabilen Untereinheit darstellte. Das Serum schwangerer Frauen enthält allerdings eine placenta-derived IGFBP-3 protease, die IGFBP-3 in kleinere Fragmente zerlegt, die dann eine geringere Affinität zu den IGFs aufweisen. Dadurch wird die Menge der IGFs, die für die Bindung an ihre Rezeptoren der mütterlichen Plazenta verfügbar sind, beeinflusst.

Die *alkalische Phosphatase* der Plazenta dephosphoryliert das IGFBP-1 bei schwangeren Frauen und reduziert dadurch seine Affinität zu IGF-1, allerdings bleibt jene zu IGF-2 davon unbeeinflusst. Das Bindungsverhalten zwischen IGF-2 und IGFBP-1 wird durch proteolytische Aufspaltung des nicht-phosphorylierten IGFBP-1 durch die Matrix-Metalloproteinasen MMP3 und MMP9 verändert.

Nelson *et al.* [906] beschrieben einen Zusammenhang zwischen den erhöhten IGFBP-3-Levels im Nabelschnurblut von schwangeren Müttern mit Typ-I Diabetes mellitus, den IGF-1-Levels und der Inzidenz einer kindlichen Makrosomie.

Diese Beobachtung deckt sich mit jener aus anderen Studien, in welchen eine Korrelation zwischen den IGF-1-, IGFBP3-Levels und dem Geburtsgewicht beschrieben wurde [888,897-907].

In ihrer Studie untersuchten Nagata und Mitarbeiter [967] die mRNA-Expression des *Igf-1* und *-2*, sowie deren Rezeptoren *Igf-1r* und *-2r* im Lungengewebe von fetalen Mäusen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Ebenso sollte in ihren Untersuchungen die Einwirkung von IGF-1 und *-2* auf Kulturen von fetalem Lungengewebe dieser Mäuse beurteilt werden.

Bezüglich der *Igf-1*-mRNA-Expression wurden in den murinen Lungengeweben zum Zeitpunkt E13,5-14,5 signifikant höhere Werte verzeichnet, als im Stadium E11,5-E12,5. Ähnlich verhielt es sich mit den gemessenen Expressions-Werten zum Zeitpunkt E15,5-E16,5, die ebenfalls signifikant höher waren, als jene im Stadium E17,5-E18,5. Die Expression der *Igf-2*-mRNA war zum Zeitpunkt E17,5-E18,5, verglichen mit jener in allen anderen Stadien, signifikant reduziert. Die Expression des *Igf-1r* war zum Zeitpunkt E13,5-E14,5 signifikant höher, als im Stadium E11,5-E12,5 und auch bezüglich dieses Rezeptors zeigte sich eine signifikant höhere Expression im Stadium E17,5-E18,5, als in E15,5-E16,5. Der Expression des *Igf-2r* wurde in dieser Studie von Nagata *et al.* ein ähnliches Verhalten zugeschrieben [967].

Die immunhistochemische Analyse der Lungengewebe ergab, dass die Zahl der für das TTF1-Protein positiven Zellen, das hauptsächlich in den Zellkernen des bronchialen und respiratorischen Epithels, und dabei besonders innerhalb der distalen Alveolarepithelzellen

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

exprimiert wurde, innerhalb der Kulturen, die mit jeweils 500 ng/ml IGF-1 (Gruppe II), oder IGF-2 (Gruppe III) behandelt wurden, wesentlich höher war, als in den Zellen, die mit Serum-freiem Medium behandelt wurden (Gruppe I).

TTF1 könnte laut Berichten von Zhou *et al.* die Expression von SP-C mediiieren. Das Staining für α -SMA führte in dieser Untersuchung zu dem Ergebnis, dass positive Zellen für diesen Marker in der Gruppe I innerhalb der Muskelschichten der Arterien, der Trachea und der Bronchien gefunden wurden. In Gruppe II und III wurden sie zusätzlich in den Myofibroblasten nachgewiesen.

Nagata und Mitarbeiter verzeichneten in ihrer Untersuchung eine Zunahme der Expression des α -SMA. Die positiven Zellen waren vorwiegend Myofibroblasten und es wurde von den Autoren demnach eine Förderung der Vasculogenese durch die IGFs in den späten Phasen der Lungenentwicklung postuliert.

Auch die Zahl der PCNA-positiven Zellen wurde analysiert und dabei ergab sich eine signifikant höhere Anzahl dieser Zellen in den Gruppen II und III, wenn man sie mit jener der Gruppe I verglich. Dies ließ den Schluss zu, dass die IGFs die Proliferation aller Zelltypen in der späten Phase der Lungenentwicklung stimulierten.

Innerhalb des distalen Lungenepithels beschrieben die Autoren eine signifikante Zunahme der Expression des ProSP-C Proteins (lokalisiert im Zytoplasma der Epithelzellen in den distalen Lungenknospen) und die Anzahl der ProSP-C-positiven Zellen war in den Gruppen II und III signifikant höher, als jene in der Gruppe I.

Wissenschaftliche Berichte deuteten darauf hin, dass ProSP-C in enger Verbindung zur Verteilung der Typ II-Alveolarepithelzellen stehen könnte und die Intensität seines Stainings stieg während der fetalen Periode an.

Nagata *et al.* gingen davon aus, dass die IGFs an ihre Rezeptoren binden und damit zu einer Induktion der TTF1-Expression und, in weiterer Folge, den Anstieg der ProSP-C-Expression hervorrufen könnten.

Diesbezüglich sei hier auch eine Studie von Masumoto *et al.* [908] erwähnt, in welcher ein Anti-IGF-1R-Antikörper in Kulturen von menschlichem fetalen Lungengewebe zu einer schweren Reifungsstörung der Lungengefäße führte [909,967].

Frühere Untersuchungen brachten die Erkenntnis, dass IGF-1 als Wachstumsfaktor eine wichtige Rolle in den späten Stadien der Lungenentwicklung spielte, während IGF-2 dieses Verhalten sowohl in der embryonalen, als auch in der fetalen Periode aufwies. Beide, sowohl IGF-1, als auch IGF-2, binden an den IGF-1R und regulieren damit wichtige Signalwege in der Lungenentwicklung. Es wird angenommen, dass auch der IGF-2R die beiden IGFs binden könnte [647,648,967].

Nagata und Mitarbeiter beschrieben in ihrer Studie, dass die Produktion der IGF-1- und IGF-2-Proteine in einem früheren Stadium der Lungenentwicklung auftrat, als das für die Bildung des IGF-1r und -2r in den Zellmembranen der Fall war, welche dort erst in den späteren Stadien nachweisbar waren. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die IGFs eine entscheidende Rolle in der späten Lungenentwicklung spielen und ihre Wirkung über die in diesen späten Phasen gesteigerte Anzahl der IGFs mediiieren könnten. Nachdem die fetale Behandlung mit den beiden IGFs in dieser Studie das Lungenwachstum und die Vasculogenese induzieren konnte, wäre demzufolge von einer solchen Therapie eine Verbesserung des Outcomes von Patienten mit schwerer CDH, über eine Verbesserung der Lungenhypoplasie und eine Steigerung der Lungenreife, zu erwarten [967].

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Die Ergebnisse einer neueren Studie von Esumi *et al.* [910] aus dem Jahr 2011 sollen hier ebenfalls zusammengefasst werden. Darin wurden die Auswirkungen des Zusatzes von IGF-1 und -2 zu Kulturen von Nitrofen-exponierten Rattenlungengeweben untersucht.

Die Autoren stellten, bei Zusatz einer Dosis von jeweils 500 ng/ml IGF-1 bzw. IGF-2 zu den Lungengewebekulturen fest, dass es in der IGF-2-Gruppe nach einer Behandlungsperiode von 48 Stunden zu einem signifikanten Anstieg der mRNA-Expression des *Ttf1* und *T1 α* kam. Auch die Expression des α -Sma war in dieser Gruppe gesteigert, erreicht aber keine Signifikanz.

Nach einer Zeitspanne von 48 Stunden war auch bezüglich der *Ttf1*- und *T1 α* -mRNA-Expression eine signifikante Differenz zwischen der IGF-1- und der IGF-2-Gruppe zu verzeichnen. Allerdings waren in dieser Studie zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll- und der IGF-1-Gruppe zu erkennen [910].

Die immunhistochemische Analyse ergab laut Bericht der Autoren eine Abnahme der Anzahl der kubischen *Ttf1*-positiven Zellen im distalen Lungenepithel der IGF-2-Gruppe. Nur innerhalb dieser IGF-2-Gruppe wurde auch eine morphologische Veränderung dieser Zellen von einer kubischen zu einer abgeflachten Form beobachtet. Bezüglich des *T1 α* -Proteins, als Marker der AEC vom Typ I, und des α -Sma-Proteins fielen Esumi und Kollegen jedoch keine Unterschiede auf [910].

Ein wichtiger Schritt der Lungenentwicklung in späten Schwangerschaftsstadien ist die Differenzierung von Typ II- in Typ I- Alveolarepithelzellen (AECs). Wie aus verschiedenen wissenschaftlichen Berichten bekannt ist, wurde eine Verschlechterung dieser Differenzierung an Lungen von Ratten mit Nitrofen-induzierter CDH beobachtet. Die IGFs könnten diese Differenzierung während der fetalen Periode induzieren.

In ihrer Studie demonstrierten Esumi und Mitarbeiter, dass nur innerhalb der IGF-2-Gruppe ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression der Marker der AECs vom Typ I und II auftrat.

Auch die Gestaltsveränderung der *Ttf1*-positiven Zellen wurde nach der Inkubation mit IGF-2 beobachtet. Die AECs vom Typ II werden als Vorläuferzellen der AECs vom Typ I angenommen und die morphologischen Veränderungen sind für ihre Reifung unerlässlich. Demnach vermuten die Autoren, dass der Anstieg der mRNA-Expression der Marker dieser Zellen in der IGF-2-Gruppe den Reifungsprozess widerspiegeln könnte.

Die biologischen Funktionen von IGF-1 und -2 werden, wie bereits beschrieben, über ihre Rezeptoren reguliert. Der IGF-2R bindet hauptsächlich IGF-2 mit hoher Affinität, interagiert aber auch minimal mit IGF-1 und Insulin.

Esumi *et al.* vermuten, dass in ihrer Studie die Effekte von IGF-2 nicht nur über den IGF-1R, sondern auch über den IGF-2R mediiert worden sein könnten. Von beiden Rezeptoren ist laut Ruttenstock *et al.* [911] (siehe unten) bekannt, dass sie sowohl im Alveolarepithel, als auch in mesenchymalen Zellen der CDH-positiven Rattenlungen nachgewiesen werden konnten. Demnach waren Esumi und Mitarbeiter der Ansicht, dass eine intraamniotische oder intratracheale Applikation von IGF-2 die Lungenreifung am Nitrofen-induzierten CDH-Rattenmodell verbessern könnte. Zum Zeitpunkt der Geburt konnten sowohl der IGF-1r, als auch der IGF-2r in normalen Rattenlungen nachgewiesen werden. Somit könnten die Rattenlungen auf die Behandlung mit den IGFs ansprechen. Basierend auf den Ergebnissen ihrer Studie gehen Esumi und Kollegen davon aus, dass im Speziellen IGF-2 die Reifung der hypoplastischen CDH-Lungen fördern könnte [892,910-913].

1.16.1. Der Insulinrezeptor (IR)

Die Insulinrezeptor-Genexpression wurde vorwiegend auf den Typ II-Pneumozyten nachgewiesen. Glucose und ihre über den IR regulierte Aufnahme in diese Zellen ist

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

besonders in der fetalen Lunge während der späteren Phasen der Schwangerschaft notwendig, denn sie stellt ein wichtiges Substrat für die Synthese der Surfactant-Phospholipide dar. Nachdem der IR die Aufnahme von Glucose steuert, könnte er auch ein wichtiger **Regulator der Surfactant-Biosynthese** sein.

Bei Kinder von an Diabetes mellitus leidenden Müttern wurde eine gesteigerte Häufigkeit des Auftretens eines kindlichen RDS beobachtet und dies könnte mit der Downregulation der IRs in der fetalen Lunge im späten fetalen Leben zusammenhängen, denn dadurch wird auch die Verfügbarkeit von Glucose, als Substrat für die Surfactant-Synthese, reduziert. Ruttenstock und Mitarbeiter [914] führten eine Studie durch, um die Herabregulierung der Genexpression des *IR* in fetalen Rattenlungen in späten Stadien der Lungenentwicklung am Nitrofen-induzierten CDH-Modell zu untersuchen [914-918].

In dieser Studie zeigte sich, dass die mRNA-Expressionslevels des *IR* der Rattenlungen am Tag 21 (D21), sowohl in Lungengeweben von CDH-positiven, als auch CDH-negativen Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert waren. Allerdings beobachteten die Autoren diesen Aspekt zu den Zeitpunkten D15 und D18 in keiner der untersuchten Gruppen. Außerdem fiel ihnen zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied der Genexpressions-Levels des *IR* zwischen der Gruppe der CDH-positiven und jener der CDH-negativen Rattenfeteten auf.

Die immunhistochemische Analyse dieser Studie ergab, dass zu den Zeitpunkten D15 und 18 sowohl in den Kontroll-, als auch CDH-Lungengeweben eine diffuse Expression des IR-Proteins, sowohl im proximalen Alveolarepithel, als auch im mesenchymalen Kompartiment nachweisbar war. Die Immunoreaktivität deutete keine Unterschiede zwischen der CDH- und der Kontrollgruppe an. Allerdings beschrieben Ruttenstock *et al.* am Tag 21 eine starke Reduktion der Immunoreaktivität innerhalb der CDH-Lungengewebe, während in den Lungengeweben der Kontrollgruppe eine intensive IR-Proteinexpression vorwiegend im proximalen Alveolarepithel zu verzeichnen war [914].

Glick *et al.* berichteten über eine signifikante Reduktion des Gehaltes an Surfactant-Phospholipiden in der BAL⁷⁸⁶ von Lämmern mit chirurgisch-induzierter CDH. Suen und Kollegen publizierten die Ergebnisse einer Studie, in welcher sie einen verringerten Anteil an Surfactant-Phospholipiden in Lungen von fetalen Ratten mit einer Nitrofen-induzierten CDH beobachtet haben. Die Verringerung der Glucose-Aufnahme in die Typ II-AECs, die durch eine Downregulation der IR-Expression hervorgerufen werden könnte, käme als Ursache eines kindlichen Surfactant-Mangels in Frage. In jener Gruppe von Kindern diabetischer Mütter, die in einem Milieu gesteigerter Spiegel von Glucose und Insulin heranwachsen, zeigte sich ein fünffach-höheres Auftreten von Störungen der Lungenreife, als dies allgemein unter Neugeborenen beobachtet werden konnte.

Mendelson *et al.* berichteten über eine ansteigende Surfactant-Produktion der fetalen Lunge in den späten Phasen der Schwangerschaft und seine unzureichende Synthese könnte somit eine verzögerte Reifung der Lunge verursachen [586,608,914, 917,919,920].

Die Untersuchungen von Ruttenstock und Kollegen brachten insgesamt eine signifikante Reduktion der *IR*-mRNA-Genexpression in den hypoplastischen Lungen zum Zeitpunkt D21 zum Vorschein und in diesem Stadium werden die IRs für eine normale Phospholipid-Synthese und Lungenreifung benötigt. Eine Reduktion wurde zum selben Zeitpunkt auch bezüglich der IR-Protein-Expression beschrieben. Die Autoren zogen aus diesen Ergebnissen den Schluss, dass die Downregulation der *IR*-Genexpression in den

⁷⁸⁶ broncho-alveoläre Lavageflüssigkeit

hypoplastischen Lungen während der späten Stadien der Lungenentwicklung mit der Surfactant-Biosynthese interferieren und damit eine Verzögerung der Lungenreifung und die Entstehung einer Lungenhypoplasie hervorrufen könnte [914].

1.16.2. Die Effekte der IGFs auf das fetale Wachstum und die Entwicklung der Plazenta

Die Ergebnisse von *in vitro*-Studien und die *in vivo*-Feststellung des Vorkommens des IGF-2 im Bereich des extravillösen Zytotrophoblasten gaben Grund zur Annahme, dass IGF-2 an der Invasion des Zytotrophoblasten in die mütterliche Dezidua induktiv beteiligt sein könnte. Plazenten von *Igf-2*-nullizygoten⁷⁸⁷ Mäusen prägten eine geringere Anzahl an Glykogen-positiven Zellen aus, die ein hochinvasives Analogon des menschlichen extravillösen Zytotrophoblasten darstellen und zeigten innerhalb der junctionalen Zone eine Reduktion der invasiven Kapazität.

In vitro führte IGF-2 zu einer Differenzierung der *EPCs*⁷⁸⁸ in die hochinvasiven *TGCs*⁷⁸⁹, jedoch induzierte IGF-1 die Stimulation der Migration der *EPCs*. *Igf-2* wurde innerhalb der Dezidua und der Frucht von Mäusen nachgewiesen, was wiederum darauf hindeutet, dass es eine Rolle in der embryonalen Entwicklung, der Trophoblast-Invasion und der Angiogenese in der Dezidua spielen könnte. Es wird auch angenommen, dass *Igf-2* in die Förderung der Invasion der *TGCs* und Glykogenzellen über den *Igf-2r* in der Maus involviert sein könnte. [921-924].

Momentan findet die Ansicht, dass IGF-2 in der Plazenta auf autokrinem und parakrinem Weg wirken könnte, großen Zuspruch. Obwohl dies sicher sowohl in der Plazenta, als auch im Fetus der Fall ist, wurde bemerkt, dass endokrines IGF-2 der Mutter die Plazenta signifikant beeinflussen kann. Die *IGF-1*-Expression in der Plazenta ist vernachlässigbar, wogegen Transkripte des *IGF-2* in den meisten Spezies nachgewiesen werden konnten, vor allem in jenen mit einer invasiven Plazenta.

IGF-1 übt seine Effekte offenbar auf autokrine, parakrine und endokrine Weise aus, um an der Mutter die Anpassung an die Schwangerschaft, und am Fetus das Wachstum zu induzieren. Die IGF-1-induzierte Glucose- und Aminosäureaufnahme in der Plazenta scheint das Resultat mütterlicher endokriner Stoffwechselfvorgänge zu sein [921,925].

Eine frühere Studien von Roberts *et al.*, die die Auswirkungen einer Nahrungsrestriktion auf die IUGR an Meerschweinchen untersuchte, zeigte signifikant-negative Effekte der Unterernährung auf die mütterlichen zirkulierenden Spiegel von IGF-1 und-2 und in der mittleren und späten Schwangerschaft auch einen begleitenden Anstieg der zirkulierenden IGF-BPs. Dies war mit einer Verschlechterung des Wachstums des Fetus und der Plazenta verbunden. Veränderungen der Plazentafunktion korrelierten mit dem zirkulierenden IGF-2 und seinem Verhältnis zu IGF-BP-2 in der mittleren Schwangerschaft und ähnliches ließ sich auch für IGF-1, und sein Verhältnis zu IGF-BP-1 in der späten Schwangerschaft, beobachten, was eine endokrine Funktion beider IGFs andeutete. Man beobachtete auch eine Reduktion der *IGF-2*-mRNA-Expression in Folge von mütterlicher Nahrungsrestriktion [921,926-928].

In Untersuchungen von Sferruzzi-Perri und Mitarbeitern wurde bei exogener Zufuhr von IGF-1 oder -2 an mütterliche Meerschweine ein Anstieg der mütterlichen Plasmalevels dieser IGFs um 340% und 240% verzeichnet, ohne dass dabei die Levels der IGF-BPs

⁷⁸⁷ Nullmutation für *Igf-2*

⁷⁸⁸ *Ectoplacental Cone Cells* (engl.): frühe, post-implantationale, murine Trophoblast-Stammzellen

⁷⁸⁹ *Trophoblast Giant Cells* (engl.): Trophoblast-Riesenzellen

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

gesteigert wurden. Demzufolge war die Menge der freien IGFs erhöht. Die Infusion von IGF steigerte das fetale und auch das Plazentagewicht. Die IGF-1-Infusion führte in dieser Studie auch zu einer Reduktion der *IGF-2*-mRNA-Levels der Plazenta [921,929-931].

Exogenes IGF-2 führte, im Gegensatz zu IGF-1, zu einem Anstieg des Volumens der Austauschregion der Plazenta (des plazentaren Labyrinths). Interessant war für Sferruzzi-Perri und Kollegen dabei die Entdeckung, dass IGF-2, aber nicht IGF-1, wenn es an mütterliche Meerschweine in der frühen bis mittleren Schwangerschaftsperiode verabreicht wurde, zu einer Verbesserung der Differenzierung des plazentaren Labyrinths, und damit zu einer Steigerung der plazentaren Stoffwechselfunktion führte. Obwohl die Verabreichung von IGF-1 und -2 zu keiner Gewichtszunahme der mütterlichen Meerschweine führte, beobachteten die Forscher, dass IGF-1 zumindest die Beschaffenheit des mütterlichen Körpers beeinflusste, denn es reduzierte den Körperfettanteil um etwa 30% [921,314].

Sferruzzi-Perri *et al.* publizierten in einem weiteren Artikel auch ihre Beobachtung, dass IGF-1 und -2, bei Verabreichung an mütterliche Meerschweine in der frühen bis mittleren Schwangerschaftsperiode, zu einer Steigerung der plazentaren Aufnahme und des Transfers von Glucose und Aminosäuren zum Fetus führte. Vor allem IGF-1 hatte hier teils sehr potente Effekte. Beispielsweise kam es nach Verabreichung von IGF-1 an die mütterlichen Meerschweine zu einem nahezu achtfachen Anstieg des Aminosäuretransporter SNAT2.

Auf diese Weise trug IGF-1 nach Meinung der Autoren über seine Wirkung auf die Expression dieses plazentaren Transporters zum Anstieg des fetalen Wachstums bei [921,932].

Infusionen von IGF-1, die in der späten Schwangerschaft an Mutterratten verabreicht wurden, führte zu keiner Verbesserung des fetalen Wachstums, übten aber anabole Effekte auf die mütterlichen Ratten aus. Allerdings war das fetale Wachstum in der späten Schwangerschaft gesteigert, wenn die IGF-1-Behandlung über die gesamte Schwangerschaftsperiode erfolgte. Auch wenn IGF-1 laut Ansicht von Roberts *et al.* die Trophoblast-Invasion in der frühen Schwangerschaft nicht verstärkt, so wird darüber spekuliert, dass gesteigerte Spiegel von endokrinem IGF-1 in der frühen Schwangerschaft die mütterliche Adaption an die Schwangerschaft, und damit auch indirekt das fetale Wachstum und die Plazentafunktion, steigern könnte [921,933,934].

Am Fetus nimmt IGF-1 Einfluss auf die Regulation des Wachstums und dieses wird auch durch die Wirkung der IGF-BPs mediert. Folglich wurde eine positive Korrelation zwischen den Levels von IGF-1, in Assoziation mit jenen von IGF-BP-1 und -2 im Nabelschnurblut, und dem Geburtsgewicht von menschlichen Neugeborenen beobachtet. Dabei fielen mit zunehmender IGF-2R-Konzentration im Nabelschnurblut die Geburtsgewichte ab. Während die Ratio von IGF-2 zum löslichen IGF-2R im fetalen Nabelschnurblut eine positive Korrelation mit dem Geburtsgewicht aufwies, zeigte sich für IGF-2 alleine kein Zusammenhang mit dem Geburtsgewicht.

IGF-2 mediert die Steigerung der Zellproliferation über die Bindung an den IR und diese Interaktion fördert vermutlich auch das fetale Wachstum. In fetalen Geweben prädominiert die IR-A-Isoform des IR, die durch einen Mangel an Exon 11 charakterisiert ist, und diese hat eine vergleichbare Affinität für Insulin und IGF-2 (siehe **Kapitel 1.16**). Im Gegensatz dazu wird der IR-B hauptsächlich in postnatalen Geweben exprimiert, zeigt eine höhere Affinität für Insulin und mediert seine metabolischen Effekte [921,935-939].

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Am Fetus konnte auch die Expression des IGF-2R nachgewiesen werden. Seine vorwiegende Rolle spielt dieser vermutlich bei der Unterbindung der Aufnahme und des lysosomalen Abbaus des IGF-2 und damit bei der Hemmung des Wachstums. Demzufolge konnten bei einer *IGF-2R*-Genablation eine Zunahme der zirkulierenden IGF-2-Levels und eine Steigerung des Wachstums des Fetus, sowie auch der Plazenta beobachtet werden. Eine Ablation des *IGF-2*-Gens attenuierte diese Effekte wieder. Eine IUGR, die durch eine Ligatur der Uterusarterie an Meerschweinchen hervorgerufen wurde, führte zu einer Reduktion der IGF-Wirkung durch eine gesteigerte Expression der IGFBPs. Die Expression von IGF-2 in Geweben von unterernährten Feten wurde allerdings noch nicht untersucht [921,940-942].

Wie in der Publikation von Roberts *et al.* nachgelesen werden kann, ist bisher nicht bekannt, dass die IGFs die Plazenta überqueren können. So vermuten die Autoren, dass die positiven Effekte auf den Fetus, nach der IGF-Administration an die schwangere Mutter, durch die Wirkung auf die Plazenta und die Mutter zustande gekommen sein könnten.

Schon vor längerer Zeit wurde angenommen, dass Faktoren, die die plazentare Throphoblast-Invasion der Dezidua fördern, die Anzahl der Spiralarterien und damit auch den Blutfluss, der wichtig für das Wachstum und die Entwicklung des Fetus ist, erhöhen.

IGF-2 ist ein wichtiger Kontrollfaktor der mütterlichen Blutversorgung der Plazenta. Zusätzlich beeinflussen mütterliche endokrine, plazentare und fetale IGF-2-Wirkungen zusammen die Struktur und die funktionelle Differenzierung der Plazenta und damit auch das fetale Wachstum und die Entwicklung. Viele Effekte von IGF-2 werden dabei offenbar über den IGF-2R mediiert, aber auch eine Wirkung über den IGF-1R muss angenommen werden. Nachdem die Plazenta keine signifikanten Mengen von IGF-1 exprimiert, übt das mütterliche IGF-1 über den IGF-1R in der Plazenta seine Wirkung aus und beeinflusst damit ihre funktionelle Kapazität und Effizienz. Demnach nehmen Roberts und Kollegen an, dass sowohl IGF-1, als auch IGF-2 zu einer erfolgreichen Plazentation und einem erfolgreichen Schwangerschaftsverlauf beitragen [921].

1.16.3. Die Wirkung von IGF-1 auf Ratten mit akutem Nierenversagen

In einer Studie untersuchten Bohé und Mitarbeiter die Wirkung der s. c. Injektion von rekombinantem humanem IGF-1 (rhIGF-1) in einer Dosis von 50 µg/100 g KG bei Ratten mit akutem Nierenversagen⁷⁹⁰ und fanden dabei heraus, dass sich durch das applizierte rhIGF-1 die Erholung dieser Tiere beschleunigen ließ. Das akute Nierenversagen der Ratten wurde hier durch das operative Abklemmen beider *Nierenhili* induziert. Nach 72-74 Stunden zeigte sich, dass die Serumlevels von Igfbp-1 und -2 von rhIGF-1-behandelten Ratten höher waren, als von jenen der Kontrollgruppe. Die Serumlevels von Igfbp-3 wurden sowohl vom ARF, als auch von rhIGF-1 beeinflusst. Das Igfbp-4 war nur vorübergehend in der ARF-Gruppe gesteigert. Dabei fiel den Forschern auch auf, dass das verabreichte rhIGF-1 zu einer Steigerung der hepatischen *Igfbp-2*-mRNA und des Serumlevels von Igfbp-2 führte [943].

In der Niere führt IGF-1 bekannterweise zu einem Anstieg des renalen Blutflusses und der *glomerulären Filtrationsrate*⁷⁹¹, stimuliert die Zellteilung und reduziert die Apoptoserate von Tubuluszellen. Im proximalen Tubulus wird IGF-1 normalerweise nicht exprimiert. Allerdings wird es, nach ischämischen Schäden der Niere, im proximalen Tubulus und in

⁷⁹⁰ *Acute Renal Failure* (ARF)

⁷⁹¹ GFR

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Makrophagen vorübergehend exprimiert, was auf eine Wirkung von IGF-1 bei der Reparatur von Tubulusschäden hindeuten könnte [943-948].

In dieser Studie von Bohé *et al.* erreichten die Serum-Kreatininspiegel der rhIGF-1-behandelten Ratten mit ARF einen signifikant geringeren Wert, als die Kreatininspiegel jener Ratten mit ARF der Kontrollgruppe (mit Kochsalzinjektion).

Die Igfbp-1-Levels fielen in den Gruppen mit ARF und SO⁷⁹² bei Behandlung mit Kochsalzlösung signifikant unter die Basislevels (unmittelbar vor der Operation gemessen). Die Serumlevels des Igfbp-1 waren in diesen Gruppen auch nach 72-74 Stunden signifikant niedriger, wenn man sie mit den Levels der Ratten der ARF- und SO-Gruppe, die rhIGF-1 injiziert bekamen, verglich.

Der Serumlevel von Igfbp-2 stieg in den beiden Gruppen (ARF- und SO-Gruppe) bei rhIGF-1-Applikation signifikant an und war bei den ARF-Ratten mit rhIGF-1-Applikation signifikant höher, als in allen anderen Gruppen.

Die gemessenen Konzentrationen von Igfbp-3 waren innerhalb der Gruppe der ARF-Ratten mit Kochsalzinjektion höher, als in allen anderen Gruppen [943].

Bezüglich der Igfbps-2 bis -6 beschrieben Bohé *et al.* eine Tendenz zur Erniedrigung in den ARF-Gruppen mit rhIGF- und Kochsalzbehandlung im Vergleich zu den SO-Gruppen. Allerdings fiel den Autoren bezüglich des mRNA-Gehaltes des *Igfbp-2* der Leber eine signifikante Steigerung in den beiden IGF-behandelten Gruppen auf (ARF+IGF- und SO+IGF-Gruppe). Diese *Igfbp-2*-mRNA-Werte waren in den IGF-behandelten Gruppen etwa zweimal höher, als in den Gruppen mit Kochsalzinjektion. Die Autoren stellten fest, dass die erhöhten *Igfbp-2*-mRNA-Werte der Leber von gesteigerten Serumlevels des Igfbp-2 begleitet wurden [943].

Bei Ratten mit ARF waren die renalen Konzentrationen des Igf-1-Peptids und der *Igf-1*-mRNA verringert. Im Gegensatz zu gesunden Tubuluszellen der Niere, werden diese beiden Verbindungen in sich regenerierenden Tubuluszellen transient exprimiert. Nachdem IGF-1 die Erholung der Nierenfunktion beschleunigt, nehmen die Autoren an, das IGF-1 eine wichtige Rolle bei der Regeneration des ARF spielen könnte.

In ihrer Studie konnten Bohé und Mitarbeiter, mit Ausnahme der *Igfbp-2*-mRNA-Levels in der Leber, keinen Effekt der ARF- oder IGF-1-Behandlung auf die Gentranskription der sechs Igfbps in externen Geweben feststellen.

Interessant war die Beobachtung, dass die Leber-*Igfbp-2*-mRNA-Levels in beiden rhIGF-1-behandelten Gruppen gesteigert waren und durch das ARF nicht beeinflusst wurden. Dies war vermutlich auch der Grund für die ebenfalls gesteigerten Igfbp-2-Serumlevels unter den Tieren dieser Gruppen.

Es war, den Resultaten der Untersuchungen von Zapf *et al.* folgend, bereits bekannt, dass die Injektion von rhIGF-1 bei gesunden Ratten zu einem Anstieg der zirkulierenden Igfbp-2-Spiegel führte. Der Mechanismus der Steigerung der hepatischen *Igfbp-2*-mRNA könnte auch mit den Effekten von rhIGF-1 auf das Wachstumshormon⁷⁹³ und Insulin zusammenhängen. Diese beiden Hormone reduzieren nämlich bekanntermaßen die hepatische Expression und die Serumlevels von IGFBP-2.

Den Beschreibungen von Jacob *et al.* folgend, unterdrückt das rhIGF-1 die Serumkonzentrationen von GH und Insulin. Demzufolge könnte ein Abfall der Serumkonzentrationen dieser beiden Hormone, der durch rhIGF-1 induziert wird, zu einer

⁷⁹² *Sham Operation* (engl.): Schein-Operation (hier: operativer Eingriff ohne Abklemmung der Nierengefäße)

⁷⁹³ *Growth Hormone* (engl.): Wachstumshormon

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Aufhebung der Suppression der *IGFBP-2*-mRNA-Synthese in der Leber führen [943,949-960].

Bei gesunden Menschen mit Nahrungsrestriktion führte rhIGF-1 zu einem Anstieg der Serumlevels von IGFBP-1, wo hingegen das GH diesen Anstieg unterdrückte. RhIGF-1 unterdrückte auch die Sekretion von GH, was somit zum Anstieg des Serumlevels des IGFBP-1 beitragen könnte. Die Serumkonzentrationen des IGFBP-3 waren sowohl bei Nahrungseinschränkung des Menschen, als auch bei einer Niedrigprotein-Diät bei Ratten reduziert. Bohé und Mitarbeiter konnten in ihrer Studie nicht klären, warum diese Reduktion der *Igfbp-3*-Konzentration bei Ratten mit ARF, die ebenfalls einer Nahrungsrestriktion ausgesetzt wurden, nicht eintrat.

Der Spiegel des GH im Serum wird durch das ARF gesteigert und GH stimuliert die Sekretion von IGFBP-3. Demzufolge könnten gesteigerte Levels des GH für die Erhaltung der Serumlevels von *Igfbp-3* bei ARF-Ratten verantwortlich gewesen sein.

Die Fähigkeit des rhIGF-1, die Sekretion des GH zu verringern, könnte laut Annahme von Bohé und Mitarbeitern auch erklären, warum in ihrer Studie die Serumlevels des *Igfbp-3* in der Gruppe der ARF-Ratten mit Kochsalzbehandlung höher war, als in der Gruppe der ARF-Ratten mit rhIGF-1-Behandlung [943,961-966].

Zusammengefasst kommen Bohé *et al.* in ihrer Studie zu dem Schluss, dass beide, sowohl das ARF, als auch das rhIGF-1, die Serumkonzentrationen der *Igfbps*, unabhängig voneinander, aber auch teils gemeinsam, beeinflussen.

Das ARF beeinflusst die Expression der *Igfbps-1* bis *-6* und des *Igf-1r* in der Niere, wo hingegen rhIGF-1 die mRNA-Expression des hepatischen *Igfbp-2* steigert. Die durch das ARF und rhIGF-1 bewirkten Effekte werden laut Ansicht der Autoren durch den Typ und Schweregrad der renalen Schädigung und die Nahrungsaufnahme der Tiere mediiert [943].

1.17. Fragestellungen

In dieser wissenschaftlichen Arbeit soll anhand der durchgeführten Studie die Wirkung von intraamniotisch appliziertem rhIGF-1 auf die mikroskopische Morphologie und molekularbiologische Beschaffenheit der fetalen hypoplastischen Rattenlunge am Nitrofen-Modell untersucht werden.

Dabei soll mit Hilfe der Mikroskopie eine, durch das rhIGF-1 induzierte, mögliche morphologische und molekularbiologische Veränderung der durch die CDH veränderten fetalen Lungen festgestellt und diese über die Immunhistochemie und RT-PCR qualitativ und quantitativ beurteilt werden. Die durchgeführten Untersuchungen erfolgen demnach durch die RT-PCR, also auf der molekularen Ebene der mRNA (also *posttranskriptional*⁷⁹⁴), aber auch immunhistochemisch, auf der Ebene der exprimierten Proteine in den Lungen (also *posttranslational*⁷⁹⁵) (siehe hierzu **Kapitel 2**).

Es soll in dieser Studie geklärt werden, ob die intraamniotische rhIGF-1-Applikation einen Ansatz für eine mögliche zukünftige Therapie der fetalen Lungenhypoplasie darstellt. Dazu wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

⁷⁹⁴ vor der *Translation* in Proteine, also nach der *Transkription* auf der Ebene der mRNA.

⁷⁹⁵ nach der Übersetzung (*Translation*) der mRNAs in die Proteine.

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

- Wird das intraamniotisch applizierte rhIGF-1 in die Lungen der Rattenfeteten aufgenommen, vermag es die veränderte Morphologie und das veränderte Gewicht der fetalen hypoplastischen Rattenlunge zu beeinflussen und übt es eine Wirkung auf das fetale Körpergewicht und die fetale LBWR (*lung-to-body weight ratio*) aus, und wenn ja, inwiefern?
- Führt das rhIGF-1 zu einer Steigerung der allgemeinen proliferativen Aktivität der Zellen der fetalen Lunge?
- Kann durch die intraamniotische rhIGF-1-Applikation die Reifung der fetalen Rattenlunge gefördert werden und wie beeinflusst sie die Gefäßbildung von Blut- (Vasculo- und Angiogenese) und Lymphgefäßen und damit auch das Vorkommen von Endothelzellen in der fetalen Lunge?
- Welchen Einfluss übt das applizierte rhIGF-1 auf die Expression der IGF-1- und IGF-2-Rezeptoren im Lungengewebe der fetalen Ratten aus?

2. Material und Methoden

2.1. Art des Eingriffs

In der vorliegenden experimentellen Studie sollte die Wirkung der Injektion von rekombinantem humanem IGF-1⁷⁹⁶ in das Fruchtwasser von Rattenfetten mit kongenitaler Zwerchfellhernie (CDH) auf deren hypoplastische Lungen untersucht werden. Hierbei kam das Nitrofen-Modell an der Ratte (siehe Einleitung) zur Anwendung.

Die intraamniotischen Injektionen von rhIGF-1 wurden an trächtigen weiblichen *Sprague-Dawley Ratten* durchgeführt, welche von der Universität Wien, Institut für biomedizinische Forschung, Abteilung für Labortierkunde und Genetik, 2325 Himberg, bezogen wurden. Sämtliche chirurgischen Eingriffe, sowie die Verabreichung des Nitrofens, wurden im Kleintier-OP des Institutes für biomedizinische Forschung der Medizinischen Universität Graz, Roseggerweg 48, 8036 Graz, durchgeführt. Hier wurden die Ratten artgerecht gehalten und mit Nahrung und Wasser ad libitum versorgt.

Die Tierversuche wurden vom Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung genehmigt: GZ: BMWF-66.010/0011-II/10b/2010.

2.1.1. Nitrofengabe

Die Nitrofengabe an die trächtigen Mutterratten wurde am Schwangerschaftstag 9,5, unter Kurzzeintarkose mittels Isofluran und Sauerstoff und nach der Ermittlung ihrer jeweiligen Körpergewichte, vorgenommen.

Es wurden hierzu 1000 mg Nitrofen (*2,4-dichloro-1(4-nitrophenoxy)benzene*, ACD-Code: MFC00128026; Maybridge, Thermo Fisher Scientific) in 10 ml Olivenöl durch Mischen und mehrmaliges Aufziehen in einer Kanüle gelöst und von dieser Lösung dann den trächtigen Mutterratten mittels einer Magensonde jeweils 1 ml verabreicht (entsprechend 100 mg Nitrofen pro Mutterratte).

Die korrekte Platzierung der Magensonde wurde vor der Applikation anhand der auf der Sonde angebrachten Skalierung überprüft (um eine versehentliche Applikation in die Luftwege der Ratte zu vermeiden). Nach der Verabreichung des Nitrofens wurden die Ratten in den Käfig zurückgebracht, dort in Seitenlage gelagert und noch etwa 30 Minuten unter Beobachtung gehalten, um eventuelle Komplikationen, wie z. B. eine Aspiration, frühzeitig erkennen zu können.

2.1.2. Chirurgischer Eingriff und rhIGF-1-Injektion

Die Versuchstiere wurden in drei Gruppen eingeteilt: *IGF-1*-, *Plazebo*-, und *Kontrollgruppe*.

An den beiden aufeinander folgenden Tagen 19 und 20, wurden jeweils die Injektionen von rhIGF-1 (*IGF-1-Gruppe*) und physiologischer Kochsalzlösung (*Plazebogruppe*) in die

⁷⁹⁶ *Insulin-like growth factor-1*

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

fetale Amnionflüssigkeit durchgeführt. Die Ratten der *Kontrollgruppe* blieben völlig unbehandelt und dienten der Erstellung von „Baseline“-Werten.

Am Tag des jeweiligen operativen Eingriffs wurde das trächtige Muttertier gewogen und mit dem Inhalationsnarkotikum Isofluran (Forane®, Inhalationsnarkotikum, 100 ml, Nr. B506; Abbott Ges. m. b. H.) narkotisiert. Die trächtige Ratte wurde zunächst in einer mit 4% Isofluran gesättigten Anästhesiekammer sediert (Isofluran-Verdampfer: TEC3®, Omnisa GmbH, Schweiz). Nach Eintritt der Narkose wurde das Tier aus der Kammer genommen, ein Begasungsschlauch mit einem passenden Plastikonus über Mund und Nase platziert und das Tier auf einer Wärmeplatte (bei 37 °C) gelagert, wobei die Körpertemperatur des Tieres über eine rektale Sonde kontinuierlich gemessen wurde. Über den Begasungsschlauch strömte Isofluran in 100% Sauerstoff mit einer Erhaltungskonzentration von 1,5-2,5% in die Atemwege der Ratte ein.

Alle weiteren Eingriffe wurden ausschließlich nach suffizienter Narkoseinduktionszeit (10-15 min) durchgeführt, wenn sich die Muttertiere (und die Feten) in einem Zustand tiefer Bewusstlosigkeit befanden.

Folgende Injektionen wurden dem Muttertier an jedem Operationstag in gleicher Weise verabreicht:

Unter Allgemeinnarkose wurde eine *Lokalanästhesie*⁷⁹⁷ durch Infiltration der chirurgischen Schnittstelle mittels Lidocain Hydrochlorid („Xylanest purum® 2%“, 10 ml-Ampullen zu 200 mg *Lidocain Hydrochlorid*; Gebro Pharma GmbH) in einer Dosis von 1 mg/kg KG⁷⁹⁸ injiziert. Im Anschluss wurde Tramadolhydrochlorid („Tramabene®“, 100 mg Ampullen; Ratiopharm GmbH) in einer Dosis von 15 mg/kg KG s.c.⁷⁹⁹ und *Carprofen*⁸⁰⁰ („Rimadyl® Rind“, 50 mg/ml, Injektionslösung; Pfizer Corporation Austria Ges.m.b.H) in einer Dosis von 5 mg/kg KG s.c. mittels einmaliger Injektion verabreicht.

Zur Antibiose diente *Enrofloxacin*⁸⁰¹ („Baytril® 2,5%“, 25 mg/ml Injektionslösung, Bayer Austria), das in einer Dosis von 7,5 mg/kg KG s.c. injiziert wurde.

Unter Allgemeinnarkose wurde die Ratte in Rückenlage auf dem OP-Tisch gelagert, das Narkosegas-Sauerstoff-Gemisch strömte dabei über den Begasungsschlauch und die Gesichtsmaske in die Atemwege der Ratte ein. Als Unterlage der Ratte diente eine sterile Saugkomresse (Vliwazell®, 20x20 cm, Lohmann Rauscher), die auf der Wärmematte platziert wurde.

Nach großzügiger Desinfektion der Bauchhaut der Ratte im Bereich des Hautschnittes mittels Betaisodonalösung (Betaisodonalösung, standardisiert; Mundipharma Ges.m.b.H.) und sterilen Mullkompressen (Gazin®, 5x5 cm, Lohmann Rauscher), wurde der Bereich des operativen Eingriffes mit einem sterilen Abdecktuch (Foliodrape®, Abdecktücher steril, 50x50 cm, Hartmann AG) abgedeckt und im Anschluss mit der sterilen Schere in dieses Abdecktuch eine spindelförmige Öffnung eingeschnitten und diese Öffnung damit dem angestrebten Operationsbereich angepasst.

Danach wurde die Bauchhaut in der Medianlinie eröffnet und die Bauchwand im Bereich der darunter liegende *Linea alba*⁸⁰² dargestellt und durchtrennt.

⁷⁹⁷ örtliche Betäubung

⁷⁹⁸ Körpergewicht

⁷⁹⁹ subcutan

⁸⁰⁰ ein nicht-steroidales Antiphlogistikum (NSAIR)

⁸⁰¹ ein *Chinolon der 2. Generation (Gyrasehemmer)* (1)

⁸⁰² Vereinigungsbereich der Bauchwandfaszien

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Der Schnitt wurde nach proximal erweitert und die beiden Uterushörner der Ratte beiderseits dargestellt. Das ovarielle und vaginale Ende des Uterus wurden auf jeder Seite bestimmt und die Feten wurden, beginnend vom Bereich des vaginalen Endes in Richtung des ovariellen Endes des Uterus, abgezählt und mit ansteigenden Zahlen nummeriert. Danach wurden beide Uterushörner mit sterilen Tupfern abgedeckt und mit physiologischer Kochsalzlösung beträufelt, um sie vor der Austrocknung zu schützen.

In das Fruchtwasser der Feten der *IGF-1-Gruppe* wurde nun eine Dosis von jeweils 0,2 µg rhIGF-1 injiziert. Hierzu wurden bereits 10 µg gefriergetrocknetes rekombinantes humanes IGF-1 (Lyophilized recombinant human IGF-1, 10 µg, Nr. Z00362; GenScript Inc.; <http://www.genscript.com>) in 100 µl sterilem Aqua dest. gelöst und in fünf Portionen zu je 20 µl bei -20 Grad Celsius eingefroren. In diesen Portionen kann das IGF-1 auch für längere Zeit gelagert werden.

Zur jeweiligen 20 µl-Portion wurden am Tag der fetalen Injektion, nach kurzem Auftauen, jeweils 480 µl steriles verdünntes *PBS* (Phosphate buffered saline, 10x concentr., pH 7,4, cell culture tested, Nr. P5493; Sigma-Aldrich Co.) zugesetzt, so dass man jeweils eine Portion von 500 µl der IGF-1-Lösung erhielt, die für die intraamniotischen Injektionen für 10 Ratten-Feten ausreichte.

Die hier verwendete Dosis von je 0,2 µg rhIGF-1 pro Ratten-Fetus wurde aus Studien von Nagata *et al.* [967] (siehe **Kapitel 1.16**) und Eremia *et al.* [746] extrapoliert, welche Dosen von umgerechnet 0,06 µg/g IGF-1 an kulturellen Lungengeweben von Mäusen bzw. als intraamniotische Injektion bei fetalen Schafen verwendeten.

Ein Nitrofen-exponierter Rattenfetus wog zum Zeitpunkt der Injektionen (E19 und E20) zwischen 2,5 und 3 g.

Jedem Fetus der IGF-1-Gruppe wurden mithilfe einer Mikroliterspritze (705 RN, 50 µl; Hamilton AG) 50 µl der rhIGF-1-Lösung in das Fruchtwasser injiziert (entsprechend 0,2 µg rhIGF-1 pro Fetus).

Hierzu wurde die Position der Nase und des Mundes des jeweiligen Fetus ermittelt und die Injektion, nach Durchstechung des Uterus und der Eihäute und unter Schonung der in ihnen verlaufenden Gefäße, in Richtung dieser fetalen Strukturen in das Fruchtwasser durchgeführt. Durch diese Art der Injektion sollte eine rasche Aufnahme des rhIGF-1 in die fetalen Atemwege ermöglicht werden.

Die Feten der *Plazebogruppe* wurden in gleicher Weise behandelt, hier wurden jedoch anstelle der rhIGF-1-Injektion, 50 µl einer sterilen physiologischen Kochsalzlösung (Fresenius Kabi AG) in das fetale Fruchtwasser appliziert.

Nach erfolgten Injektionen wurden die beiden Hörner des Uterus wieder mit physiologischer Kochsalzlösung beträufelt und unter Vermeidung einer Torquierung⁸⁰³ wieder in die mütterliche Bauchhöhle zurückverlagert.

Das mütterliche Abdomen wurde durch zwei Fortlaufnähten (Vicryl rapide®, Ethicon®, 3-0, 70 cm, FS-1; Johnson & Johnson GmbH) jeweils im Bereich der Bauchwandfaszie und der Bauchhaut verschlossen. Abschließend wurde der Wundbereich mit Betaisodona-Lösung von Blutresten gereinigt und die oberflächliche Lokalanästhesie durch neuerliche subkutane Injektion aufgefrischt.

⁸⁰³ Verdrehung eines Gefäßes, die zu einer Unterbrechung des Blutstromes führen kann (1).

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Das verwendete Operationsbesteck sowie die Mikroliterspritze wurden nach der Operation mit Octenisept®-Lösung (Octenisept® Wunddesinfektion; Schülke & Mayr GmbH) gespült, gereinigt und autoklaviert.

Nach der Hautnaht wurde die Isofluran-Dosis durch Regelung am Verdampfer schrittweise reduziert (von 1,5 bis 0%) und die Ratte erhielt schließlich nur mehr Sauerstoff über die Gesichtsmaske. Das Tier wurde nach dem Aufwachen aus der Narkose wieder in den Käfig zurückgebracht, dort in Seitenlage gelagert und weiter beobachtet.

Die Injektionen von IGF-1- bzw. Kochsalzlösung (Plazebogruppe) wurden an Tag 20 wiederholt, indem die Nähte entfernt und nach den vollendeten Injektionen wieder neu gesetzt wurden.

Am Tag 21,5 wurden die Muttertiere aller drei Gruppen (*IGF1*-, *Plazebo*- und *Kontrollgruppe*) gewogen, narkotisiert und die Bauchhöhle geöffnet. Die beiden Uterushörner wurden abermals dargestellt und die lebenden Feten mit den zugehörigen Plazenten operativ, unter Öffnung der Amnionhöhle, entbunden. Das Muttertier wurde danach in tiefer Narkose und unter maximaler Analgesie durch eine Kardiotomie⁸⁰⁴ getötet.

Die Feten wurden gewogen und anschließend erfolgte die *Nekropsie*⁸⁰⁵. Das fetale Zwerchfell wurde operativ dargestellt und das Vorhandensein und die Lokalisation einer *CDH* wurden überprüft. Danach wurde das Geschlecht der Feten bestimmt und die linke und rechte Lunge, die Plazenta, das Herz und das Zwerchfell operativ entfernt, gewogen und mit der Pinzette in RNase-freie, sterile Cryo-Röhrchen („Cryo.s®“ à 2 ml, Greiner Bio One GmbH) überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Humane Endpunkte (Kriterien, die den Abbruch des Experiments bzw. die Durchführung einer Euthanasie veranlassen): im Falle einer Nahrungsverweigerung des operierten Muttertiers mit inadäquater Gewichtszunahme bzw. Gewichtsabnahme, von ernsthaften respiratorischen Problemen des Muttertiers oder von auffälliger Lethargie (vor allem nach Sondenfütterung des Nitrofens oder in den ersten 24 Stunden nach der jeweiligen Operation) wurde das Experiment abgebrochen. In gleicher Weise wurde verfahren, falls sich Ratten als nicht-trächtig herausgestellt haben sollten.

2.2. Analyse der Lungengewebe

2.2.1. PCR-Analyse

2.2.1.1. Theorie zur RNA-Isolierung

Das „Tri-Reagent®“ ist ein Reagenz für die „Single-Step-Methode“⁸⁰⁶ der RNA-Isolierung. Es kombiniert *Phenol* und *Guanidin-Isothiocyanat* und hemmt dadurch *RNAsen*⁸⁰⁷ effektiv. Die biologische Probe kann in Tri-Reagent® lysiert⁸⁰⁸ und homogenisiert werden und durch die nachfolgende Zentrifugation wird dieses

⁸⁰⁴ Schnitt durch das Herz

⁸⁰⁵ Sektion von Tieren (1)

⁸⁰⁶ rasche Methode der Isolierung von RNA [968]

⁸⁰⁷ RNA-abbauende Enzyme

⁸⁰⁸ aufgelöst

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Homogenisat in eine wässrige und organische Phase getrennt. Die RNA sammelt sich dabei in der wässrigen obersten Phase an, während sich die DNA in der Interphase (weiße Phase) anreichert und die Proteine in der unteren organischen Phase (rote Phase) zu finden sind [968].

Das Guanidin-Isothiocyanat lysiert das Gewebe und deaktiviert Proteinasen sehr effektiv (sogar RNAsen). Weil diese Inaktivierung der RNAsen sofort nach der Lyse der Zellen stattfindet, ist diese Methode sehr stabil und liefert qualitativ hochwertige RNA. Das Endprodukt ist eine **gesamt RNA**, die aus **mRNA**⁸⁰⁹, **rRNA**⁸¹⁰ und **tRNA**⁸¹¹ besteht. Die mRNA macht dabei nur einen Anteil von etwa 2% aus. Für die Anwendung der RT-PCR ist dieser kleine Anteil an mRNA jedoch ausreichend [968].

Die Alkohol-Fällung ist, der Beschreibung von Cornel Mülhardt folgend, relativ einfach durchzuführen. Man versetzt die Nucleinsäure-Lösung mit einem monovalenten (einfach geladenen Salz, wie z. B. *Natriumacetat*) und fügt Alkohol hinzu. Die Nucleinsäure fällt, bei guter Mischung, praktisch spontan aus und man muss sie nur noch durch Zentrifugation pelletieren und durch Waschen mit 70% Ethanol von Salz- und Alkoholresten befreien. Ein angenehmer Nebeneffekt ist, dass neben dem Salz auch viele andere wasserlösliche Substanzen im Überstand gelöst bleiben, so dass dadurch eine gewisser Reinigungseffekt erzielt wird [968].

Isopropanol fällt Nucleinsäuren weit effektiver, als dies Ethanol zu tun vermag. Es reichen bereits 0,6 – 0,8 Volumen Isopropanol für eine quantitative Fällung bei Raumtemperatur aus. Allerdings müssen die Reste von Isopropanol entfernt werden, wozu eine nachträgliche Waschung mit 70% Ethanol notwendig ist [968].

Ethanol ist der Standardalkohol für die Fällung der Nucleinsäuren. Er kann anschließend leicht entfernt werden, weil er rasch verdampft. Allerdings benötigt man zur Fällung recht hohe Konzentrationen von 70 Volumen-%, was dem 2,5-fachen Volumen der zu fällenden DNA-Lösung entspricht und Probleme bei der Zentrifugation bereiten kann, weil man eventuell größere Zentrifugenbecher benötigt [968].

2.2.1.2. Praktische Isolierung von RNA aus dem Lungengewebe der Rattenfeten

Zur Isolierung der RNA wurden die rechten Lungen der Rattenfeten der IGF-1-, Plazebo- und Kontrollgruppe herangezogen. Diese wurden den im flüssigen Stickstoff gelagerten Cryotubes (Cryo.S®, Cellstar®; Greiner Bio-One GmbH) entnommen und auf Eis aufgetaut.

Die Lungengewebe wurden dann mit einer Pinzette in sterile Röhrchen (Safe-Lock Tubes®, 2,0 ml, Eppendorf GmbH) überführt.

In jedes Eppendorf-Röhrchen wurde dann jeweils 1 ml Tri-Reagent® (Cat. No: RT 111; MRC, Molecular Research Center Inc.) pipettiert. Dann wurden die Röhrchen 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und mit Hilfe des Dispergiergerätes Ultra-Turraxx® (IKA Werke GmbH und Co. KG) homogenisiert.

Das Homogenisat wurde dann mit 100 µl *BCP*⁸¹² (*1-Bromo-3-Chloropropan*; MRC Molecular Research Center Inc.) versetzt, bei Raumtemperatur gut gemischt und 15

⁸⁰⁹ messenger RNA

⁸¹⁰ ribosomale RNA

⁸¹¹ transfer RNA

⁸¹² Reagenz zur Separation der Phasen [968]

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Minuten stehen gelassen. Danach wurde es bei 4 °C in der Kühlzentrifuge (Centrifuge 5415R, Eppendorf GmbH) bei 12000 RCF⁸¹³ für 15 Minuten zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde die obere, wässrige Phase, die die RNA enthält, vorsichtig abpipettiert und in ein neues 2,0 ml Eppendorf-Röhrchen überführt. Dabei war es von großer Wichtigkeit, ausschließlich die obere, wässrige Phase und somit keine Anteile der Interphase (weiß) und unteren Phase (rot) zu pipettieren.

Nun wurden jedem Röhrchen 500 µl *Isopropanol*⁸¹⁴ zugesetzt, sie wurden durch Kippen gemischt und dann 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation für 8 Minuten bei 4 °C und 12000 RCF.

Der nun entstandene Überstand wurde wiederum abpipettiert und am Boden der Eppendorf-Röhrchen zeigte sich ein Nucleinsäure-Pellet. Zu jedem Pellet wurden nun 500 µl Ethanol (70 %, -20 °C) zugesetzt und es folgte eine weitere Zentrifugation für 5 Minuten bei 4 °C und 7400 RCF. Der Überstand wurde dann wiederum abpipettiert und das Pellet im Eppendorfröhrchen 2-3 Minuten luftgetrocknet.

Dann wurden zu jedem Pellet 100 µl RNase-freies Wasser zugesetzt und jedes Eppendorfröhrchen wurde für 10 Minuten bei 50 Grad geschüttelt (Thermomixer Comfort®, Eppendorf GmbH). Dadurch löste sich die RNA im Wasser. Die RNA-Lösungen in den Eppendorf-Röhrchen wurden dann bis zum Beginn der Analyse bei -80 °C tiefgefroren.

2.2.1.3. Theorie der reversen Transkription (cDNA-Synthese)

Die Abkürzung *cDNA* steht für *complementary DNA* und diese ist das Produkt eines Enzyms, der *reversen Transkriptase*, das aus der einzelsträngigen RNA eine komplementäre DNA synthetisiert [968].

Im Prinzip werden bei der *RT*⁸¹⁵ RNA und Primer zusammengemischt und der Ansatz wird auf 70 °C erhitzt, um die Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen. Dann lässt man den Ansatz langsam auf Raumtemperatur abkühlen, damit die Primer *hybridisieren*⁸¹⁶ können. Danach werden Puffer, Nucleotide, RNase-Inhibitoren und die reverse Transkriptase hinzugefügt und der Ansatz wird für eine Stunde bei 37–42 °C inkubiert [968].

Der interessante, proteincodierende Teil der mRNA, der in Proteine *translatiert*⁸¹⁷ wird, sitzt häufig nahe am 5'Ende der mRNA. Zur Erfassung dieser Bereiche eignen sich am besten *random Hexamerprimer*, die irgendwo an die mRNA hybridisieren. Auf diese Weise sind im Anschluss alle mRNA-Bereiche in der cDNA vertreten, allerdings auch die nicht-mRNA-Bereiche. Die Reverse Transkriptase synthetisiert einen komplementären Doppelstrang, auf der Basis des RNA-Einzelstranges [968].

2.2.1.4. Absorptions-Messung mittels Spektrometrie

Aus den in den zuvor angeführten Arbeitsschritten gewonnenen RNA-Lösungen (RNA in Wasser) wurden Verdünnungen zur Messung der Konzentration am Photometer (Bio Photometer®, V. 1.35, Eppendorf GmbH) hergestellt.

⁸¹³ *Relative Centrifugal Force* (engl.): relative Zentrifugalkraft

⁸¹⁴ *2-Propanol*

⁸¹⁵ *reverse Transkription*

⁸¹⁶ sich anlagern

⁸¹⁷ übersetzt

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Bei dieser Wellenlänge befindet sich das Absorptionsmaximum der Nucleinsäuren [968].

Dazu wurden jeweils 2 µl der RNA-Lösung mit 98 µl RNase-freiem Wasser verdünnt. Nach Messung der *Nullprobe*⁸¹⁸ (RNase-freies Wasser), wurden die Konzentrationen der verdünnten RNA-Lösungen in der Quarzküvette am Photometer gemessen. Die Nucleinsäurekonzentration errechnete sich aus der Absorption bei 260 nm, der Verdünnung und einem für die RNA spezifischen Multiplikationsfaktor [968].

Nur Werte zwischen 0,1 und 1 sind aussagekräftig, während Werte zwischen 0,02 und 0,1 mit starken Fehlern behaftet sein können [968].

Aus dem Verhältnis der Absorption bei 260 und 280 nm (*A* 260/280) erhält man außerdem eine Aussage über die *Proteinkontamination*⁸¹⁹ der Lösung. Eine hochreine, proteinfreie Nucleinsäurelösung sollte ein Verhältnis von 1,8-2,0 aufweisen [968].

2.2.1.5. Praktische cDNA-Synthese

Zur Analyse der Genexpression kam bei dieser Studie die *RT-PCR*⁸²⁰ zur Anwendung. Dabei wurde zuerst aus der RNA eine cDNA synthetisiert, welche dann als *Template*⁸²¹ für die PCR verwendet wurde [968]. Die PCR wurde dann mit Hilfe des TaqMan® 7900 HT Fast Real-Time PCR-Systems (Applied Biosystems) durchgeführt.

Die jeweiligen RNA-Lösungen wurden in entsprechender Verdünnung (Verhältnis 1 µg RNA in 10 µl Wasser) in 0,2 ml PCR-SoftStrips® (Biozym Ges.m.b.H.) pipettiert, gemischt und kurz zentrifugiert.

Für die *Nullprobe*⁸²² wurden, anstelle der cDNA-Lösung, 10 µl hochreines Wasser (DEPC-frei) in das jeweilige SoftStrip® pipettiert. Diese NTCs wurden dann in gleicher Weise wie die cDNA-Proben verarbeitet. Sie dienten der Erkennung von Verunreinigungen.

Für die cDNA-Synthese wurden zwei Mischungen („*Master Mix I und II*“) zusammengestellt.

Master Mix I enthielt pro Ansatz: 1 µl „*Random Hexamer Primer*“ (120 µl, 24 µg, 100 µmol; Fermentas GmbH)
1 µl *dNTPs*⁸²³ (1 ml, 10 µmol; Fermentas GmbH)

Master Mix II enthielt pro Ansatz: 4 µl *Buffer* (5x first strand buffer, 250 mM Tris-HCl mit pH 8,3 bei Raumtemperatur, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂; Life Technologies)
2 µl *DTT*⁸²⁴ (0,1M, 500 µl, Life Technologies)
1 µl *RNase-Out*⁸²⁵ (5000 Units, Recombinant Ribonuclease Inhibitor; Life Technologies)

⁸¹⁸ *Blank* (engl.): Bestimmung des Leerwertes

⁸¹⁹ Verunreinigung mit Proteinen

⁸²⁰ *Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion*

⁸²¹ Ausgangs-DNA

⁸²² *NTC: Non Template Control* (engl.)

⁸²³ Nucleotid-Mischung aus *dATP*, *dCTP*, *dGTP* und *dUTP*

⁸²⁴ *Dithiothreitol*

⁸²⁵ Ribonuclease-Inhibitor

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Jedem Ansatz wurden dann 2 µl des *Master Mix I* zugesetzt, der Ansatz wurde gemischt und kurz zentrifugiert.

Dann wurden die SoftStrips® in das cDNA-Gerät (MJ Mini®, Personal Thermal Cycler; BIO RAD Ges.m.b.H.) überführt und dort 5 Minuten bei 65 °C inkubiert. Danach wurden die Ansätze dem Gerät entnommen und rasch auf Eis gelegt.

Dort wurden jedem Ansatz 7 µl des *Master Mix II* zugesetzt und nach erneuter Mischung und Zentrifugation wurden die SoftStrips® wieder in den Thermal Cycler überführt und dort zwei Minuten bei 25 °C inkubiert.

Im Anschluss wurden die SoftStrips® abermals dem Gerät entnommen, jedem Ansatz 1 µl *Super Script II*®⁸²⁶ (10000 Units, Reverse Transkriptase; Invitrogen Life Technologies) zugesetzt und nach dem Mischen und abermaligen Zentrifugieren wurden die Ansätze wieder im Thermal Cycler für 10 Minuten bei 25 °C und weitere 50 Minuten bei 42 °C inkubiert. In jedem SoftStrip® befanden sich nach der Synthese 20 µl cDNA-Lösung, die jeweils durch Zusatz von 100 µl RNase-freiem Wasser auf 120 µl cDNA-Lösung verdünnt wurden. Die cDNA-Verdünnungen wurden bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

2.2.1.6. Theorie der RT-PCR (Reverse Transkription-PCR)

Für eine PCR werden *thermostabile Polymerasen*⁸²⁷, ein *Template*, *Oligonucleotid-Primer*, *Puffer* und *Nucleotide* benötigt [968].

Ein typisches PCR-Programm besteht aus den folgenden drei Schritten:

Denaturierungsschritt, **Annealingschritt** und **Elongationsschritt** [968].

Denaturiert wird bei 94 °C und dabei trennen sich die beiden Stränge der Template-DNA voneinander. Anschließend wird die Temperatur auf 55 °C gesenkt, so dass es zur **Hybridisierung** der in massivem Überschuss vorhandenen Oligonucleotid-Primer an die einzelsträngige Template-DNA kommt. Danach wird die Temperatur wieder auf 72 °C, dem Temperaturoptimum der *Taq-Polymerase*, angehoben und der Primer dabei verlängert, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt, die der ursprünglichen Template-DNA exakt gleicht. Weil die Komplementierung an beiden Strängen der Template-DNA abläuft, wird in einem PCR-Zyklus die Zahl der Template-DNAs im Idealfall⁸²⁸ verdoppelt [968].

Das grundlegende PCR-Programm ist wie folgt charakterisiert:

Initiale **Denaturierung** für 5 Minuten bei 94 °C; **30 Zyklen** bestehend aus jeweils 30 sec. bei 94 °C, 30 sec. bei 55 °C und 90 sec. bei 72 °C; und zuletzt eine **finale Elongation** von 5 Minuten bei 72 °C. Im Anschluss wird die Reaktion bei 4 °C gekühlt [968].

- Die **Denaturierung** ist ein sehr schneller Prozess, der bereits bei Temperaturen ab 70 °C beginnt. Unter der Hitze leiden allerdings alle Komponenten: die Polymerase wird denaturiert und die Nucleotide zerfallen, die Template-DNA und die Primer werden depurinieren. Dies sind Argumente, die für eine möglichst kurze Zeit der Denaturierung sprechen. Tatsächlich reichen bereits 5 Sekunden, um die DNA-Stränge voneinander zu trennen [968].

⁸²⁶ Reverse Transkriptase

⁸²⁷ Taq-Polymerasen

⁸²⁸ meistens liegt der Multiplikationsfaktor jedoch unter 2; etwa bei 1,6 bis 1,7 (siehe unten) [968]

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

- Die **Annealingtemperatur** richtet sich hauptsächlich nach den verwendeten Primern.
Die Schmelztemperatur kann auf unterschiedliche Weise errechnet werden [968].
- Die **Elongationszeit** sollte der Länge des erwarteten Produktes angepasst sein. Ist sie zu kurz, kann die Polymerase ihre Arbeit nicht beenden und das Produkt ist unvollständig. Üblicherweise rechnet man 0,5–1 Minute je kb⁸²⁹-Länge bei Verwendung der *Taq-Polymerase* [968].
- Der **Multiplikationsfaktor** der DNA-Moleküle wird häufig als eine Verdoppelung angegeben. Das ist in der Praxis allerdings meistens nicht der Fall. Der Multiplikationsfaktor liegt etwa bei **1,6 bis 1,7** und variiert [968].
- Die **Templatemenge** für eine erfolgreiche PCR sollte in der Praxis wenigstens 10000 Template-DNAs betragen, um eine problemlose Amplifikation zu ermöglichen [968].
- Die Verwendung des **Puffers** ist von entscheidender Bedeutung. Die *Taq-Polymerase* hat ihr Aktivitätsmaximum bei einem pH oberhalb von 8. Der klassische *Tris-HCl-Puffer* ändert seinen pH-Wert stark mit der Temperatur und der pH-Wert kann damit während der PCR sogar auf bis zu 6,8 abfallen, was für die *Taq-Polymerase* sehr ungünstig ist. Häufig wird deshalb ein *Tris-Puffer* von pH 8,55 oder gar 9,0 verwendet [968].
- Bei den verwendeten **Salzen** gibt es eine große Auswahl. Häufig werden KCl (bis zu 50 mM) oder (NH₄)₂SO₄ (bis zu 20 mM) verwendet [968].
- Die **MgCl₂-Konzentration** beeinflusst das *Primerannealing*, die Trennung der Stränge bei der Denaturierung, die Fehlerrate und die Bildung von *Primerdimeren*⁸³⁰.
Außerdem benötigt die Polymerase freies Mg₂⁺. Die optimale Konzentration an Mg₂⁺ liegt für die PCR normalerweise bei 0,5 bis 2,5 mM [968].
- Die **Nukleotidkonzentration** wird im Standardprotokoll mit 200 µM je Nucleotid angegeben. Die Menge ist ausreichend, um in einem 50 µl Ansatz 13 µg DNA zu synthetisieren, allerdings ist dies eine Menge, die man praktisch nicht erreicht. Ein Großteil der Nucleotide endet stattdessen als Nucleotiddi- und -monophosphate. Im Normalfall reicht ein Viertel der Menge auch aus. Zu hohe Konzentrationen von *dNTPs* können allerdings einen stark inhibierenden Effekt auf die Amplifikation ausüben und dies kann bis zu ihrem völligen Scheitern führen. Es wird u. a. angenommen, dass die Nucleotide freies Mg₂⁺ binden und dadurch die Amplifikation stören [968].
- Die Beschaffenheit der **Primer** ist für die PCR von entscheidender Bedeutung und sie müssen für die gewünschte Amplifikation maßgeschneidert sein. PCR-Primer haben normalerweise eine Länge von 18-30 Basen und besitzen einen Anteil an

⁸²⁹ Kilo-Base: 1000 Basenpaare [968]

⁸³⁰ Anlagerung der Primer aneinander (siehe unten) [968]

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

G+C⁸³¹ von 40-60%. Primer für die Amplifikation extra langer Produkte sollten 25-35 Basen lang sein. Die Primer sollten nicht mehr als vier gleiche Basen hintereinander enthalten, um Fehlhybridisierungen und *Leserasterverschiebungen*⁸³² zu vermeiden. Die Schmelztemperatur sollte 55-80 °C betragen, um ausreichend hohe Annealingtemperaturen zu erlauben. Am 3`-Ende sollten ein bis zwei G oder C sitzen, um eine bessere Bindung und Elongation zu erreichen.

Die Sequenz sollte für das gewünschte Amplifikationsprodukt möglichst spezifisch sein, so dass die Primer nur an den richtigen Stellen hybridisieren.

Je mehr verwandte Sequenzen in der Template-DNA existieren, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, Artefakte zu amplifizieren. Diesem Problem begegnet man am besten mit möglichst hohen Annealingtemperaturen (55-65 °C), wenn das möglich ist. Mit steigender Temperatur sinkt allerdings die Annealing-Wahrscheinlichkeit und damit sinkt dann auch die Ausbeute der Reaktion [968].

Der Primer sollte auch keine internen Sekundärstrukturen wie *Haarnadeln*⁸³³ bilden, weil diese die Wahrscheinlichkeit des Hybridisierens an die Template-DNA verringern [968]. Die Primer dürfen auch nicht miteinander hybridisieren und sollten darum eine möglichst geringe *Komplementarität*⁸³⁴ an ihren 3`-Enden besitzen. Sonst kann es vorkommen, dass ein Primer als Template für den anderen dienen kann und es entstehen dadurch **Primerdimere**. Durch sie wird die Menge der nutzbaren Primer drastisch reduziert und die Amplifikationseffizienz sinkt ins Bodenlose. Je reiner der Primer, desto besser ist dies für die Amplifikation. Die **Primerkonzentration** sollte üblicherweise für einen 50 µl-Ansatz etwa 10 pmol je Primer betragen [968].

- Die **Zykluszahl** ist ebenfalls ein wichtiger Parameter der PCR. Ab einer gewissen Produktmenge (ca. 0,3-1 pM) bildet sich ein *Plateau*effekt aus, bei dem die Vermehrungsrate stark abnimmt. Bedingt wird dies offenbar durch verschiedene Ursachen, wie die Akkumulation von Endprodukten (DNA, Pyrophosphat, etc.), die Abnahme der Substratkonzentration, die abnehmende Menge an intakter Polymerase und die Entstehung von Primerdimeren und Fehlhybridisierungen. Die Zahl falscher Produkte steigt und damit auch das Hintergrundsignal⁸³⁵ [968].
- Die thermostabile *Taq-Polymerase* hat ihr **Arbeitsoptimum** bei einer Temperatur von 74 °C. Sie ist allerdings auch bei niedrigeren Temperaturen nicht inaktiv. Die *Einbaurate* der Taq-Polymerase beträgt beispielsweise 2800 Nucleotide pro Minute bei 70°C, 1400 Nucleotide pro Minute bei 55 °C und noch etwa 90 Nucleotide pro Minute bei 37 °C. Die Taq-Polymerase wird aus *Thermus aquaticus*, einem hitzestabilen Bakterienstamm isoliert, der in 70 °C heißen Quellen wächst. Das Aktivitätsmaximum der Taq-Polymerase liegt bei 74 °C und einem pH von über 8. Sie besitzt neben der 5`-3`-DNA-Polymeraseaktivität auch eine 5`-3`-*Exonucleaseaktivität*, aber keine 3`-5`-*Exonucleaseaktivität* (siehe folgenden Text) [968].

⁸³¹ Guanin und Cytosin

⁸³² frameshifts (engl.)

⁸³³ hair pins (engl.)

⁸³⁴ Unter *Komplementarität* versteht man die Möglichkeit, komplementäre Bindungen einzugehen [968].

⁸³⁵ das gesuchte, spezifische Produkt wird von den unspezifischen Produkten schlechter abgrenzbar

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

- Die **Fehlerrate**⁸³⁶ für Polymerasen mit Korrekturaktivität liegt bei ungefähr einem Fehler alle 10^6 Basen und für solche ohne Korrekturaktivität etwa um den Faktor 10 höher [968].

Die DNA-Polymerase ermöglicht die chemische Verknüpfung von Monomeren⁸³⁷ zum Polymer⁸³⁸. Im Falle der DNA-Polymerase ist das gebildete Polymer die DNA⁸³⁹, als Monomere dienen *Desoxyribonukleotide*, genauer *dNTPs*⁸⁴⁰. Die DNA-Polymerase verwendet einen bereits bestehenden DNA-Einzelstrang als *Matrize*⁸⁴¹ für die Synthese eines neuen komplementären Stranges und dieser bestimmt dadurch die *Sequenz*⁸⁴². Durch diese Vorgehensweise wird die Information des Erbguts erhalten.

Das korrekte Kopieren der Matrize gelingt durch *komplementäre Basenpaarung* der eingebauten Nukleotidbasen mit den Basen der DNA-Matrize, vermittelt durch *Wasserstoffbrücken*. Die Synthese des neuen DNA-Stranges erfolgt vom 5'- zum 3'-Ende. Chemisch betrachtet findet dabei eine Reaktion der endständigen *3'-Hydroxygruppe* des DNA-Stranges auf das *α -Phosphat* des *dNTPs* statt, wobei *Pyrophosphat* freigesetzt wird. Dieser Schritt wird von der Polymerase katalysiert [968].

Im Gegensatz zu RNA-Polymerasen kann die Synthese des komplementären DNA-Stranges bei DNA-Polymerasen nur vollzogen werden, wenn der Polymerase ein *freies 3'-Hydroxy-Ende* zur Verfügung steht. Daran wird dann das erste Nucleotid geknüpft. Bei der Polymerase-Kettenreaktion kommen hierzu 15-20 Nucleotide lange *Primer*⁸⁴³ zum Einsatz [968].

Viele Polymerasen haben auch noch weitere *Enzym-Funktionen*. Damit können sie unter anderem gewährleisten, dass es zu keinen Fehlern beim Ablesen der DNA-Matrize kommt. Sie haben eine *Korrekturlese-Funktion*⁸⁴⁴, d.h. sie sind in der Lage, den Einbau eines unpassenden Nucleotids zu erkennen und dieses anschließend wieder aus der DNA zu entfernen. Man nennt diese Fähigkeit: *3'→5'-Exonuklease-Aktivität*. Manche Polymerasen besitzen auch eine *5'→3'-Exonuklease-Aktivität*. Diese ermöglicht den Abbau eines bestehenden DNA- oder RNA-Stranges, der bereits mit dem Matrizenstrang gepaart (verknüpft) ist, während ein neuer Strang gebildet wird [969].

2.2.1.7. Theorie der Real-time quantitative PCR (RTQ-PCR)

Die *RTQ-PCR* ist wohl die modernste Form der Quantifizierung⁸⁴⁵ von Nucleinsäuren. Die Anfänge dieser Technik gehen auf Higuchi *et al.* (1992) zurück und die Entwicklung bestand damals darin, eine PCR-Maschine mit einer UV-Lampe und einer Kamera auszustatten und der DNA etwas *Ethidiumbromid* hinzuzufügen [968].

Das Ethidiumbromid *interkaliert*⁸⁴⁶ in doppelsträngiger DNA, wodurch die Fluoreszenz messbar erhöht wird. Diese Methode findet noch heute ihre Anwendung, auch wenn

⁸³⁶ Einbau von falschen Basen

⁸³⁷ einzelne Moleküle

⁸³⁸ zu einer Kette

⁸³⁹ *Desoxyribonukleinsäure*

⁸⁴⁰ *Desoxy-Nukleosidtriphosphate*

⁸⁴¹ Vorlage

⁸⁴² Nukleotid-Abfolge

⁸⁴³ spezifische DNA-Einzelstränge

⁸⁴⁴ *proof reading* (engl.): das Korrekturlesen

⁸⁴⁵ Mengenbestimmung

⁸⁴⁶ lagert sich ein

inzwischen Farbstoffe entwickelt wurden, die ein besseres Signal-Hintergrund-Verhältnis liefern (vor allem *SYBR® Green I*).

Der Vorteil dieser Methode ist die universale Verwendbarkeit, denn man kann damit jede PCR-Reaktion verfolgen. Die Signalstärke ist hoch, weil jedes DNA-Molekül mehrere Farbstoffmoleküle bindet. Allerdings entstehen bei der PCR auch immer *Artefakte*⁸⁴⁷ und der große Nachteil ist, dass man nicht zwischen dem korrekten Produkt und dem Artefakt unterscheiden kann [968].

Das Problem dieser mangelnden Spezifität wurde bereits von Holland *et al.* (1991) gelöst. Dabei wurde die 5'-3'-*Exonuclease-Aktivität* der DNA-Polymerase ausgenutzt. Man fügte der PCR-Reaktion ein drittes, *radioaktiv markiertes Oligonucleotid* hinzu, dessen 3'-Ende durch ein *Didesoxynucleotid* oder eine *Phosphatgruppe* blockiert war. So konnte es nicht als Primer fungieren [968].

Das dritte Nucleotid wurde so gewählt, dass es zwischen den Primern hybridisieren konnte. Erreichte die Polymerase bei der Neustrang-Synthese dieses Oligonucleotid, wurde der Strang abgebaut und damit die radioaktive Markierung freigesetzt, die sich später in der Dünnschichtchromatographie nachweisen ließ.

Die heutige Technik baut auf der Ausnutzung des *FRET*⁸⁴⁸ auf, die von Cardullo *et al.* (1988) eingeführt wurde. Dabei lässt sich ein *Fluorochrom*⁸⁴⁹ mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (**A1**) anregen und strahlt die aufgenommene Energie dann in Licht einer anderen Wellenlänge (**E1**) weder ab. Das *Anregungs-* und *Emissionsspektrum* sind dabei für den jeweiligen Farbstoff charakteristisch [968].

Wenn man allerdings ein Fluorochrom (**F1**) in ausreichende Nähe zu einem zweiten (**F2**) bringt, dessen *Anregungsspektrum* (**A2**) dem *Emissionsspektrum* des ersten Fluorochroms (**E1**) entspricht, springt zwischen den beiden Fluorochromen der Funke über. Die Energie wird, anstatt in Form von Licht der Wellenlänge **E1** abgestrahlt zu werden, an Fluorochrom 2 weitergegeben, das daraus Licht der Wellenlänge **E2** produziert. Man kann während der PCR die Wellenlänge **E1** oder **E2** messen und kann dadurch feststellen, ob die beiden Fluorochrome räumlich weit getrennt (Messung von **E1**) oder nahe beieinander (Messung von **E2**) liegen [968].

Wird **E1** gemessen, wird das Fluorochrom 1 als *Reporter*⁸⁵⁰ und Fluorochrom 2 als *Quencher*⁸⁵¹ bezeichnet, misst man **E2**, heißen die beiden *Donor* und *Akzeptor*.

Aus der Kombination PCR-Gerät mit Fluoreszenz-Detektion, spezifisches Oligonucleotid und *FRET* wurden verschiedene Nachweismethoden entwickelt [968].

Das älteste und wohl bekannteste ist das *TaqMan-Prinzip* von Livak *et al.* (1995).

Hier sitzen *Reporter* und *Quencher* auf demselben Oligonucleotid, vorzugsweise am 5'- und 3'-Ende (siehe **Abbildung 23**). Solange das Oligonucleotid intakt ist, ist die Lichtstärke bei **E1** gering (siehe **Abbildung 24**). Wenn der Reporter allerdings durch die Polymerase freigesetzt wird, steigt die Lichtproduktion bei dieser Wellenlänge an (siehe **Abbildung 25**). Je höher die Menge an synthetisierter DNA ist, desto mehr Reporter wird freigesetzt und desto höher ist auch die Signalstärke [968,970].

⁸⁴⁷ *Artefakte* sind Kunstprodukte, die kein physiologisches oder pathologisches Korrelat haben (1).

⁸⁴⁸ *fluorescence resonance energy transfer*

⁸⁴⁹ fluoreszierender Farbstoff

⁸⁵⁰ *to report* (engl.): berichten

⁸⁵¹ *to quench* (engl.): löschen

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

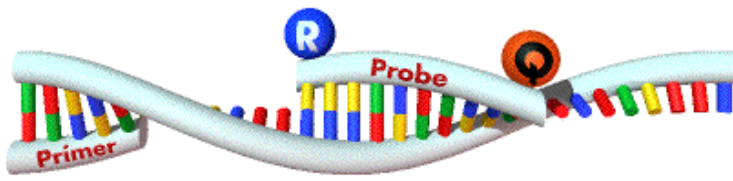


Abbildung 23:

Reporter (R) und Quencher (Q) sind an die TaqMan-Probe gebunden. Der Quencher unterdrückt das Signal des Reporters [968].

Quelle der Abbildung:
© Dr. Thomas Schild [970]

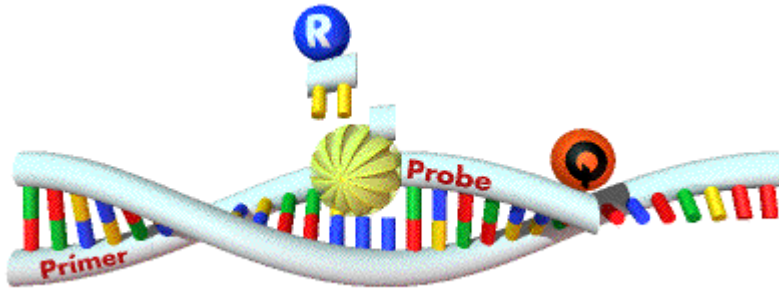
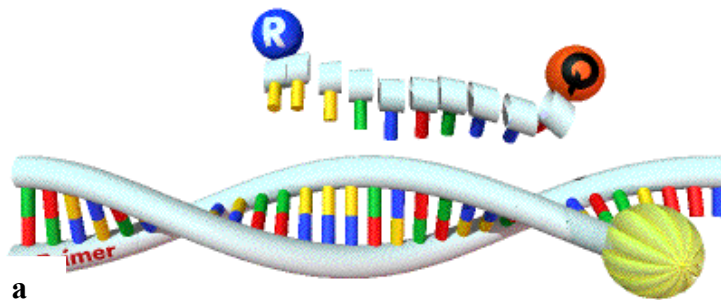


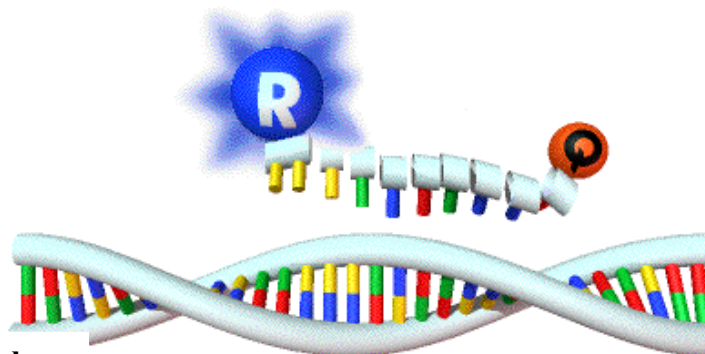
Abbildung 24:

Die Probe bindet an die Template-DNA, auch der Primer lagert sich an. Durch die Bindung des Primers kann die Taq-Polymerase nun damit beginnen, einen neuen Strang zu synthetisieren [968].

Quelle der Abbildung:
© Dr. Thomas Schild [970]



a



b

Abbildung 25, a und b:

Die Taq-Polymerase synthetisiert den komplementären Strang und setzt dabei den Reporter (R) frei (a). Durch die Entfernung des Reporters (R) vom Quencher (Q) kann das emittierte Licht nun registriert werden (b) [968].

Quelle der Abbildung:
© Dr. Thomas Schild [970]

2.2.1.8. Praktische Durchführung der RTQ-PCR

Die Analyse der cDNA-Proben mit Hilfe des TaqMan® *HT AB7900 Fast PCR-Systems* wurde in folgenden Schritten durchgeführt:

Die zuvor mit 100 µl RNase-freiem Wasser auf 120 µl verdünnten cDNAs wurden für die Pipettierung der Doppelansätze in die 96-Well-Platte (siehe unten) in Portionen zu je 11 µl in vorbereitete PCR-SoftStrips® pipettiert. Für die Durchführung der PCR wurde eine *Analyse-Mischung* für den jeweiligen cDNA-Doppelansatz der Well-Platte vorbereitet, die

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

dann in Portionen zu jeweils 33 µl zu den 11 µl der entsprechenden cDNA in den PCR-SoftStrips® (auf Eis) pipettiert wurde.

Diese *Analyse-Mischung* bestand für den Doppelansatz (+10 %) der Well-Platte aus:

- 22 µl *TaqMan® Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems)
- 8,8 µl *Wasser reinst* (DEPC-behandelt, RNase-frei)
- 2,2 µl *TaqMan® Gene Expression Assay* für die jeweils gesuchte Gensequenz der Ratte (Applied Biosystems; siehe unten)

So erhielt man in jedem PCR-Softstrip®, für den jeweiligen Doppelansatz der Well-Platte, 44 µl der Lösung (11 µl verdünnte cDNA + 33 µl der Analyse-Mischung). Von den NTC-Lösungen wurden je 5 µl in das jeweilige SoftStrip® pipettiert und mit 15 µl der Analyse-Mischung vermischt.

Folgende *TaqMan® Gene Expression Assays* (species: *rattus norvegicus*) wurden verwendet:

Pecam1, Rn01467262_m1
Hprt1, Rn01527840_m1
Igf1r, Rn00583837_m1
Igf2r, Rn01636937_m1
Pdpr, Rn00571195_m1
Nkx2.1, Rn01512482_m1
Kdr, Rn00564986_m1
Ftl1, Rn00570815_m1
Vegfa, Rn01511601_m1
Bmp4, Rn00432087_m1
Mki67, Rn01451446_m1
Fgf10, Rn00564115_m1
Plat, Rn00565767_m1

Die Lösungen in den jeweiligen PCR-SoftStrips (44 µl) wurden in *Doppelansätzen* zu je 20 µl nach einem vorbereiteten Schema in eine 96er-Well-Platte pipettiert (MicroAmp®, Optical 96-Well Reaction Plate; Applied Biosystems), die auf einer Kühlunterlage platziert war. Die NTC-Lösungen wurden nach Schema im Einzelansatz zu 20 µl ebenfalls auf diese Platte pipettiert. Danach wurde die Platte mit einer Folie abgeklebt und bis zur Analyse bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Die Auswertung erfolgte innerhalb von 12 Stunden.

Vor der Analyse mit Hilfe des *TaqMan® 7900 HT Fast Real-Time PCR-Systems*, wurden die Well-Platten für eine Minute bei 2000 RPM⁸⁵² zentrifugiert.

Im *TaqMan® 7900 HT Fast Real-Time PCR-System* wurden 40 Zyklen der PCR bei einem Sample-Volumen von 20 µl durchlaufen.

Die relative Quantifizierung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der Software *SDS2.2* (Sequence Detection System, Ver. 2.2; Applied Biosystems)

⁸⁵² *rotations per minute* (engl.): Rotationen/Umdrehungen pro Minute

2.2.1.9. Auswertung der QT-PCR

Bei der Quantifizierung der PCR werden keine absoluten Mengen des PCR-Produkts gemessen. Man nützt stattdessen die Kinetik der PCR-Reaktion aus:

In den frühen Zyklen der PCR findet eine weitgehend exponentielle Vermehrung der DNA-Fragmente statt. Wenn jedoch das Produkt akkumuliert, steigen auch die störenden Einflüsse. Der Prozess verlangsamt sich zu einem linearen Wachstum und kommt schließlich ganz zum Stillstand. Schuld daran sind vor allem die Reduktion der Menge der Primer und Nucleotide, die Schädigung der Polymerase und der Nucleotide aufgrund der hohen Temperaturen, oder die Anhäufung von Produkten (z. B. *Pyrophosphat*), die die Reaktion hemmen [968].

Man nimmt daher als Richtwert die *Zykluszahl* an, bei der sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich vom Hintergrund abhebt. Dieser Wert wird als *Ct-Wert*⁸⁵³ bezeichnet, weil zu diesem Zeitpunkt die Vermehrung *noch exponentiell* ist [968].

In der Praxis wählt man einen Fluoreszenzwert, bei dem sich alle Kurven noch im exponentiellen Bereich befinden und ermittelt, nach wie vielen Zyklen die Kurven jeweils diesen Wert erreichen. Dieser Wert entspricht dem *Ct-Wert*.

Je niedriger der Ct-Wert ist, d. h. je früher sich das Fluoreszenzsignal von der Hintergrundstrahlung abhebt, desto höher ist die Zahl der Kopien des Zielgens, die zu Beginn in der Probe enthalten ist [968].

Theoretisch könnte man daraus auf die ursprüngliche *Templatemenge* zurückschließen, wenn man die Vermehrungsrate kennen würde. Die Amplifikation eines bestimmten Fragments wird von vielen Faktoren beeinflusst, so dass es oft leichter ist, parallel bekannte Templatemenngen zu amplifizieren, zu vergleichen und so festzustellen, welchen *Ct-Wert* man für welche Templatemenge erhält. Über die Erstellung einer Standardkurve lässt sich dann von einem *Ct-Wert* auf die Templatemenge schließen [968].

2.2.1.9.1. Berechnung nach der $\Delta\Delta Ct$ -Methode

Die unterschiedliche Genexpression wird als *n-fache Expression* mit Hilfe des $\Delta\Delta Ct$ -Wertes angegeben. Wichtig bei diesem Verfahren ist eine gleiche Effizienz der beiden beteiligten PCR-Reaktionen [968].

Von den errechneten Ct-Werten (jeweils die Mittelwerte der PCR-Dupletts auf der Reaktions-Platte) der jeweiligen Rattenfeten (Plazebo-, IGF-1-, und Kontrollgruppe) wurden die Ct-Werte (Mittelwerte der Dupletts) ihres jeweiligen *Housekeeping-Gens* abgezogen. Als Housekeeping-Gen diente hier das *Hprt1*⁸⁵⁴ der Ratte. Auf diese Weise errechnete sich der jeweilige ΔCt -Wert.

Housekeeping Gene sind *konstitutive* Gene, die für den Erhalt der zellulären Basisfunktionen von entscheidender Bedeutung sind und in allen Zellen eines Organismus in nahezu *konstanten Levels* exprimiert werden [971].

Das *HPRT1*-Gen codiert ein Enzym, die *Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1*. Dieses Enzym ist von großer Wichtigkeit für die Wiederverwertung von Purinen und damit für die Produktion von DNA und RNA. Die Neuproduktion von Purinen kostet den Organismus wesentlich mehr Energie und Zeit, als deren Wiederverwertung [971].

Mehr als 200 verschiedene Mutationen des *HPRT1*-Gens führen zum Auftreten des *Lesch-Nyhan-Syndroms*. Durch die Genmutationen kommt es zur Bildung einer unfunktionellen,

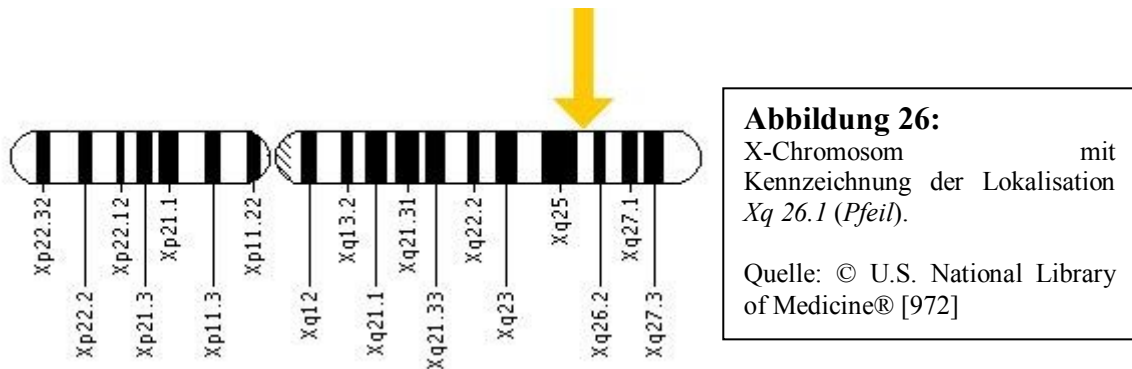
⁸⁵³ *Cycle Treshold* (engl.)

⁸⁵⁴ *Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1*

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

oder sehr stark in ihrer Funktion geschwächten *Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase*. Unter diesen Umständen akkumuliert Harnsäure, ein Abbauprodukt der Purine, im Organismus und verursacht *Arthritiden*⁸⁵⁵, Nieren- und Blasensteine. Allerdings ist es noch nicht geklärt, wie dieses Enzym die neurologischen Störungen und Verhaltensmuster der Patienten mit Lesch-Nyhan-Syndrom mit beeinflusst (z. B. die Beeinträchtigung der Schmerzempfindung, etc.) [972].

Das Gen *HPRT1* ist auf dem langen Arm⁸⁵⁶ des X-Chromosoms lokalisiert: *Xq 26.1* (siehe **Abbildung 26**) [972].



Aus den ΔC_t -Werten der Feten der Placebogruppe, wurde der Mittelwert (*mean ΔC_t -Placebo*) und aus den ΔC_t -Werten der Feten der unbehandelten Kontrollgruppe der Mittelwert (*mean ΔC_t -Control*) berechnet. Durch Subtraktion der ΔC_t -Werte der Feten der Placebo- und IGF1-Gruppe vom mittleren ΔC_t -Wert der Placebogruppe bzw. vom mittleren ΔC_t -Wert der unbehandelten Kontrollgruppe, errechnete sich der jeweilige $\Delta \Delta C_t$ -Wert.

Um den Expressionsunterschied zwischen den drei Gruppen zu ermitteln wurde dieser jeweilige Wert anschließend in die Formel: $2^{-\Delta \Delta C_t}$ eingesetzt [973].

$$\Delta C_t = C_{t \text{ Zielgen}} - C_{t \text{ Referenzgen}}$$

$$\Delta \Delta C_t = \Delta C_{t \text{ IGF-1}} - \Delta C_{t \text{ Placebo}}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta \Delta C_t}$$

Abbildung 27:
Formeln zur Berechnung der Ct-Werte.
Quelle: © The Board of Trustees of the University of South Carolina [973].

Die $\Delta \Delta C_t$ -Methode ist eine annäherungsweise Abschätzung der Verhältnisse [968]. Sie setzt eine Effizienz der Replikation der PCR von 100 % voraus, die zumeist in der Praxis nicht erreicht wird [968].

⁸⁵⁵ Gelenkentzündungen

⁸⁵⁶ *Q-Arm*. Im Gegensatz dazu wird der kurze Arm der Chromosomen als *P-Arm* bezeichnet.

2.2.2. Immunhistochemie

2.2.2.1. Theorie der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine *in situ*-Darstellung des Gewebes durch die Visualisierung von bestimmten Antigen-Antikörper-Komplexen. Dabei wird häufig der Antikörper markiert. Dieser Marker kann eine fluoreszierende Substanz, ein kolloidales Metall, ein *Hapten*⁸⁵⁷, eine radioaktive Substanz, oder auch ein Enzym sein. Die Gewebe können in frisch gefrorener, aber auch in eingebetteter Form (z. B. in Paraffin) verwendet werden. Es soll eine möglichst hohe Signalstärke des Markers bei möglichst geringem Hintergrundsignal erreicht werden [974].

Eine zentrale Technik stellt dabei die Anwendung von Antikörpern dar, die ein spezifisches Antigen mit einem Marker verbinden, der dann im Mikroskop sichtbar wird. Die Detektion eines Antigens in einem Gewebe wird generell als *Immunhistochemie* bezeichnet, während die Detektion eines Antigens in Zellkulturen als *Immunzytochemie* bekannt ist.

Für beide Methoden existiert ein großes Spektrum an Anwendungsmöglichkeiten, das sehr stark von der Art des Gewebes, des Antikörpers und Antigens, der Antigen-Antikörper-Affinität und den Detektionsmethoden abhängt. Die optimale Variante muss für jede individuelle Situation, in Abhängigkeit der oben genannten Variablen, entsprechend angepasst werden [974].

2.2.2.1.1. Fixation des Gewebes

Die Gewebefixation ist sehr wichtig, um das Gewebe in einer reproduzierbaren und möglichst lebensnahen Form zu konservieren. Ein ideales Fixativ sollte demnach die Zellen und das Gewebe, ohne Schwellungen oder Schrumpfungen zu verursachen, oder zelluläre Substanzen zu verändern oder herauszulösen, fixieren. Auch die Zersetzung des Gewebes durch Bakterien oder die Autolyse durch *Cathepsin*-haltige Zellen soll vermieden werden. Außerdem sollen Zellen und Gewebe auch vor Schäden geschützt werden, die durch die weitere Prozessierung und Färbung verursacht werden können [974].

Um dies zu erreichen, wird der Gewebekblock, der Gewebeschnitt, oder die Zellkultur meist mit einer Fixationsflüssigkeit behandelt. Das Fixativ stabilisiert und schützt Zellen und Gewebe. Kein Fixativ erfüllt allerdings alle Anforderungen, so dass bei dessen Auswahl, in Bezug auf die Gewebespezies und die geplanten Untersuchungen, Kompromisse eingegangen werden müssen. Im Zweifelsfall kann es auch nötig sein, mehrere verschiedene Fixations- und Färbemethoden auszuprobieren, um so die beste Variante zu finden [974].

Die Fixative können auf verschiedene Arten wirken: durch Bildung von *Vernetzungen* im Gewebe (z. B. *Glutaraldehyd* und *Formalin*), durch *Denaturierung* von Proteinen (z. B. *Aceton* und *Methanol*), oder durch eine *Kombination* aus beiden Varianten. Die Stärke und Dauer der Fixation müssen entsprechend angepasst werden, damit Antigene und zelluläre Strukturen nicht zu stark verändert werden und die Maskierung von *Epitopen*⁸⁵⁸ möglichst gering gehalten werden kann [974].

⁸⁵⁷ unvollständiges Antigen (1)

⁸⁵⁸ Bindungsstellen der Antigene

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Bei *Gefrierschnitten* wird das Gewebe auf dem *Cryostat*⁸⁵⁹ geschnitten. Der Vorteil der Gefrierschnitte liegt in ihrer schnellen Herstellung, ihrer exzellenten Konservierung der Antigene und ihrer Flexibilität, denn jeder Gefrierschnitt kann in weiterer Folge mit dem gewünschten Fixativ weiterbehandelt werden. Allerdings zeigen Gefrierschnitte geringere morphologische Details, als andere Schnitte (z. B. *Paraffinschnitte*). Die Art der Durchführung des Einfrierens hat entscheidende Auswirkungen auf die Qualität des Schnittes. Erfolgt sie zu langsam, können Artefakte (wie Eiskristalle) entstehen, die die Interpretation des Gewebeschnittes massiv erschweren können.

Deshalb sollte das Gewebe sehr dünn (maximal 3 mm) geschnitten werden und schnell in flüssigem Stickstoff gefroren werden. Mit dem Cryostat werden dann Schnitte von 7 µm hergestellt und diese werden dann bei 37 °C über Nacht getrocknet, bevor eine Fixierung, Färbung oder Lagerung erfolgt.

Für sofortige immunhistochemische Färbungen werden die Schnitte für 20 Minuten in *Aceton* oder *Methanol* fixiert [974].

Durch eine ausreichende Trocknung der Gewebeschnitte (über Nacht), kann die Zerstörung der Membranen reduziert werden. Die Trocknung beeinflusst die Antigenität des Schnittes nicht. Das Gewebe kann dann auch für viele Jahre in flüssigem Stickstoff, oder bei -70°C, gelagert werden, ohne dass dies zu Verlusten der Antigenität führt. Allerdings sollte man die Gewebe in Aluminiumfolie einpacken oder in ein entsprechendes Medium einbetten, um eine Austrocknung zu verhindern [974].

2.2.2.1.2. Detektion des Antikörpers

Die zwei häufigsten Techniken der Antikörper-Detektion sind heute die *Fluoreszenz* und die *colorimetrische Detektion (Enzym-mediert)* [974].

Enzym-medierte Detektion

Ein *Substrat*, das durch ein Enzym umgesetzt wird, kommt bei dieser Methode zur Anwendung. Häufig verwendete Substrate sind z. B. *DAB*⁸⁶⁰, *3-Amino-9-Ethylcarbazol*, *4-CN*⁸⁶¹, und andere [974].

Fluoreszenz

Ein fluoreszierendes Molekül kann an den Antikörper angelagert werden und dann unter Anwendung von UV-Licht nachgewiesen werden. Beispiele für solche Moleküle sind: *Fluoreszein*, *Rhodamin*, *Texas Red*® u. a. Die Detektion hängt von den verfügbaren Filtersets der Mikroskope ab. Für längere Beobachtungen der Fluoreszenz stehen so genannte „*Anti-Fading-Lösungen*“ zur Verfügung [974].

2.2.2.1.3. Signalverstärker

Signalverstärker steigern das Fluoreszenzsignal und damit die Sensitivität der Immunhistochemie. Die Signale können durch die Anwendung von *poly-konjugierten, sekundären Antikörpern*, *Avidin-Biotin-Interaktionen*, oder anderer Verstärker (*Tyramid-katalysierte Systeme*) verstärkt werden. Man sollte sich allerdings bewusst sein, dass auch unspezifische Signale durch diese Anwendungen verstärkt werden [974].

⁸⁵⁹ Gefrierschnittgerät

⁸⁶⁰ *Diaminobenzidin*

⁸⁶¹ *4-Chloro-1-Naphthol*

2.2.2.1.4. Allgemeines Protokoll für das Immunostaining

Die Detektion eines Einzelproteins mit Hilfe des Western-Blots ist eine dringliche Voraussetzung. Jeder verwendete Antikörper sollte vom Untersucher auf einem Western-Blot des Gewebes getestet werden, um Unterschiede bezüglich der Gewebe zu erkennen. Danach kann der Antikörper auf den Gewebeschnitten getestet werden. Wichtig sind dabei *Nullkontrollen* ohne die Zugabe des primären Antikörpers (zum Nachweis von *direktem Staining* des sekundären Antikörpers) und ohne Zugabe des sekundären Antikörpers (um zu erkennen, ob der primäre Antikörper eine *endogene Peroxidase-Aktivität*, oder *Autofluoreszenz* trägt) [974].

2.2.2.2. Praktische Durchführung des Immuno-Stainings:

Für die Immunhistochemie wurden bei dieser Studie die linken Lungen der Rattenfeteten mit einer CDH herangezogen.

Nach der operativen Gewinnung der linken Lungen der Rattenfeteten wurden diese in Cryo-Röhrchen (Cryo.S®, Cellstar®; Greiner Bio-One GmbH) überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und dort bis zur Herstellung der Gewebeschnitte gelagert.

Mit Hilfe des *Cryostats* (HM 560 Cryo-Stat®; Microm GmbH) wurden 7 µm dünne Gewebeschnitte angefertigt (Einbettung in *O.C.T.-Compound*, Tissue-Tec®; Sakura), auf Objektträgern (Super Frost®Plus; Menzel) bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet und dann bei -20°C gelagert.

Die Gewebeschnitte für das Staining für TTF1, BMP4, Podoplanin, SMA, FGF10 und Ki67 wurden für 10 Minuten bei Raumtemperatur in 100% Aceton (Nr. 100014, Merck) fixiert, jene für das Staining für IGF-1 hingegen für 10 Minuten bei 4 °C in 100% Methanol (Merck, Nr. 6009). Dann erfolgte die Trocknung bei Raumtemperatur und anschließend die Anbringung der wasserabweisenden Umrandung der Gewebeschnitte auf den Objektträgern mit einem Spezialstift (DAKO-Pen®, Nr. S 2002; DAKO GmbH).

Zur Rehydrierung wurden die Schnitte für SMA und BMP4 für 10 Minuten in PBS (pH 7,2-7,3; Na₂HPO₄: 14,625 g, Nr. 6580, Merck; KH₂PO₄: 2,45 g, Nr. 4873, Merck; NaCl: 80,0 g, Nr. 6404, Merck; steriles Aqua dest.), jene für Ki67, IGF-1, TTF1, Podoplanin, und FGF10 in TBS (Tris Base, Nr. 8382, Merck; NaCl, Nr. 6404, Merck; Aqua dest.) überführt (nach Protokoll: IHC-World; http://www.ihcworld.com/_protocols/washing_buffers/pbs.htm).

Danach erfolgte die Peroxidase-Blockierung durch Behandlung der Gewebeschnitte (SMA, BMP4, IGF-1, TTF1, Podoplanin, und FGF10) für 30 Minuten mit 0,3% H₂O₂ (Wasserstoff-Peroxid, 30%, Nr. 95313, Fluka) und Methanol (Methanol reinst, Nr. 6009, Merck).

Nach Spülen wurde der Block-Step für 60 Minuten mit *HorseN-Serum* (10%, Nr. sc-2483, Szabo Scandic) und BSA (1%, Nr. A7906, Sigma Aldrich) in PBS (für SMA, IGF-1, TTF1 und Podoplanin); mit 10% *HorseN-Serum*, 1% BSA und 0,5% Tween (Tween®20; Nr. 822185, Merck) in TBS (für Ki67); mit *GoatN-Serum* (10%, Nr. X0907, DAKO GmbH), 1% BSA in TBS (für FGF10) und 10% *GoatN-Serum*, 1% BSA in PBS (für BMP4), durchgeführt.

Nach Abkippen erfolgte das Staining mit dem *primären Antikörper* (1-3 Stunden):

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

TTF1: mouse monoclonal IgG 1:50, ab72876 (Abcam plc.), in Diluent (Anti-Body Diluent, Nr. S0809; DAKO GmbH);
Podoplanin: Anti-Rat Podoplanin Monoclonal Antibody, 1:200, Cat. Nr.:11-035 (EUBIO), in Diluent (DAKO GmbH);
SMA: Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin; 1:100, M0851 (DAKO GmbH), in Diluent (DAKO GmbH);
IGF-1: Santa Cruz IGF-1 (W18); sc-74116, 1:50 (Szabo Scandic) in Diluent (DAKO GmbH);
Ki67: Monoclonal Mouse Anti-Rat Ki67 Antigen; M7248; 1:200 (DAKO GmbH), in Diluent (DAKO GmbH);
BMP4: rabbit polyclonal IgG to BMP4, ab39973, 1:1000 (Abcam plc.), in Diluent (DAKO GmbH) und
FGF10: Santa Cruz FGF10 (H-121); sc-7917, 1:50 (Szabo Scandic), in Diluent (DAKO GmbH).

Nach intensivem Waschen wurden die Schnitte mit dem *sekundären Antikörper* inkubiert (30 Minuten):

TTF1, Podoplanin, SMA, IGF-1 und Ki67: mit *BA 2001* (biotinylated Anti-Mouse IgG (H+L), produced in horse; Vector Laboratories), 1:200, in PBS;
BMP4 und FGF10: mit *BA 1000* (biotinylated Anti-Mouse IgG (H+L), produced in goat; Vector Laboratories), 1:600, in PBS.

Nach Waschen in TBS bzw. PBS erfolgte die 30-minütige Inkubation der Gewebeschnitte mit *ABC* (VECTASTAIN Elite® ABC-Kit; Vector Laboratories).

Dann, nach neuerlichem Waschen in TBS bzw. PBS, wurde die Färbung der Gewebeschnitte mit *AEC+®* (High Sensitivity Substrate Chromogen System, Code K3461; DAKO GmbH) durchgeführt.

Anschließend erfolgte die Gegenfärbung mit *Hämalaun-Lösung* (Mayer's Hämalaun-Lösung, Nr. 9249; Merck) und die Eindeckelung mit im Wasserbad vorgewärmter Glyceringelatine (Kaisers Glyceringelatine, Nr. 9242; Merck).

Die Quantifizierung der Gewebe-Slides erfolgte mit Hilfe des Mikroskops (Research Microscope BX 51; Olympus GmbH). Mit der am Mikroskop angebrachten Kamera (Universal camera DP71; Olympus GmbH) und der Software cell[^]D® (Ver. 3.4; Olympus Software Imaging Solutions GmbH) wurden von jedem Gewebeschnitt in 400-facher Vergrößerung fünf nicht-überlappende Gesichtsfelder fotografiert und mit der Software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) ausgewertet.

Die anschließende statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software: GraphPad Prism (Ver. 5.04; GraphPad Software Inc.).

2.2.3. Bedeutung der verwendeten Zellmarker in der immunhistochemischen und PCR-Analyse

Zur Untersuchung einer veränderten Zellteilungsaktivität in den Lungen, kam in dieser Studie sowohl auf immunhistochemischer, als auch auf genetischer Ebene der Proliferationsmarker **Ki-67** zur Anwendung.

Ki-67 oder MKI67 ist ein Protein, das zur Markierung von sich teilenden menschlichen Zellen geeignet ist. Während der Interphase kann das Antigen im Inneren des Zellkerns gefunden werden. Zur Zeit der Mitose ist ein Großteil des Proteins auf die Oberfläche des

Chromosoms verlagert. Der Umstand, dass das Protein während der aktiven *G(1)*-, *S*-, *G(2)*- und *M-Phase* des Zellzykluses vorhanden ist, aber in der *G(0)*-Phase von ruhenden Zellen fehlt, macht es zu einem guten Marker, um die *Wachstumsfraktion*⁸⁶² einer Zellpopulation zu bestimmen [975]. Dies wurde auch für die Anwendung in Rattengewebe gezeigt [1004,1005]. Somit sollte mit der Analyse dieses Markers die *Veränderung der proliferativen Aktivität* der Zellen der fetalen Lungen, nach der rhIGF-1-Applikation, im Vergleich zur Placebogruppe und unbehandelten Gruppe von Rattenfeteten untersucht werden.

Auf den beiden zuvor erwähnten Ebenen wurden auch die mRNA- und die Proteinexpression von **BMP4**⁸⁶³ untersucht.

BMP4 ist ein sehr wichtiges Morphogen, das während der embryonalen Lungenentwicklung im peripheren Epithel exprimiert wird [976]. BMP4 ist ein Mitglied der großen Familie der *bone morphogenetic proteins*, die wiederum einen Teil der *transforming growth factor- β -Superfamilie* bildet. Diese beinhaltet viele Faktoren des Wachstums und der Differenzierung. BMP4 ist gemeinsam mit *sonic hedgehog* an der Bildung der dorso-ventralen Achse in der embryonalen Entwicklung beteiligt (siehe **Kapitel 1.6**).

BMP4 stimuliert auch die Differenzierung von benachbartem ektodermalem Gewebe [977]. Es ist von großer Wichtigkeit für die Kontrolle der Verzweigung der Lunge und die Entwicklung des proximal-distale Differenzierungsmuster des sich entwickelnden Lungenepithels [167]. BMP4 wird in hohen Levels im distalen Epithel exprimiert und wirkt der durch FGF10 induzierten Knospbildung entgegen. Eine Blockade des Signalwegs von BMP4 führt zu einer Reduktion der distalen Typen der Alveolarepithelzellen bei einem begleitenden Anstieg der Zahlen der Zilien-tragende Zellen und *Clara-Zellen* [976].

Die Untersuchung der Expression des Bmp4 im Gewebe der fetalen Rattenlungen sollte Aufschluss über die Wirkung des applizierten rhIGF-1 auf die Proliferation des Epithels und die Verzweigungsvorgänge der Lungen geben.

Um den Einfluss des rhIGF-1 auf die *Knospung* der fetalen Lungen zu beschreiben, wurde die Quantifizierung von **FGF10** auf der prä- und posttranslationalen Ebene durchgeführt. Die mRNA-Expression des *Fgf10* war beispielsweise in CDH-Lungen, verglichen mit jenen der Kontrollgruppen, reduziert, was darauf hindeutete, dass die verminderte Synthese von Fgf10 die pulmonale Hypoplasie mit verursachen könnte (siehe **Kapitel 1.12.7**) [978].

Um die Aufnahme des applizierten rhIGF-1 aus dem fetalen Fruchtwasser in die Lungen beurteilen zu können, wurde ein immunhistochemisches Staining der Gewebeschnitte der fetalen Lungen mit **Anti-humanem IGF-1-Antikörper** (siehe **Kapitel 2**) durchgeführt.

Die RT-PCR wurde weiters zur Quantifizierung der **Igf-1r-** und **Igf-2r-mRNA-Expression** in den fetalen Lungengeweben der Ratten durchgeführt.

Nachdem in Gen-Deletionsmodellen für *Igf-1*, *Igf-2* und *Igf-1r*⁸⁶⁴ eine Verschlechterung der zellulären Proliferationsrate ersichtlich war, könnte man daraus ableiten, dass die zelluläre Hypoplasie das Resultat von geringeren proliferativen Ereignissen, die auf eine Veränderung der *Zellzyklus-Rate* zurückgehen, darstellen könnte (siehe **Kapitel 1.13.1.4**)

⁸⁶² Fraktion der sich aktiv teilenden Zellen

⁸⁶³ Bone morphogenetic protein-4

⁸⁶⁴ IGF-1-Rezeptor

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

[979]. Zum Beispiel wurde eine Verlängerung der Zellzyklus-Dauer an *Fibroblasten*, die von *Igf-1r(-/-)*-Embryonen isoliert wurden, beobachtet [980].

Der IGF-1R ist ein Transmembran-Rezeptor, der durch IGF-1, aber auch durch IGF-2 aktiviert wird. Er gehört zur großen Klasse der Tyrosinkinase-Rezeptoren. Dieser Rezeptor mediiert die Effekte von IGF-1. IGF-1 spielt eine entscheidende Rolle im Wachstum und hat am Erwachsenen anabole Effekte der Skelettmuskulatur und anderer Gewebe. Mäuse mit einer homozygoten *Igf-1r(-/-)*-Mutation zeigten stark veränderte Phänotypen und ein deutlich reduziertes Körpergewicht (siehe **Kapitel 1.13.2**) [981].

Der IGF-2R, auch als *Kationen-unabhängiger Mannose-6-Phosphat-Rezeptor* (CI-MPR) bekannt, ist ein Protein, das vom *IGF-2R*-Gen codiert wird. Der IGF-2R ist ein multifunktionaler Proteinrezeptor, der IGF-2 an der Zelloberfläche, und *Mannose-6-Phosphat-gebundene Proteine* im Trans-Golgi-Netzwerk bindet [982]. Die Struktur des IGF-2R entspricht einem *Typ 1-Transmembran-Protein* (einfaches Transmembranprotein mit einem *C-Terminus* auf der zytoplasmatischen Seite der Lipidmembran) mit einer großen *extrazellulären/luminalen Domäne* und einem relativ kurzen, *zytoplasmatischen Schwanz* [976]. Die extrazelluläre Domäne besteht aus einer kleinen Region, die ein Homolog zur Bindungsdomäne von Fibronectin bildet, und aus 15 Wiederholungen von annähernd 147 Aminosäure-Resten.

Jede dieser Wiederholungen ist homolog zur extrazytoplasmatischen Domäne des *Mannose-6-Phosphat-Rezeptors* aufgebaut. Die Bindung von IGF-2 wird durch eine dieser Wiederholungen mediiert, während zwei verschiedene Wiederholungen für die Bindung des *Mannose-6-Phosphats* verantwortlich sind. Die Funktion des IGF-2R liegt in der *Clearance* von IGF-2 von der Zelloberfläche (Signalabschwächung) und im Transport *lysosomaler Hydrolase-Vorläufer* vom Golgi-Apparat zu den Lysosomen.

Nach der Bindung von IGF-2 auf der Zelloberfläche, akkumulieren die IGF-2Rs in Form von *Clathrin-coated vesicles* und werden internalisiert. Die IGF-2Rs sowohl der Zelloberfläche, als auch des Golgi-Apparates, werden zu den primären Endosomen transportiert, wo die IGF-2Rs ihre Fracht abgeben.

Die IGF-2Rs werden dann im Golgi-Apparat recycelt [976].

Für die genetische und posttranslational Quantifizierung des Potentials der *Surfactant-Bildung* im Lungengewebe der fetalen Ratten, wurde sowohl immunhistochemisch, als auch mit Hilfe der RT-PCR, das Vorkommen von **Ttf1** analysiert.

Der Thyroidale Transkriptionsfaktor 1 ist ein Protein, das unter anderem die Transkription von bestimmten Genen in der Schilddrüse kontrolliert. TTF1 wird vom Homöobox-Gen *NKX2-1* codiert und ist nicht nur im Menschen sondern auch in einer Vielzahl von Tierarten nachgewiesen worden. Das beim Menschen 371 Aminosäuren lange, im Zellkern lokalisierte Protein enthält in seiner Aminosäuresequenz eine 60 Aminosäuren lange *Homöodomäne*⁸⁶⁵, über die TTF1 an spezifische DNA-Sequenzabschnitte binden kann.

Diese DNA-Bindung ist Voraussetzung für die Steuerung der Transkription anderer Gene. TTF1 ist im Zusammenspiel mit dem Transkriptionsfaktor PAX8 für die Expression von Thyreoglobulin⁸⁶⁶ und der Thyreoperoxidase⁸⁶⁷ in der erwachsenen Schilddrüse essentiell [983]. Darüber hinaus soll TTF1 die Expression von *Surfactant-Proteinen* in der Lunge steuern. TTF1 spielt nicht nur im erwachsenen Organismus, sondern auch während der Organogenese der Schilddrüse, der Lunge und des Gehirns eine wichtige Rolle [984].

⁸⁶⁵ Die Homöodomäne ist eine Proteindomäne (also ein Proteinteil), die an DNA binden kann (133).

⁸⁶⁶ Schilddrüsenhormon-bindendes Globulin (1)

⁸⁶⁷ Die *Thyreoperoxidase* (TPO) ist ein Enzym, das den ersten Reaktionsschritt in der Synthese der Schilddrüsenhormone aus der Aminosäure *Tyrosin* katalysiert (1).

Knockout-Mäuse, in denen das *Ttfl*-Gen inaktiviert ist, sterben bei der Geburt und weisen weder eine Schilddrüse, noch ein Lungenparenchym auf. Außerdem fehlen diesen Mäusen Teile des Vorderhirns und die Hypophyse (siehe **Kapitel 1.6**) [985].

Mit der Analyse des *Ttfl*-Proteins, bzw. der *Ttfl*-Genexpression in den Lungengeweben, sollten die Produktion und das Produktionspotential des *Surfactants*, und damit auch die Funktionsfähigkeit und Anzahl der ***Alveolarepithelzellen vom Typ II***, quantifiziert werden.

Podoplanin (T1 α) ist ein membranständiges Glykoprotein, welches in diversen Geweben exprimiert wird, so auch auf *Nieren-Podozyten*⁸⁶⁸, nach welchen es benannt wurde [986]. Da Podoplanin stark auf *lymphatischen Endothelzellen*, nicht aber auf *Blut-Endothelzellen* exprimiert wird, dient es als *Marker für Lymphgefäße* [987]. Die genaue physiologische Funktion von Podoplanin ist unbekannt. Versuche mit *Podoplanin*-Knockout-Mäusen haben jedoch gezeigt, dass das Protein an der Entwicklung der Lunge [988] und des lymphatischen Gefäßsystems beteiligt ist [989].

Podoplanin bindet an den Thrombozytenrezeptor CLEC-2 des Menschen und auch der Maus (Clec-2). Knockout-Mäuse des *Podoplanin*-Gens prägten Entwicklungsschäden am Herz aus [990]. Podoplanin sollte in dieser Studie mittels PCR-Analyse untersucht werden und als Marker für die ***Alveolarepithelzellen vom Typ I*** herangezogen werden.

Alpha-Actin-2, auch bekannt als *aortic smooth muscle* oder ***alpha smooth muscle actin*** (α -SMA) ist ein Protein, das beim Menschen vom *ACTA2*-Gen codiert wird. Dieses ist auf dem Chromosom 10q22-q24 lokalisiert [991].

Alpha-Actin-2, das humane glattmuskuläre Antigen der Aorta, ist eine von sechs unterschiedlichen Actin-Isoformen, die bisher identifiziert wurden. Die Actine sind hochkonservative Proteine, die in die Zellmotilität, -Struktur und -Integrität involviert sind. Die Alpha-Actine sind ein wichtiger Bestandteil des kontraktiven Apparates, während die Beta- und Gamma-Actine in die Zellmotilität involviert sind. Das Alpha-Actin wird im Skelettmuskel gefunden. Defekte dieses Gens führen zur Entstehung eines Aortenaneurysmas (*familiäres thorakales Aortenaneurysma Typ 6*). Es wurden viele unterschiedliche Spleißvarianten entdeckt, die für das gleiche Protein codieren [992]. Alpha-smooth muscle actin (α -SMA) wird häufig als Marker der Myofibroblasten-Bildung eingesetzt [991]. In dieser Studie wurde es zur Darstellung und Beurteilung der *glatten Muskulatur* in den Bronchien und Gefäßen der Lunge mit Hilfe der Immunhistochemie herangezogen.

Der **vascular endothelial growth factor receptor 1** (VEGFR-1) ist ein Protein, das vom *Flt*⁸⁶⁹-1-Gen codiert wird. Das Protein zeigt eine Tyrosinkinase-Aktivität und ist wichtig für die Proliferation und Differenzierung verschiedener Gewebe. Die Sequenz und Struktur des *Flt*-Gens ähnelt jener des *FMS*⁸⁷⁰-Gens, wovon sich auch der Name ableitet [993]. In dieser Studie fand es als *Proliferationsmarker* analytische Verwendung.

⁸⁶⁸ Die *Podozyten* (von griech. „*podos*“=Fuß und griech. „*cytos*“=Zelle) sind Zellen der Nierenkörperchen. Sie bilden das innere Blatt der *Bowman-Kapsel* und sind daher, zusammen mit der Basalmembran, für die Filterfunktion der Nieren von besonderer Bedeutung. Aufgrund ihrer äußeren Form – vielfach miteinander *verzahnter Fortsätze* – werden sie auch als sogenannte *Filtrationsschlitze* bezeichnet (134).

⁸⁶⁹ *FMS-like tyrosine kinase*

⁸⁷⁰ Das *FMS*-Gen gehört zu einer Genfamilie, die ursprünglich aus einer Zelllinie des *Feline Sarcoma Virus* isoliert wurde. Das Proto-Onkogen *fms* (*c-fms*) codiert den MCSF-Rezeptor (*Macrophage Colony-Stimulating Factor*) (135).

FLK-1/KDR⁸⁷¹ (VEGFR-2) ist ein membranständiger Rezeptor der Tyrosinkinase-Familie, der nur in Endothelzellen exprimiert wird. Eine frühe Expression des *Flk-1*-Gens wurde an embryonalen Mäusen beschrieben, wo er offenbar eine bedeutende Rolle in der *Vasculogenese* und *Endothelbildung* spielt. An der erwachsenen Maus zeigte sich eine *Down-Regulation* der Flk-1/Kdr-Expression [994]. Die PCR-Analyse der *Kdr*-mRNA-Expression sollte hier zur Beurteilung der *Gefäß-* und *Endothelbildung* in den fetalen Rattenlungen herangezogen werden.

Der vascular endothelial growth factor (VEGF) ist ein wichtiges Signalmolekül, das sowohl in der *Vasculogenese*⁸⁷², als auch in der *Angiogenese* seine Wirkung entfaltet. Dieser Faktor stimuliert vaskuläres Endothel, hat aber auch Effekte auf andere Zellen (z. B. Stimulation der Migration von *Monozyten* und *Makrophagen*).

In vitro stimuliert VEGF die Teilung und Migration von Endothelzellen. Es sind sieben verschiedene Formen des VEGF bekannt (A-F, sowie PIGF⁸⁷³) [995]. Bei Erwachsenen wird **VEGF-A** in fast allen Gefäßgeweben gefunden und es wird vermutet, dass er für die vaskuläre Homöostase notwendig ist. Das *VEGF-A*-Gen kann durch *alternatives Splicing* verschiedene Varianten des Proteins VEGF-A von unterschiedlicher Länge hervorbringen. Diese Proteine unterscheiden sich jeweils nur durch kurze Domänen am *C-Terminus*⁸⁷⁴, was jedoch einen großen Einfluss auf ihre biologische Funktion hat und ihre Interaktion mit *Heparan-Sulfaten* und dem Co-Rezeptor Neuropilin⁸⁷⁵ steuert [996].

Auch die Beurteilung der *Vegf-a*-mRNA-Expression wurde mit Hilfe der RT-PCR in dieser Studie durchgeführt, um die *Vasculo-* und *Angiogenese* in den fetalen Lungen beurteilen zu können.

Das **Plat-Gen** codiert den *Tissue-type plasminogen activator*, eine Serinprotease, die das Proenzym Plasminogen in Plasmin⁸⁷⁶, ein fibrinolytisches Enzym, umwandelt.

Der *Tissue-type plasminogen activator* spielt eine Rolle bei der Zellmigration und dem *Gewebs-Remodeling*⁸⁷⁷. Eine gesteigerte Enzymaktivität führt zu *Hyperfibrinolyse*⁸⁷⁸ und manifestiert sich folglich durch exzessive Blutungsneigung. Im Gegensatz dazu führt eine reduzierte Aktivität zu einer *Hypofibrinolyse*⁸⁷⁹, was *Thrombosen*⁸⁸⁰ und *Embolien*⁸⁸¹ auslösen kann [997].

⁸⁷¹ Der Kinase Insert Domain Receptor (KDR), auch als *Vascular endothelial growth factor receptor-2* (VEGFR-2) bekannt, ist ein VEGF-Rezeptor. Er wird vom *KDR*-Gen codiert. *KDR* ist auch als *Flk1* (*Fetal Liver Kinase 1*) bekannt (136).

⁸⁷² *de novo* Bildung des embryonalen Blutkreislaufes (1)

⁸⁷³ Das *Phosphatidylinositol-glycan biosynthesis class F protein* kommt auf vielen Oberflächen von Blutzellen vor und dient als Anker für Proteine (137).

⁸⁷⁴ Der *C-Terminus* (*Carboxyl-Terminus*) eines Proteins ist das Ende der Aminosäurekette, das eine freie *Carboxylgruppe* aufweist (-COOH) (138).

⁸⁷⁵ *NRP* ist ein membrangebundener Co-Rezeptor für den *Vascular endothelial growth factor*. Er spielt auch eine Rolle in der *Angiogenese* (139).

⁸⁷⁶ Plasmin ist ein wichtiges Enzym aus der Gruppe der *Peptidasen*, welches viele Proteine im Blutplasma spalten und abbauen kann. Diese Eigenschaft wird besonders am *Fibrin* in Blutgerinnseln wirksam. Der dabei ablaufende Prozess wird *Fibrinolyse* (*Fibrinspaltung*) genannt (140).

⁸⁷⁷ Umbau-Prozesse im Gewebe durch Auf- und Abbau.

⁸⁷⁸ Vermehrte Auflösung von *Fibrin*.

⁸⁷⁹ Verminderter Abbau von *Fibrin*

⁸⁸⁰ Eine *Thrombose* ist eine Gefäßerkrankung, bei der sich ein Blutgerinnsel (*Thrombus*) in einem Gefäß bildet.

Sehr häufig ist eine Thrombose der Venen (*Phlebothrombose*), speziell der tiefen Beinvenen (tiefe Venenthrombose-*TVT*), gemeint. Arterielle Thrombosen sind deutlich seltener (141).

⁸⁸¹ Unter *Embolie* versteht man in der Medizin den teilweisen oder vollständigen Verschluss eines Blutgefäßes durch mit dem Blut eingeschwemmtes Material. Dazu gehören *körpereigene* und *-fremde Substanzen* wie Fetttropfen, Blutgerinnsel und Luftblasen (142).

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

In dieser Studie sollte *Plat* der Untersuchung des Gewebeumbaus und der Zellmigration, sowie der Bildung der Gefäße in den distalen Luftwegen in den fetalen Lungen der Ratten dienen.

Das *Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1)* ist ein Protein, das vom *PECAM-1*-Gen codiert wird. Es spielt eine Rolle bei der Entfernung überalterter *Neutrophiler*⁸⁸² aus dem Körper [998]. PECAM-1 befindet sich an der Oberfläche von *Thrombozyten, Monozyten, Makrophagen* und einigen *T-Zellen*, und großteils in den interzellulären Verbindungen der Endothelzellen. Das Protein ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie und ist in die *Leukozytenmigration, Angiogenese* und *Aktivierung von Integrin*⁸⁸³ involviert [999].

Mit Hilfe der PCR sollte in dieser Studie die *Pecam-1*-mRNA-Expression untersucht und so das *Vorkommen von Endothelzellen* in den fetalen Rattenlungen analysiert werden.

⁸⁸² *Neutrophile Granulozyten*

⁸⁸³ *Integrine* sind Eiweißmoleküle, die in allen tierischen Zellen, mit Ausnahme der roten Blutkörperchen, vorkommen. Sie sind dauerhaft in der Zellmembran verankert und durchqueren die Zellmembran. Sie zählen damit zu den Transmembranproteinen (143).

3. Ergebnisse

Eine **Übersicht mit allen biometrischen Daten der Rattenfeten** ist dem Anhang dieser Arbeit zu entnehmen.

3.1. Allgemeine und morphologische Parameter der Feten

3.1.1. Fetale Mortalität

20 der insgesamt 83 Nitrofen-exponierten Feten waren am Tag 21,5 nicht mehr am Leben und wurden somit aus der Studie ausgeschlossen. Dies entspricht einer *Mortalitätsrate* von 24,10% (siehe **Tabelle 5**).

Von den überlebenden 63 Feten wurden nur jene der IGF-1- und Placebogruppe einbezogen, die eine Zwerchfellhernie aufwiesen (CDH+). Von diesen 45 Feten wurden nach dem Zufallsprinzip **jeweils 15 Feten** der Placebo- und der IGF-1-Gruppe ausgewählt und in die Studie einbezogen.

Neben der eigentlichen Studiengruppe wurden **5 gesunde Feten** von völlig unbehandelten gesunden Muttertieren als externe Kontrollgruppe zur Erstellung von Baseline-Werten in die Studie einbezogen.

3.1.2. Quote der Zwerchfellhernien

Das an die trächtigen Mutterratten verabreichte Nitrofen, führte in dieser Studie zum Auftreten von **linksseitigen Zwerchfellhernien** an 45 von insgesamt 63 obduzierten und Nitrofen-exponierten Feten, die zum Zeitpunkt E21,5 am Leben waren. Dies entspricht einer Nitrofen-induzierten CDH-Quote von 71,43%. 30 dieser CDH-positiven Feten wurden in diese Studie aufgenommen (jeweils 15 Feten in die Placebo- und 15 Feten in die IGF-1-Gruppe).

Insgesamt 18 Feten (28,57%) der IGF-1- und Placebogruppe wiesen trotz mütterlicher Nitrofenverabreichung keine Zwerchfellhernien auf (CDH-) (siehe **Tabelle 5**).

Eine rechtsseitige CDH kam unter den Feten dieser Studie erwartungsgemäß nicht vor.

Tabelle 5:
Übersicht über die Anzahl der Feten.

	Übersicht über die Nitrofen-exponierten Feten der Behandlungsgruppe				
	am Tag 19 am Leben	am Tag 20 am Leben	am Tag 21,5 am Leben	CDH- positiv	CDH- negativ
Anzahl der Feten	83	71	63	45	18
fetale Überlebensrate	100%	85,54%	75,90%		
CDH-Quote				71,43%	28,57%
fetale Mortalität	0%	14,46%	24,10%		

3.1.3. Fetale Körpergewichte, Lungengewichte und LBWRs

Die Daten der Plazebo- und IGF-1-Gruppe wurden mittels des 2-tailed **unpaired t-Tests** ausgewertet. Zur visuellen Darstellung von “Normalwerten” wurde in jedem Diagramm der Mittelwert (Mean) der unbehandelten Feten der Kontrollgruppe als punktierte Linie eingeblendet. P-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikante Werte angenommen. Die Daten wurden als **Mean ± SD** (Mittelwert ± Standardabweichung) dargestellt.

Das mittlere fetale Körpergewicht betrug in der Kontrollgruppe (n=5) **5707,0 ± 142,2 mg** (Mean ± SD), in der Plazebogruppe (n=15) **4447,0 ± 547,2 mg** und in der IGF-1-Gruppe (n=15) **3831,0 ± 874,1 mg** (siehe **Abbildung 28**). Im Vergleich zur Plazebogruppe fiel in der IGF-1-Gruppe mittels des t-Tests eine **signifikante mittlere Gewichtsreduktion** von **616,1 ± 266,3 mg** (p-Wert: 0,0282) auf.

Die mittleren feuchten fetalen Lungengewichte beliefen sich in der Kontroll-, Plazebo- und IGF-1-Gruppe auf **183,80 ± 17,15 mg**; **68,67 ± 9,71 mg** und **61,93 ± 15,17 mg** (siehe **Abbildung 29**). Zwischen der Plazebo- und der IGF-1-Gruppe betrug der mittlere Unterschied hier **6,73 ± 4,65 mg** (p-Wert: 0,16) und war somit nicht signifikant. Allerdings fiel eine Gewichtsreduktion dieser beiden Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (>50%).

Die mittleren *Lung-to-Body Weight Ratios* (LBWRs) erreichten in der Kontroll-, Plazebo- und IGF-1-Gruppe Werte von **0,032 ± 0,003**; **0,016 ± 0,002** und **0,016 ± 0,003** (siehe **Abbildung 30**). Dabei zeigte sich im Vergleich der Plazebo- zur IGF-1-Gruppe eine mittlere Abweichung von **-0,001 ± 0,001** (p-Wert: 0,40). Der Vergleich dieser beiden Gruppen zum Mittelwert der Kontrollgruppe ergab auch hier eine deutliche Reduktion um etwa 50%.

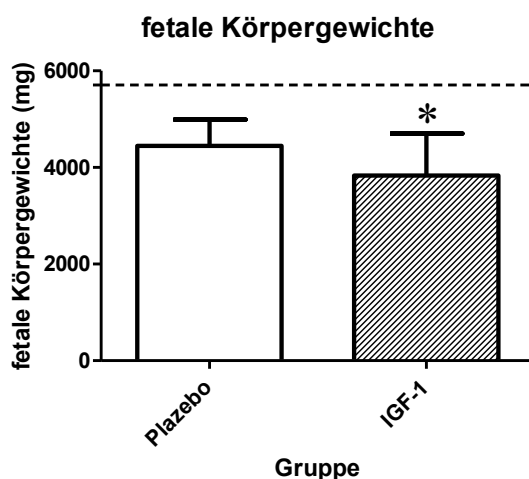


Abbildung 28:
Fetale Körpergewichte der verschiedenen Gruppen. *: p-Wert <0,05

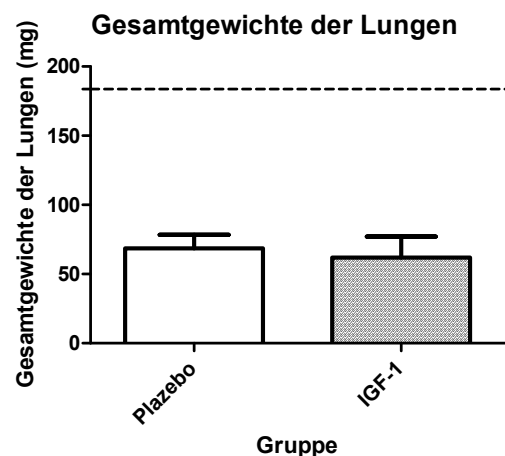


Abbildung 29:
Fetale Lungengewichte der verschiedenen Gruppen.

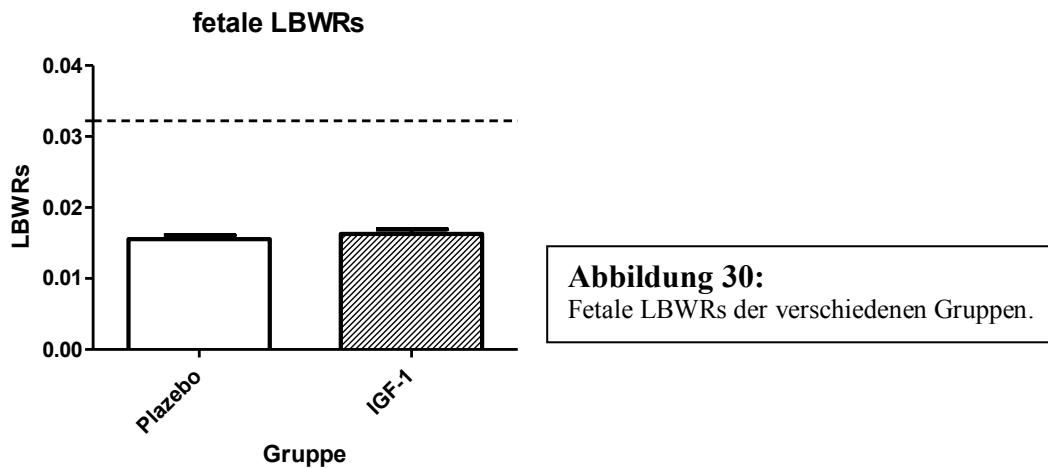


Abbildung 30:
Fetale LBWRs der verschiedenen Gruppen.

Die Analyse der mittleren Gewichte der linken Lungen ergab in der Kontroll-, Plazebo- und IGF-1-Gruppe Werte von $63,40 \pm 9,53$ mg; $21,00 \pm 3,49$ mg und $19,27 \pm 5,56$ mg (siehe **Abbildung 31**). Im Vergleich der Plazebo- und IGF-1-Gruppe ließ sich eine Abweichung zwischen diesen beiden Gruppen von $1,73 \pm 1,69$ mg erkennen (p-Wert: 0,32).

Die mittleren Gewichte der rechten Lungen betragen $120,40 \pm 15,63$ mg; $47,67 \pm 7,20$ mg und $42,67 \pm 9,98$ mg in der Kontroll-, Plazebo- und IGF-1-Gruppe (siehe **Abbildung 32**). Die Unterschiede zwischen den beiden Letzteren betragen im Mittel $5,0 \pm 3,18$ mg (p-Wert: 0,13). Im Vergleich der Behandlungsgruppen zur Kontrollgruppe fiel eine deutliche Gewichtsreduktion der rechten Lungen auf.

Sowohl die Gewichte der rechten, als auch der linken Lungen der Plazebo- und IGF-1-Gruppe waren im Vergleich zur Kontrollgruppe um etwa 2/3 reduziert und die von den entsprechenden CDH am stärksten beeinträchtigten linken Lungen der Behandlungsgruppen wiesen im Mittel etwa nur das halbe Gewicht der rechten Lungen dieser Gruppen auf.

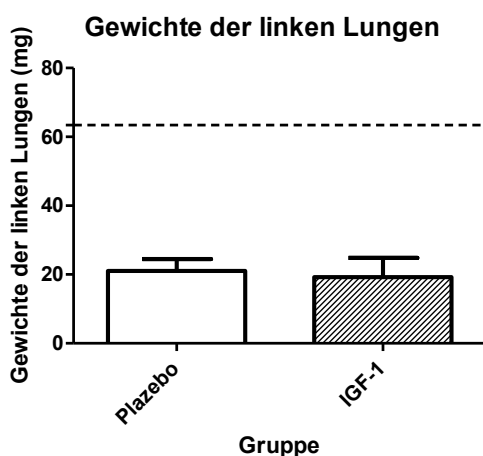


Abbildung 31:
Gewichte der linken fetalen Lungen im Vergleich.

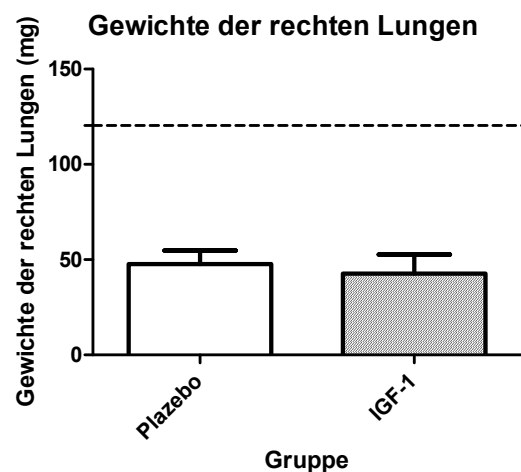
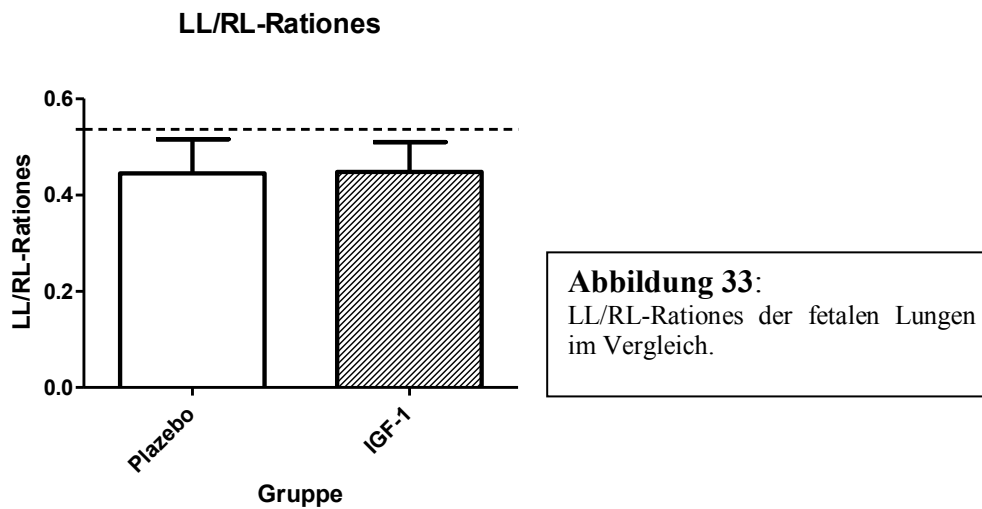


Abbildung 32:
Gewichte der rechten fetalen Lungen im Vergleich.

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Die mittleren Rationes der linken und rechten Lungen (LL/RL) der Kontroll-, Plazebo- und IGF-1-Gruppe waren mit Werten von $0,54 \pm 0,12$; $0,45 \pm 0,07$ und $0,45 \pm 0,06$ zwischen der Plazebo- und IGF-1-Gruppe (mittlere Abweichung $-0,003 \pm 0,024$) kaum unterschiedlich (p-Wert: 0,90), aber im Vergleich zur Kontrollgruppe beide erniedrigt (siehe hierzu **Abbildung 33**). Eine Übersicht über die Daten ist dem **Anhang** dieser Arbeit zu entnehmen.



3.2. Ergebnisse des immunhistochemischen Stainings

Zur immunhistochemischen Analyse wurden in dieser Studie die **linken Lungen** der CDH-positiven Rattenfetten der Placebogruppe (n=15) und IGF-1-Gruppe (n=15) herangezogen. Die linken Lungen der Rattenfetten der Kontrollgruppe (n=5), die kein Nitrofen und auch keine intraamniotischen Injektionen erhielten, dienten dem Vergleich (punktierte Linie in jedem Diagramm).

Es wurde an jedem Gewebeschnitt der entsprechenden fetalen linken Lunge jeweils die Anzahl der positiven Zellen in fünf nicht überlappenden Gesichtsfeldern ermittelt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte jeweils mittels eines **2-tailed unpaired t-Tests** zwischen der Placebo- und der IGF-1-Gruppe. Genauere Informationen zu den erhobenen Daten sind im **Anhang** dieser Arbeit verfügbar.

3.2.1. Ki67-Staining

Ki67 diente in dieser Studie als Marker für die allgemeine proliferative Aktivität in den Lungengeweben (siehe **Kapitel 2.2.3**).

Innerhalb der Kontroll-, Placebo- und IGF-1-Gruppe konnte eine mittlere Anzahl von **312,6 ± 143,1**; **347,9 ± 185,1** und **419,1 ± 216,6** Ki67-positiver Zellen verzeichnet werden (siehe **Abbildung 34**). Hier ergab der unpaired t-Test einen mittleren nicht signifikanten Unterschied zwischen der Placebo- und IGF-1-Gruppe von $-71,3 \pm 73,6$ (p-Wert: 0,34).

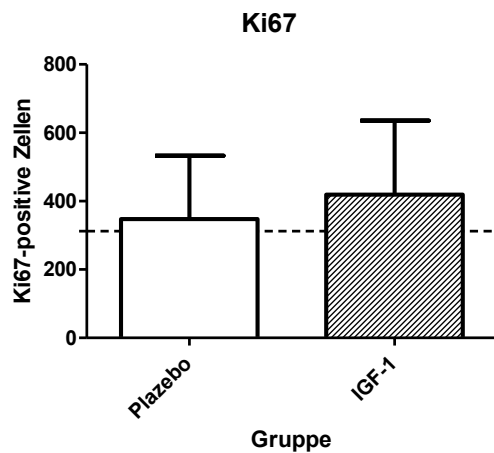
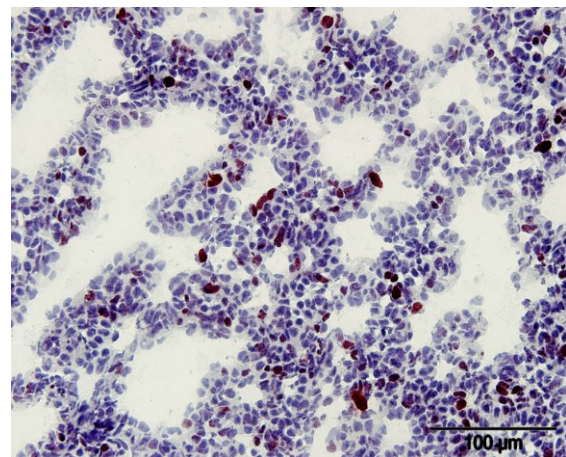
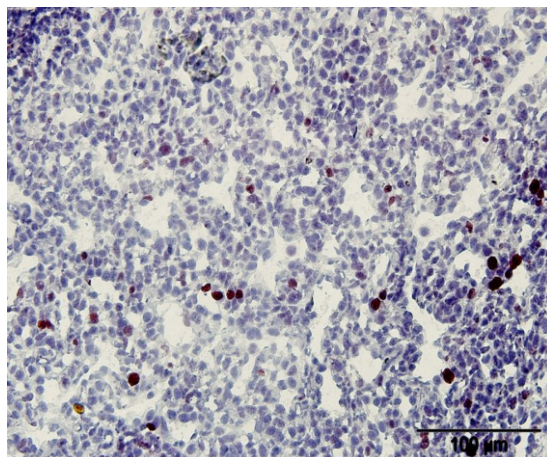


Abbildung 34:

oben links: Ki67-positive Zellen der verschiedenen Gruppen im Vergleich.

unten: mikroskopische Fotos des Ki67-Immunostainings (**links:** Placebo-, **rechts:** IGF-1-Gruppe).

Vergrößerung: 400-fach, Balken: 100 µm.



3.2.2. Ttf1-Staining

Mit der Analyse der Anzahl der Ttf1-positiven Zellen in den linken Lungengeweben sollten die Produktion und das Produktionspotential von bzw. für Surfactant und damit auch die Funktionsfähigkeit und Anzahl der *Alveolarepithelzellen vom Typ II* eingeschätzt werden.

Die Zahl der Ttf1-positiven Zellen belief sich innerhalb der Kontroll-, Plazebo- und IGF-1-Gruppe auf $1869,0 \pm 353,7$; $2830,0 \pm 562,7$ und $3103,0 \pm 644,6$ (siehe **Abbildung 35**).

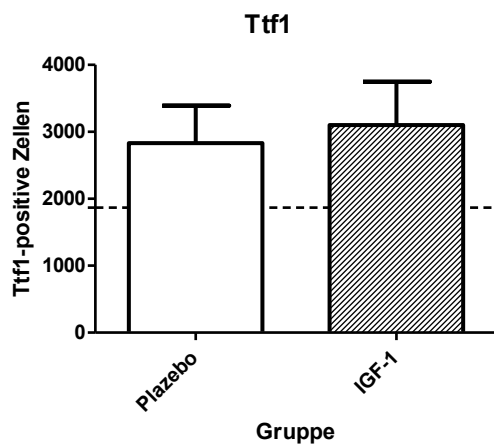
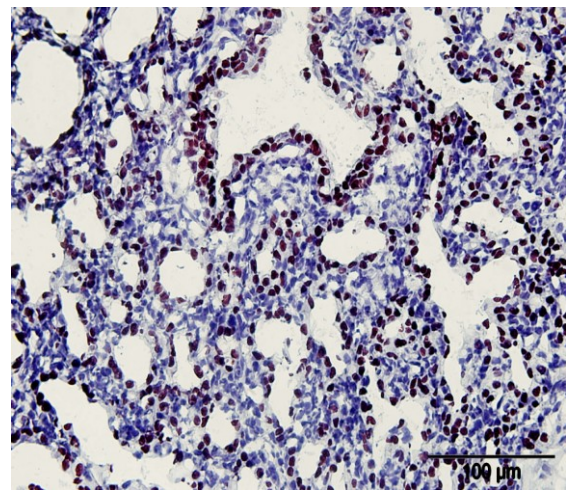
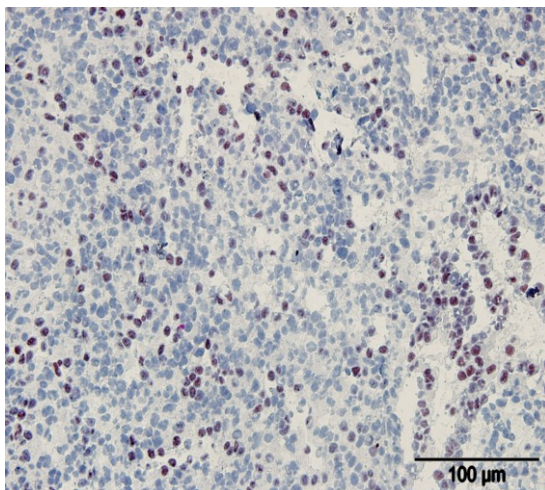


Abbildung 35:

oben links: Ttf1-positive Zellen der verschiedenen Gruppen.

unten: mikroskopische Fotos des Ttf1-Immunostainings (**links:** Plazebo-, **rechts:** IGF-1-Gruppe).
Vergrößerung: 400-fach, Balken: 100 μm .



Der unpaired t-Test ergab hier einen nicht signifikanten Unterschied bezüglich der Ttf1-positiven Zellenzahl zwischen der Plazebo- und der IGF-1-Gruppe von im Mittel $-272,3 \pm 220,9$ (p-Wert: 0,23).

3.2.3. Sma-Staining

Alpha-Actin-2, auch bekannt als **alpha smooth muscle actin** (α -SMA), ist ein Protein, das beim Menschen vom *ACTA2*-Gen codiert wird. In dieser Studie wurde es zur

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Darstellung und Beurteilung der glatten Muskulatur in den Bronchien und Gefäßen der Lunge herangezogen (siehe Kapitel **Material und Methoden**).

Bei der Auszählung der Gewebeschnitte war in der Kontroll-, Plazebo- und IGF-1-Gruppe im Mittel eine Anzahl von $429,0 \pm 96,7$; $546,9 \pm 223,3$ und $538,3 \pm 279,0$ Sma-positiver Zellen zu verzeichnen (siehe **Abbildung 36**).

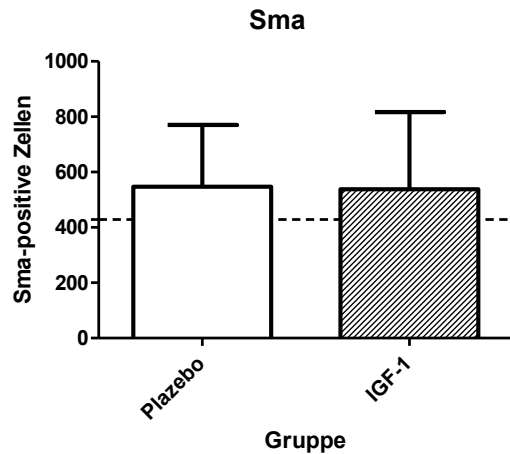
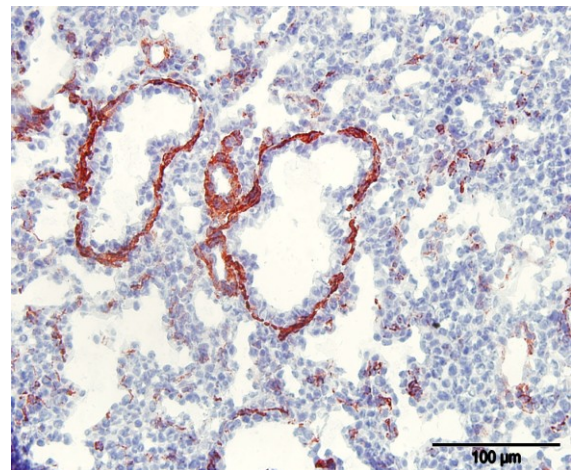
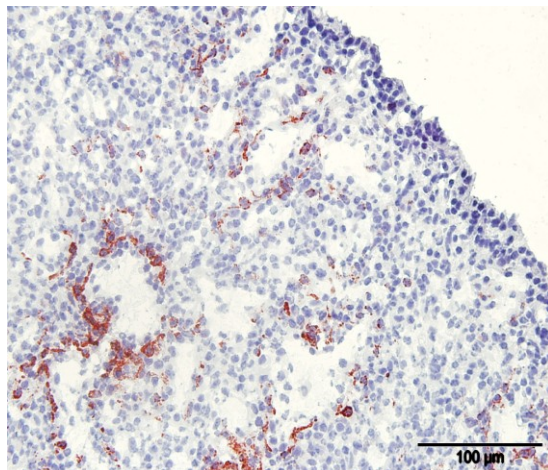


Abbildung 36:

oben links: Sma-positive Zellen der verschiedenen Gruppen.

unten: mikroskopische Fotos des Sma-Immunostainings (**links:** Plazebo-, **rechts:** IGF-1-Gruppe).

Vergrößerung: 400-fach, Balken: 100 μ m.



Das Ergebnis des unpaired t-Tests deutete auf eine geringe Abnahme der Sma-positiven Zellenzahl in der IGF-1-Gruppe von $8,5 \pm 92,3$ im Vergleich zur Plazebogruppe hin, die nicht signifikant war (p-Wert: 0,93).

3.2.4. T1 α /Podoplanin-Staining

Podoplanin (T1 α) diente als Marker für die *Alveolarepithelzellen vom Typ I*.

Die Auszählung der Podoplanin-positiven Zellen in den Gewebeschnitten ergab in der Kontroll-, Placebo- und IGF-1-Gruppe mittlere Werte von **53,2 \pm 49,3**; **277,6 \pm 164,3** und **311,5 \pm 151,6** (siehe **Abbildung 37**). Bei der Durchführung des unpaired t-Tests zeigte sich ein mittlerer nicht signifikanter Unterschied der Anzahl der Podoplanin-positiven Zellen zwischen der Placebo- und IGF-1-Gruppe von $-33,9 \pm 57,7$ (p-Wert: 0,56).

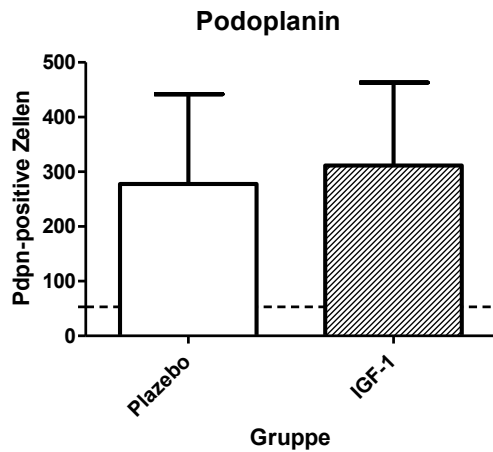
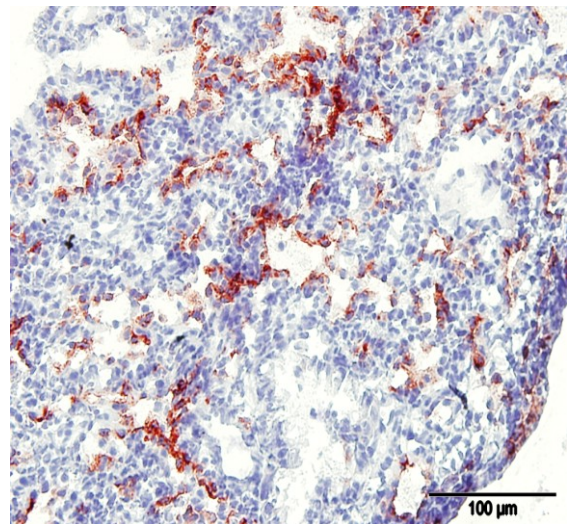
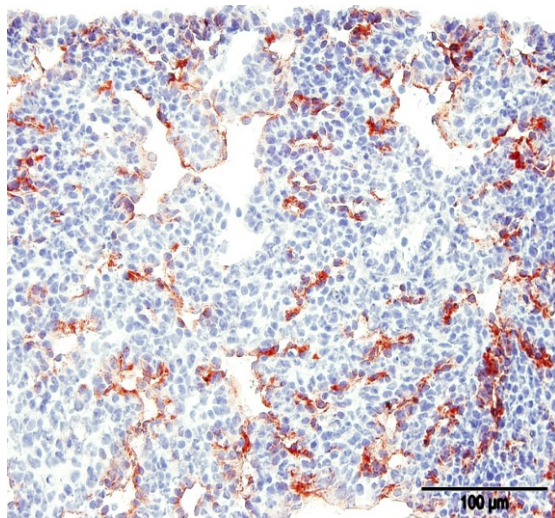


Abbildung 37:

oben links: Podoplanin/T1 α -positive Zellen der verschiedenen Gruppen im Vergleich.

unten: mikroskopische Fotos des T1 α -Immunostainings (**links:** Placebo-, **rechts:** IGF-1-Gruppe).

Vergrößerung: 400-fach, Balken: 100 μ m.



3.2.5. Fgf10-Staining

Das Staining des Fgf10 wurde zur Untersuchung der Knospung (Budding) und der Bindegewebsbildung in der fetalen Lunge herangezogen.

Die Auswertung der Gewebeschnitte der fetalen Lungen ergab innerhalb der Kontroll-, Plazebo- und IGF-1-Gruppe mittlere Werte von $647,2 \pm 128,7$; $694,5 \pm 233,5$ und $673,9 \pm 294,4$ Fgf10-positiver Zellen (siehe **Abbildung 38**).

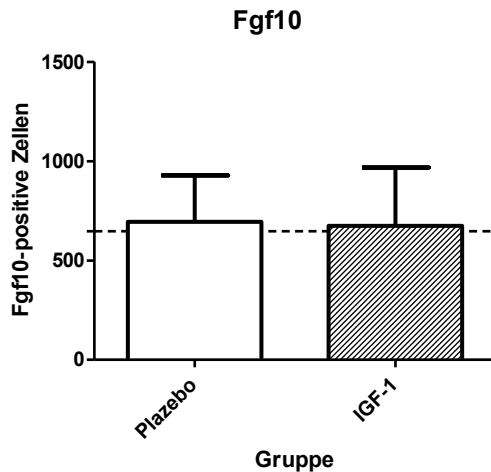
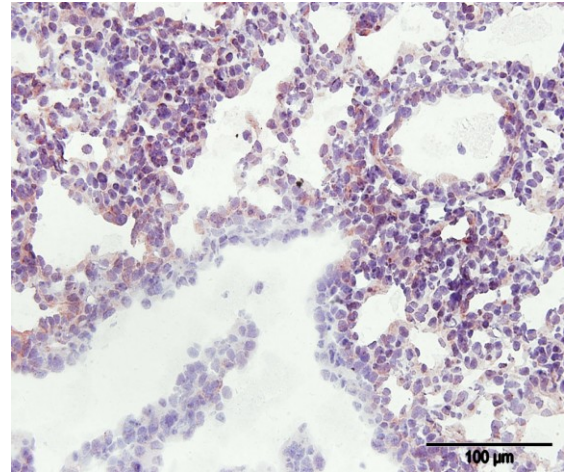
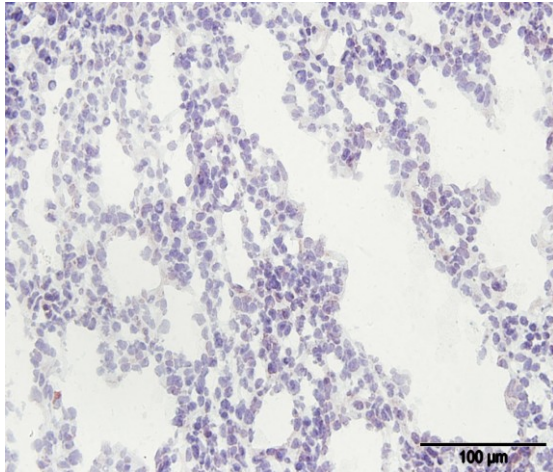


Abbildung 38:

oben links: Fgf10-positive Zellen der verschiedenen Gruppen.

unten: mikroskopische Fotos des Fgf10-Immunostainings (**links:** Plazebo-, **rechts:** IGF-1-Gruppe).

Vergrößerung: 400-fach, Balken: 100 μ m.



Der unpaired t-Test deutete eine Reduktion der Zahl der positiven Zellen der IGF-1-Gruppe um $20,6 \pm 97,0$ gegenüber der Plazebogruppe an. Der p-Wert betrug 0,83 und war somit nicht signifikant.

3.2.6. IGF-1-Staining

Das Staining unter Verwendung des Anti-humanen-IGF-1-Antikörpers sollte in dieser Studie zum Nachweis der Aufnahme des applizierten humanen rekombinanten IGF-1 (rhIGF-1) verwendet werden. Allerdings reagierte der verwendete Antikörper offenbar auch mit dem IGF-1 der Ratte, sodass auf diese Weise nicht zwischen humanem (appliziertem) und ratteneigenem (endogen produziertem) IGF-1/Igf-1 unterschieden werden konnte.

Die Auszählung der IGF-1-positiven Zellen ergab in der Kontroll-, Plazebo- und IGF-1-Gruppe eine Anzahl von $6,2 \pm 6,9$; $338,6 \pm 201,1$ und $167,3 \pm 59,3$ (siehe **Abbildung 39**). Der Vergleich zur Plazebogruppe ließ eine mittlere Reduktion der Zahl der IGF-1-positiven Zellen innerhalb der IGF-1-Gruppe von $171,3 \pm 54,1$ erkennen, die mit einem p-Wert von 0,0037 eine hohe Signifikanz erreichte (entsprechend einer Reduktion von im Mittel 50,6%). Die Kontrollgruppe wies im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen eine geringere Anzahl auf. Somit fiel im Vergleich zur Kontrollgruppe ein mehr als 27-facher Anstieg der IGF-1-positiven Zellen in der IGF-1-Gruppe und ein mehr als 56-facher Anstieg in der Plazebogruppe auf.

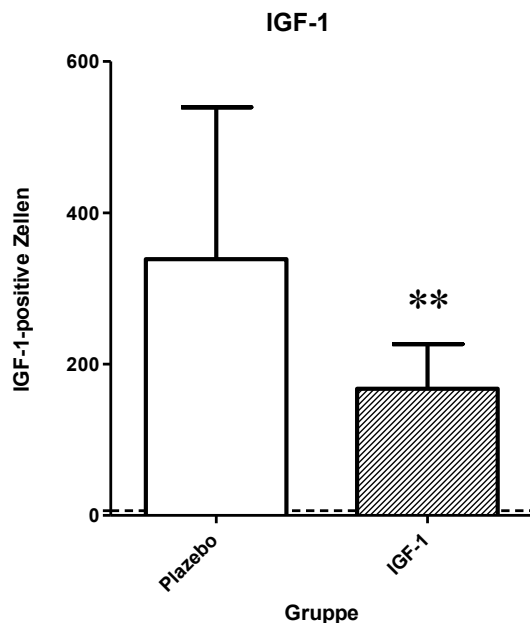
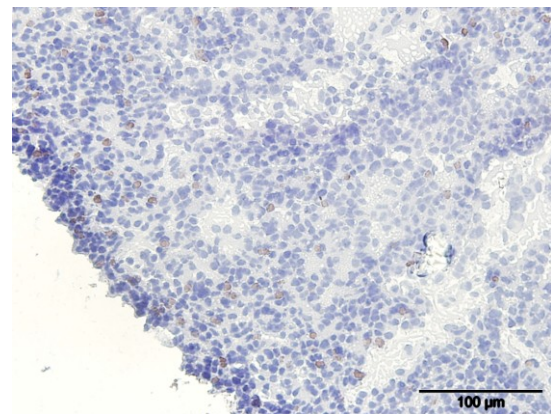
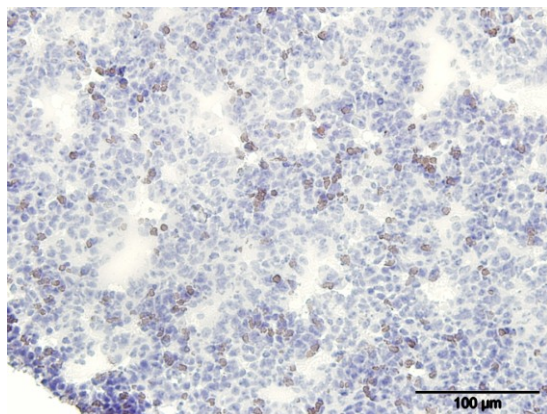


Abbildung 39:
oben links: IGF-1-positiv Zellen der verschiedenen Gruppen. **: p-Wert <0,01.
unten: mikroskopische Fotos des IGF-1-Immunostainings (**links:** Plazebo-, **rechts:** IGF-1-Gruppe).
Vergrößerung: 400-fach, Balken: 100 µm.



3.2.7. Bmp4-Staining

Wie in **Kapitel 2.2.3** bereits beschrieben, sollte die Untersuchung der Bmp4-positiven Zellen Aufschluss über die Wirkung des applizierten rhIGF-1 auf die Proliferation des Epithels und die Verzweigungsvorgänge der Lungen geben.

Es zeigte sich bei der Auszählung der Gewebeschnitte in der Kontroll-, Plazebo- und IGF-1-Gruppe eine Anzahl von $787,2 \pm 154,1$; $1296,0 \pm 408,9$ und $1393,0 \pm 339,3$ Bmp4-positiver Zellen (siehe **Abbildung 40**). Hier war eine nicht signifikante Differenz der mittleren Anzahl der Zellen in der IGF-1-Gruppe von $-96,7 \pm 137,2$ gegenüber der Plazebogruppe (p-Wert: 0,49) zu verzeichnen.

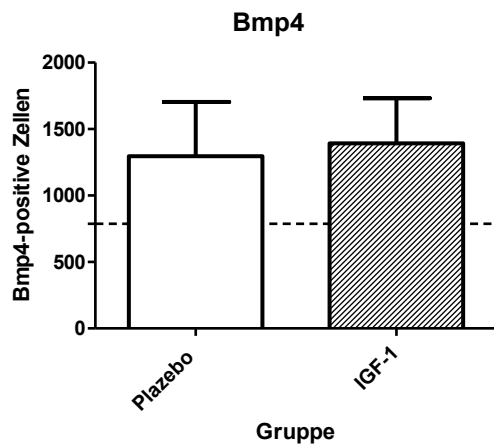
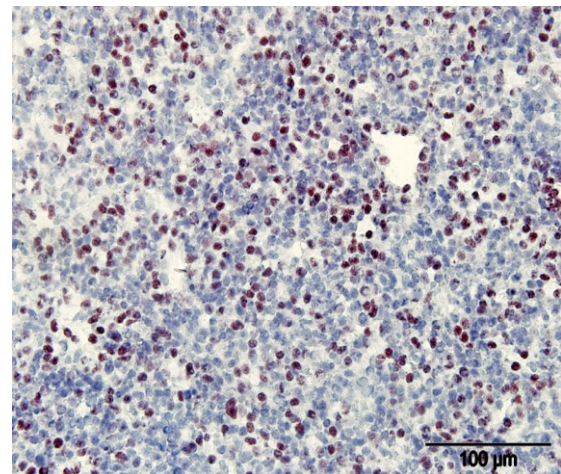
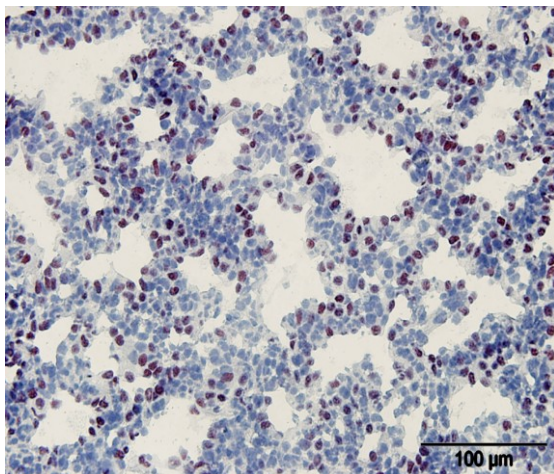


Abbildung 40:

oben links: Bmp4-positive Zellen der verschiedenen Gruppen im Vergleich.

unten: mikroskopische Fotos des Bmp4-Immunostainings (**links:** Plazebo-, **rechts:** IGF-1-Gruppe).

Vergrößerung: 400-fach, Balken: 100 μ m.



3.3. Ergebnisse der RT-PCR

Für die Analyse der mRNA-Expression der fetalen Lungengewebe wurden die **rechten Lungen** der Rattenfetten der Placebogruppe (n=15) und IGF-1-Gruppe (n=15) mit einer CDH (CDH+) herangezogen. Die rechten Lungen der Rattenfetten der unbehandelten Kontrollgruppe (n=5) dienten auch hier dem Vergleich (punktierte Linie in jedem Diagramm).

Die Auswertung der Daten erfolgte hier, in gleicher Weise wie bereits im immunhistochemischen Staining, jeweils mittels eines 2-tailed **unpaired t-Tests** zwischen der Placebo- und der IGF-1-Gruppe.

3.3.1. *Ki67*-mRNA-Expression

Die mittlere *Ki67*-mRNA-Expression betrug in der Kontrollgruppe **0,419** \pm 1,271, in der Placebogruppe **0,419** \pm 0,898 und in der IGF-1-Gruppe **0,280** \pm 0,517 (siehe **Abbildung 41**). Der 2-tailed unpaired t-Test verwies hier auf einen Unterschied der mittleren mRNA-Expression zwischen der Placebo- und IGF-1-Gruppe von $0,138 \pm 0,267$ und der p-Wert war mit einer Höhe von 0,61 statistisch nicht signifikant.

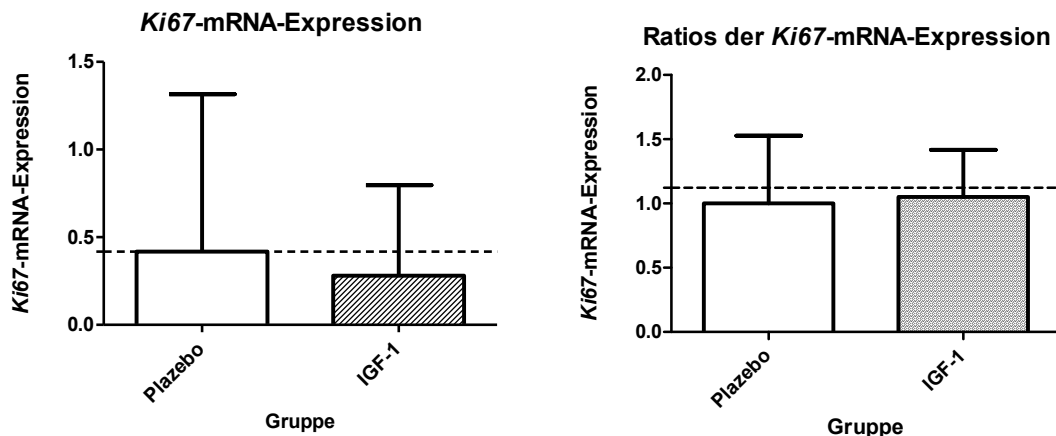


Abbildung 41:

links: Delta-Ct-Werte der *Ki67*-mRNA-Expression der verschiedenen Gruppen.

rechts: Ratios der *Ki67*-mRNA-Expression in Relation zur Placebogruppe.

Die strichlierte Linie in jedem Diagramm repräsentiert den Wert der unbehandelten Kontrollgruppe.

3.3.2. *Ttf1(Nkx2.1)*-mRNA-Expression

Bezüglich der mittleren mRNA-Expression des *Ttf1* wurden in der Kontroll-, Plazebo- und IGF-1-Gruppe Werte von $-1,479 \pm 0,386$; $-2,411 \pm 0,251$ und $-2,464 \pm 0,592$ erreicht (siehe **Abbildung 42**). Der nicht signifikante p-Wert von 0,75 errechnete sich aus dem mittleren Unterschied der Plazebo- und IGF-1-Gruppe von $0,054 \pm 0,166$.

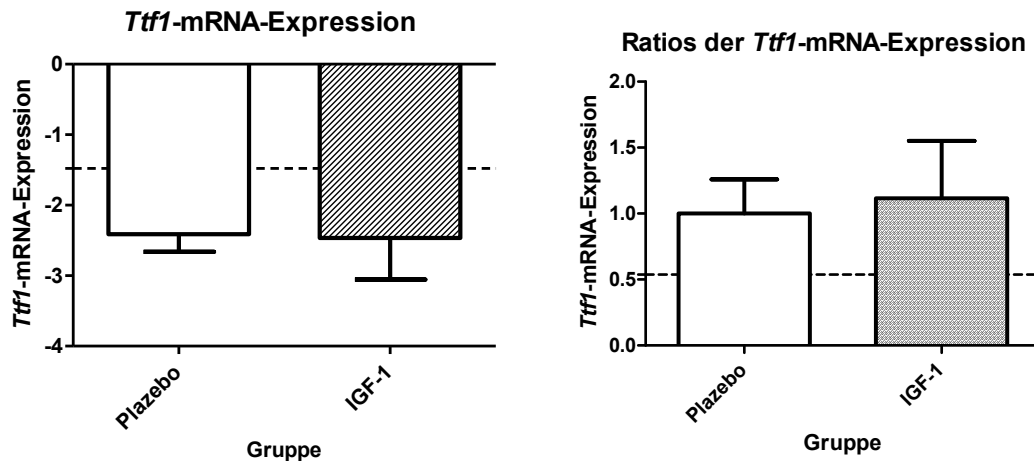


Abbildung 42:

links: Delta-Ct-Werte der *Ttf1*-mRNA-Expression der verschiedenen Gruppen.

rechts: Ratios der *Ttf1*-mRNA-Expression in Relation zur Plazebogruppe.

Die strichlierte Linie in jedem Diagramm repräsentiert den Wert der unbehandelten Kontrollgruppe.

3.3.3. *T1a/Podoplanin*-mRNA-Expression

Die mittlere mRNA-Expression von *Podoplanin* erreichte in der Kontroll-, Plazebo- und IGF-1-Gruppe Werte von $-4,475 \pm 0,472$; $-4,567 \pm 0,445$ und $-4,783 \pm 0,393$ (siehe **Abbildung 43**). Der unpaired t-Test ergab hier einen nicht signifikanten Unterschied der mittleren mRNA-Expression zwischen der Plazebo- und der IGF-1-Gruppe von $0,216 \pm 0,153$ (p-Wert: 0,17).

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlung“

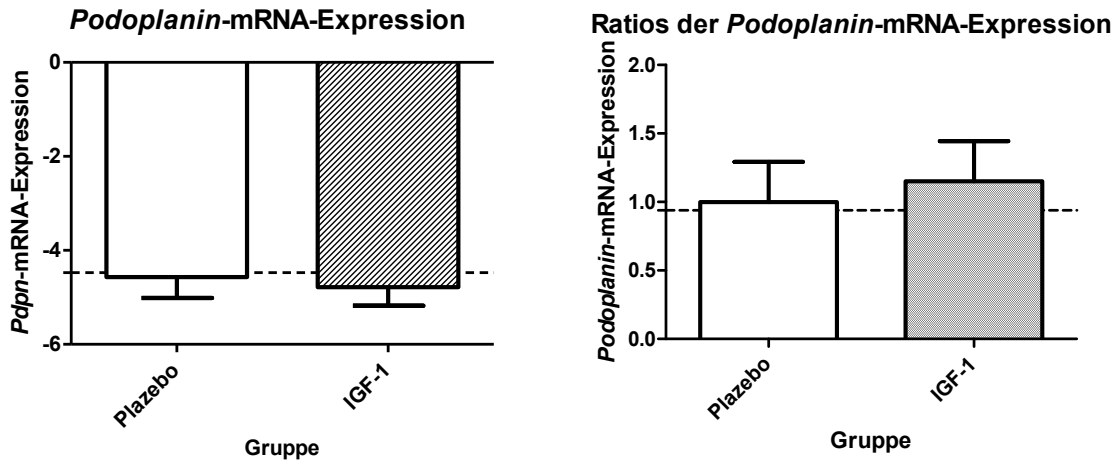


Abbildung 43:

links: Delta-Ct-Werte der *Podoplanin*-mRNA-Expression der verschiedenen Gruppen.

rechts: Ratios der *Podoplanin*-mRNA-Expression in Relation zur Plazebogruppe.

Die strichlierte Linie in jedem Diagramm repräsentiert den Wert der unbehandelten Kontrollgruppe.

3.3.4. *Fgf10*-mRNA-Expression

Die mRNA-Expression des *Fgf10* betrug im Mittel in der Kontrollgruppe $-0,298 \pm 0,459$, in der Plazebogruppe $-0,075 \pm 0,632$ und in der IGF-1-Gruppe $0,202 \pm 0,625$ (siehe **Abbildung 44**). Der nicht signifikante p-Wert von 0,24 errechnete sich aus der mittleren Differenz der Plazebo- und IGF-1-Gruppe von $-0,277 \pm 0,230$.

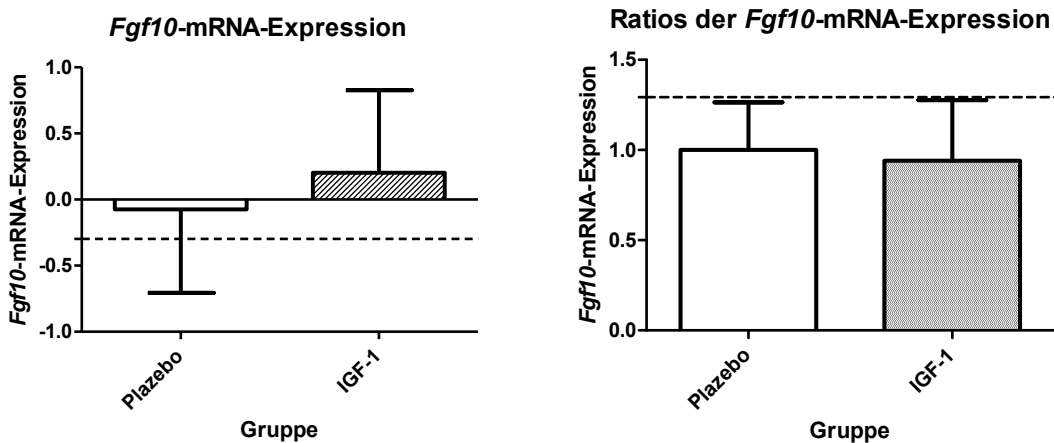


Abbildung 44:

links: Delta-Ct-Werte der *Fgf10*-mRNA-Expression der verschiedenen Gruppen.

rechts: Ratios der *Fgf10*-mRNA-Expression in Relation zur Plazebogruppe.

Die strichlierte Linie in jedem Diagramm repräsentiert den Wert der unbehandelten Kontrollgruppe.

3.3.5. *Bmp4*-mRNA-Expression

Bezüglich der mittleren mRNA-Expression des *Bmp4* ergaben sich in der Kontroll-, Plazebo- und IGF-1-Gruppe Werte von $0,137 \pm 6,803$; $-3,249 \pm 0,453$ und $-2,942 \pm 0,416$ (siehe **Abbildung 45**). Der mit Hilfe des t-Tests aus der mittleren Differenz der Plazebo- und IGF-1-Gruppe von $-0,307 \pm 0,159$ errechnete p-Wert, erreichte mit einer Höhe von 0,06 keine statistische Signifikanz.

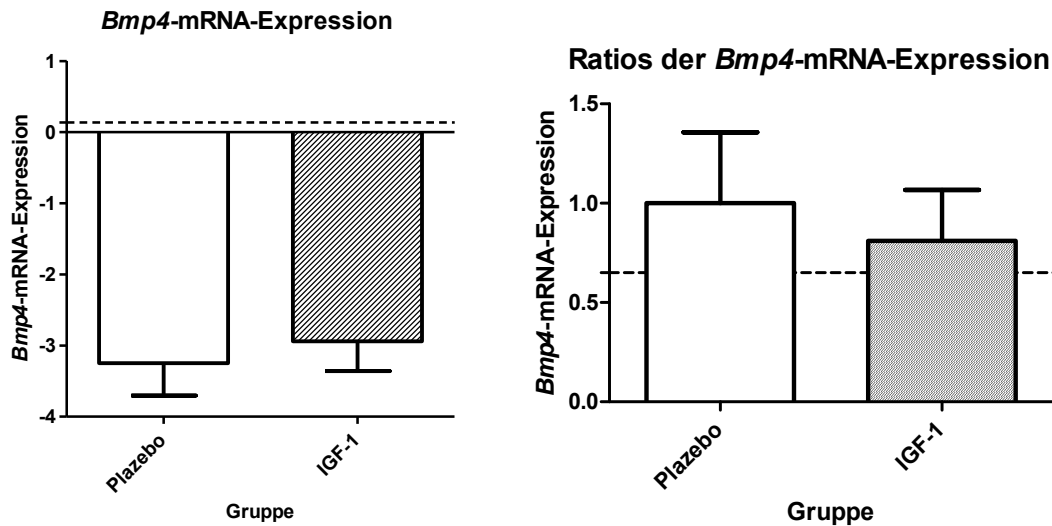


Abbildung 45:

links: Delta-Ct-Werte der *Bmp4*-mRNA-Expression der verschiedenen Gruppen.

rechts: Ratios der *Bmp4*-mRNA-Expression in Relation zur Plazebogruppe.

Die strichlierte Linie in jedem Diagramm repräsentiert den Wert der unbehandelten Kontrollgruppe.

3.3.6. *Igf-1r*-mRNA-Expression

Die mittlere mRNA-Expression des *Igf-1r* belief sich in der Kontroll-, Plazebo- und IGF-1-Gruppe auf Werte von $-1,143 \pm 0,140$; $-1,930 \pm 0,451$ und $-1,997 \pm 0,336$ (siehe **Abbildung 46**). Der t-Test ergab hier einen nicht signifikanten Unterschied der mittleren mRNA-Expression zwischen der Plazebo- und der IGF-1-Gruppe von $0,067 \pm 0,145$ (p-Wert: 0,65).

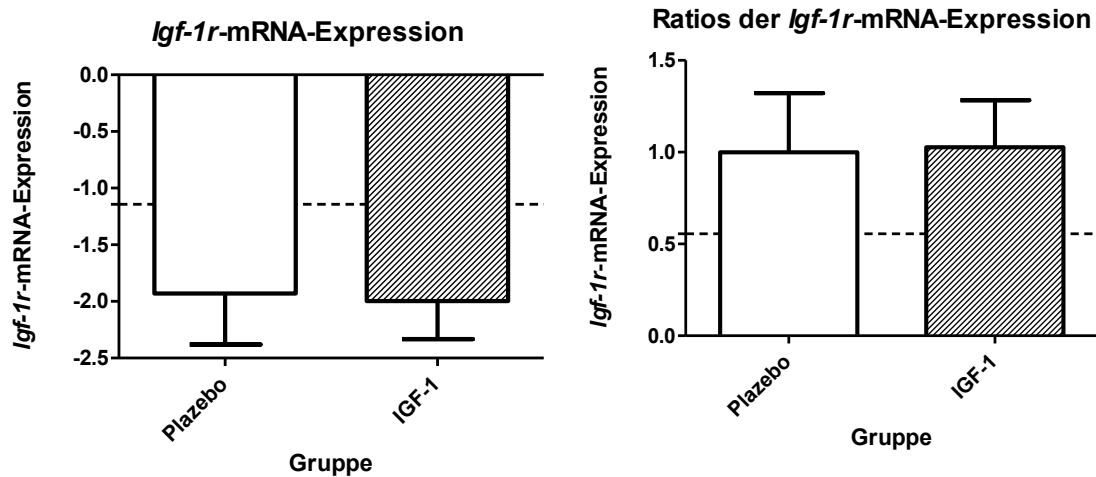


Abbildung 46:

links: Delta-Ct-Werte der *Igf-1r*-mRNA-Expression der verschiedenen Gruppen.

rechts: Ratios der *Igf-1r*-mRNA-Expression in Relation zur Plazebogruppe.

Die strichlierte Linie in jedem Diagramm repräsentiert den Wert der unbehandelten Kontrollgruppe.

3.3.7. *Igf-2r*-mRNA-Expression

Die Untersuchung der Expression der *Igf-2r*-mRNA ergab in der Kontrollgruppe einen Wert von $-2,739 \pm 0,319$, in der Plazebogruppe einen Wert von $-2,522 \pm 0,437$ und in der IGF-1-Gruppe einen Wert von $-2,867 \pm 0,245$ (siehe **Abbildung 47**). Der unpaired t-Test deutete hier eine **hoch-signifikante Steigerung** der mittleren mRNA-Expression der IGF-1-Gruppe von $0,345 \pm 0,118$ im Vergleich zur Plazebogruppe (p-Wert: 0,0064) an.

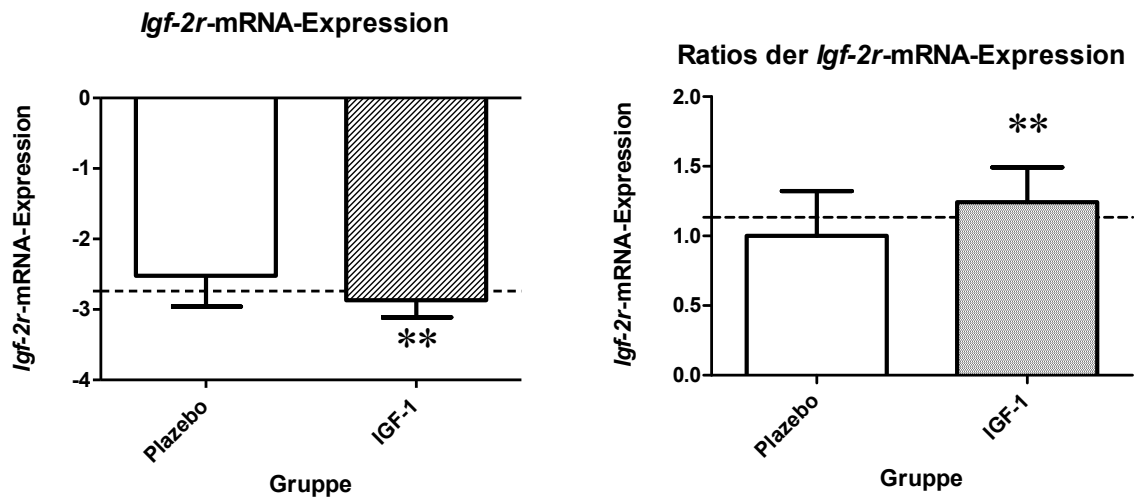


Abbildung 47:

links: Delta-Ct-Werte der *Igf-2r*-mRNA-Expression der verschiedenen Gruppen.

rechts: Ratios der *Igf-2r*-mRNA-Expression in Relation zur Plazebogruppe. **: p-Wert < 0,01.

Die strichlierte Linie in jedem Diagramm repräsentiert den Wert der unbehandelten Kontrollgruppe.

3.3.8. *Vegf-a*-mRNA-Expression

Die Beurteilung der *Vegf-a*-mRNA-Expression wurde hier herangezogen, um die Vasculo- und Angiogenese in den fetalen Lungen besser einschätzen zu können.

Die mittlere *Vegf-a*-mRNA-Expression betrug in der Kontrollgruppe $-2,603 \pm 0,158$, in der Plazebogruppe $-2,874 \pm 0,353$ und in der IGF-1-Gruppe $-2,963 \pm 0,467$ (siehe **Abbildung 48**). Mittels des t-Tests errechnete sich hier ein p-Wert von 0,56 und dieser deutete somit einen nicht signifikanten Unterschied der mittleren mRNA-Expression zwischen der Plazebo- und der IGF-1-Gruppe von $0,088 \pm 0,151$ an.

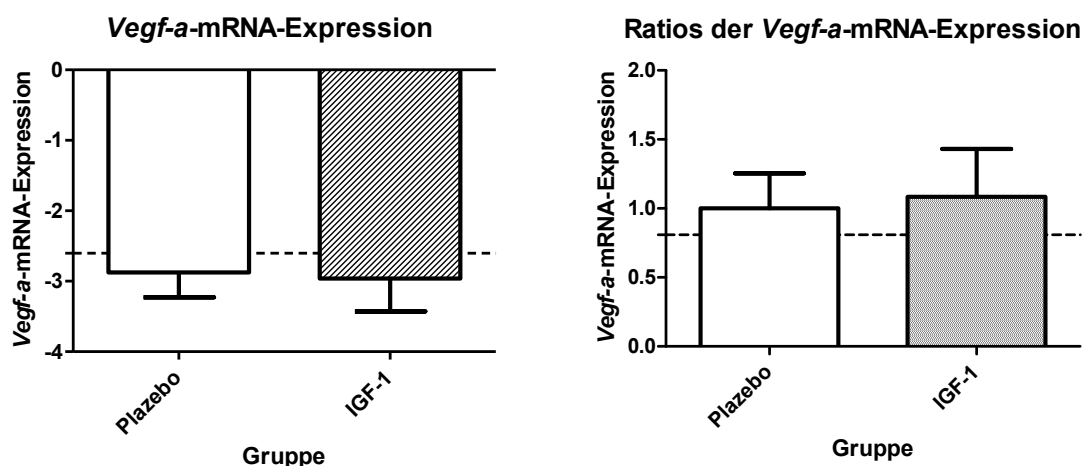


Abbildung 48:

links: Delta-Ct-Werte der *Vegf-a*-mRNA-Expression der verschiedenen Gruppen.

rechts: Ratios der *Vegf-a*-mRNA-Expression in Relation zur Plazebogruppe.

Die strichlierte Linie in jedem Diagramm repräsentiert den Wert der unbehandelten Kontrollgruppe.

3.3.9. *Plat*-mRNA-Expression

In dieser Studie sollte die *Plat*-mRNA-Expression der Beurteilung des Gewebeumbaus und der Zellmigration, sowie der Bildung der Gefäße in den distalen Luftwegen der fetalen Lungen dienen.

Bezüglich der mittleren mRNA-Expression des *Plat* wurden in der Kontroll-, Plazebo- und IGF-1-Gruppe Werte von $-2,284 \pm 0,611$; $-1,766 \pm 0,765$ und $-1,475 \pm 0,536$ (siehe **Abbildung 49**) verzeichnet. Der p-Wert war mit einer Höhe von 0,24 nicht signifikant und der entsprechende t-Test zeigte eine mittlere Differenz der mRNA-Expression von $-0,291 \pm 0,241$ zwischen der Plazebo- und IGF-1-Gruppe.

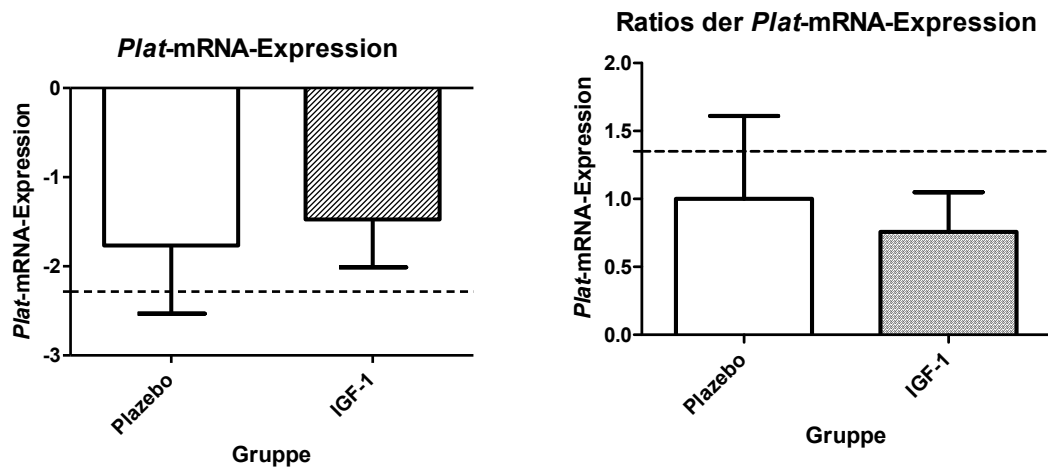


Abbildung 49:

links: Delta-Ct-Werte der *Plat*-mRNA-Expression der verschiedenen Gruppen.

rechts: Ratios der *Plat*-mRNA-Expression in Relation zur Plazebogruppe.

Die strichlierte Linie in jedem Diagramm repräsentiert den Wert der unbehandelten Kontrollgruppe.

3.3.10. *Pecam-1*-mRNA-Expression

Mit Hilfe der PCR-Analyse der *Pecam-1*-mRNA-Expression sollte in dieser Studie das Vorkommen von Endothelzellen in den fetalen Rattenlungen untersucht und beurteilt werden.

Die mittlere mRNA-Expression des *Pecam-1* erreichte in der Kontroll-, Plazebo- und IGF-1-Gruppe Werte von $-2,707 \pm 0,239$; $-2,975 \pm 0,379$ und $-3,039 \pm 0,877$ (siehe **Abbildung 50**). Der unpaired t-Test deutete hier eine nicht signifikante Steigerung der mittleren mRNA-Expression der IGF-1-Gruppe von $0,064 \pm 0,247$ im Vergleich zur Plazebogruppe (p-Wert: 0,80) an.

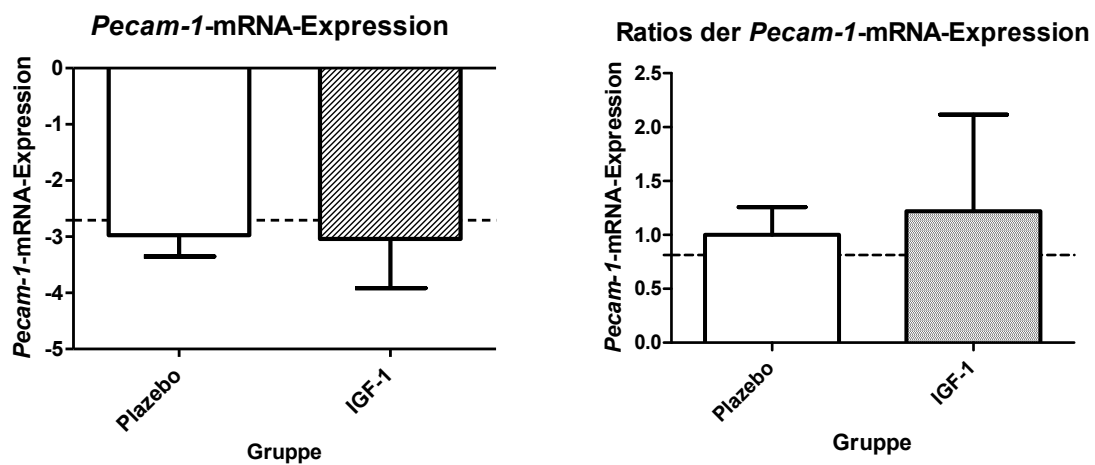


Abbildung 50:

links: Delta-Ct-Werte der *Pecam-1*-mRNA-Expression der verschiedenen Gruppen.

rechts: Ratios der *Pecam-1*-mRNA-Expression in Relation zur Plazebogruppe.

Die strichlierte Linie in jedem Diagramm repräsentiert den Wert der unbehandelten Kontrollgruppe.

3.3.11. *Kdr/Flk-1*-mRNA-Expression

Die PCR-Analyse der *Kdr/Flk-1*-mRNA-Expression (das Gen codiert Vegfr-2) diente hier zur Beurteilung der Gefäßbildung in den fetalen Lungen.

Bezüglich der mittleren mRNA-Expression von *Kdr* ergaben sich in der Kontroll-, Plazebo- und IGF-1-Gruppe Werte von $-3,773 \pm 0,179$; $-3,881 \pm 0,333$ und $-3,780 \pm 0,447$ (siehe **Abbildung 51**). Mittels Anwendung des t-Tests ließ sich hier eine nicht signifikante Differenz der mittleren mRNA-Expression von $-0,101 \pm 0,144$ zwischen der Plazebo- und IGF-1-Gruppe errechnen (p-Wert: 0,49).

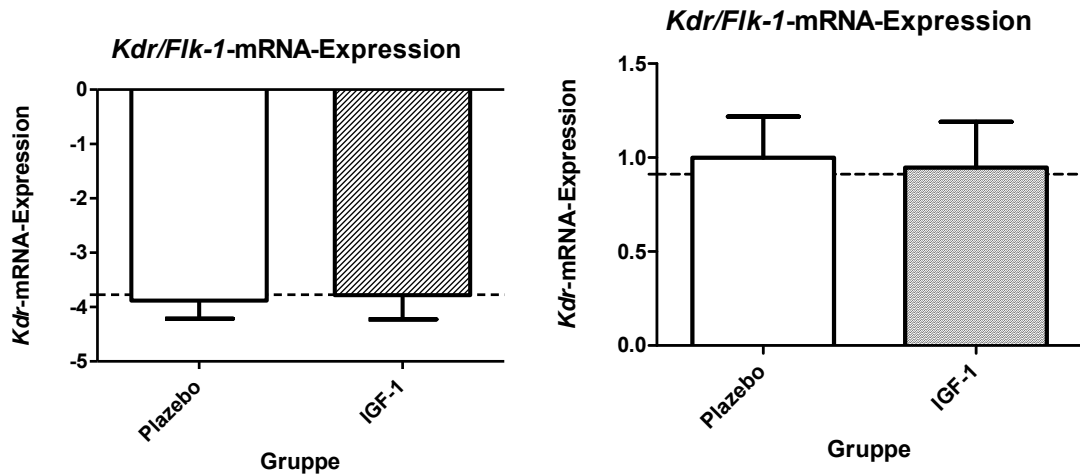


Abbildung 51:

links: Delta-Ct-Werte der *Kdr*-mRNA-Expression der verschiedenen Gruppen.

rechts: Ratios der *Kdr*-mRNA-Expression in Relation zur Plazebogruppe.

Die strichlierte Linie in jedem Diagramm repräsentiert den Wert der unbehandelten Kontrollgruppe.

3.3.12. *Flt-1*-mRNA-Expression

Die *Flt-1*-mRNA-Expression (das Gen codiert Vegfr-1) sollte zur Beurteilung der Zellproliferation in den fetalen Lungengeweben zum Einsatz kommen.

Die Analyse der mRNA-Expression des *Flt-1* führte in der Kontroll-, Plazebo- und IGF-1-Gruppe zu Werten von $-0,679 \pm 0,244$; $-0,863 \pm 0,389$ und $-0,827 \pm 0,297$ (siehe **Abbildung 52**). Über den 2-tailed unpaired t-Test konnte eine nicht signifikante Differenz der mittleren mRNA-Expression der IGF-1-Gruppe von $-0,036 \pm 0,126$ im Vergleich zur Plazebogruppe festgestellt werden (p-Wert: 0,78).

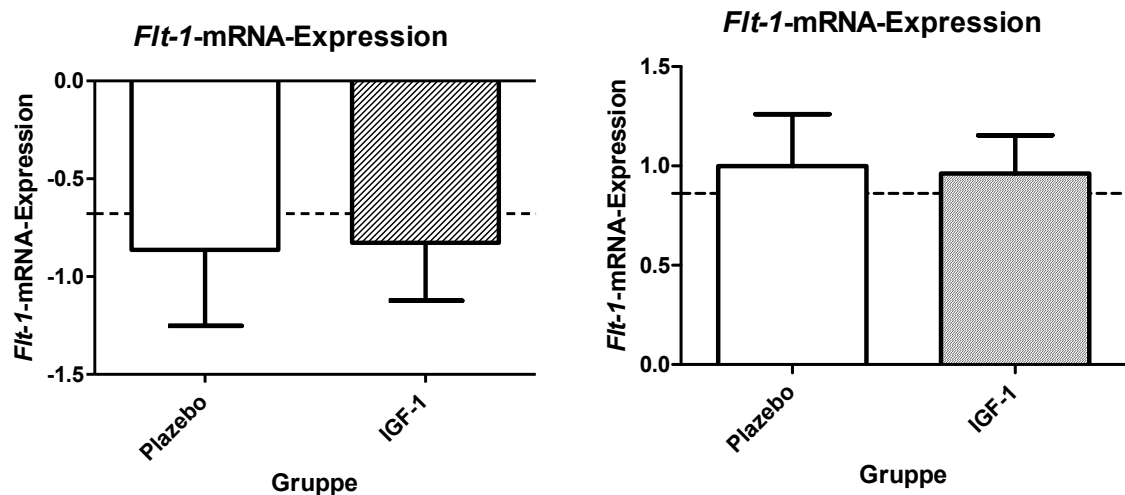


Abbildung 52:

links: Delta-Ct-Werte der *Flt-1*-mRNA-Expression der verschiedenen Gruppen.

rechts: Ratios der *Flt-1*-mRNA-Expression in Relation zur Plazebogruppe.

Die strichlierte Linie in jedem Diagramm repräsentiert den Wert der unbehandelten Kontrollgruppe.

4. Diskussion

In der vorliegenden experimentellen Studie wurde die Wirkung von intraamniotisch verabreichtem rhIGF-1 auf Rattenfeten mit Nitrofen-induzierter Zwerchfellhernie und dabei vor allem der Effekt auf deren Lungenentwicklung untersucht. Erwartungsgemäß zeigte sich dabei eine Reduktion der fetalen Körpergewichte der Behandlungsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe, was eine bekannte Nitrofenwirkung darstellt. Bemerkenswert war dabei aber die Tatsache, dass die fetalen Körpergewichte der IGF-1- im Vergleich zur Placebogruppe ebenfalls signifikant reduziert waren ($p < 0,05$). Auch die ratteneigene IGF-1-Proteinexpression in den Lungen war signifikant reduziert ($p < 0,01$). Sowohl die Lungengewichte, als auch die LBWRs und LL/RL-Rationes wiesen zwischen der IGF-1- und der Placebogruppe keine größeren Abweichungen voneinander auf, so dass die Reduktion der Körpergewichte offenbar nicht durch die Veränderung der Lungengewichte hervorgerufen wurde.

Grundsätzlich wäre es denkbar, dass das intraamniotisch applizierte rhIGF-1, das von den fetalen Ratten vermutlich über die Lungen und den Gastrointestinaltrakt aufgenommen wurde, die ratteneigene IGF-1-Proteinexpression in den Lungen signifikant supprimiert und auf diesem Wege zu einem Abfall der systemischen IGF-1-Proteinexpression der Rattenfeten geführt haben könnte. Dies könnte somit teilweise ähnliche, allerdings natürlich nicht so stark ausgeprägte Effekte, wie eine Gendeletion des *Igf-1* zur Folge gehabt haben und somit die signifikante Verringerung der fetalen Körpergewichte der IGF-1-Gruppe, zumindest teilweise, mit verursacht haben. Die Folgen einer *Igf-1*-Gendeletion sollen hier als Extrembeispiel angeführt werden, um damit deutlich zu machen, dass es bezüglich der Reduktion der fetalen Körpergewichte Parallelen zwischen ihnen und den Folgen einer Reduktion der IGF-1-Proteinexpression geben könnte [645-650].

IGF-1 übt seine biologische Wirkung über die Interaktion mit spezifischen Bindungsproteinen und Oberflächenrezeptoren aus. Es weist eine große Spanne von mitogenen Effekten auf und stimuliert u. a. die Proliferation von Chondrozyten, Fibroblasten, Epithelzellen und glatten Muskelzellen. Zusätzlich übt IGF-1 einen wichtigen Einfluss auf den fetalen Metabolismus aus, indem es die fetale und/oder plazentare Aminosäure- und Glukoseaufnahme verstärkt und die Oxidation der Aminosäuren, sowie die Laktatproduktion in der Plazenta vermindert.

Florini *et al.* schrieben IGF-1 eine entscheidende Rolle in der Myogenese und in der Bewahrung des Wachstums und der Integrität von Muskelfasern zu. Baker *et al.* berichteten über eine signifikante Wachstumsrestriktion *in utero* bei *Igf1*-Knockout-Mäusen. Die Körpergewichte dieser für das *Igf-1*-Gen homozygot-mutierten Mäuse betragen zum Zeitpunkt der Geburt nur etwa 60% der Gewichte ihrer gesunden Wildtyp-Geschwister. Die überlebenden Tiere wiesen eine signifikante Wachstumsrestriktion auf, wobei ihr Körpergewicht post partum nur etwa 30% der gleichaltrigen Wildtyp-Mäuse betrug. Powell-Braxton und Mitarbeiter beobachteten an homozygoten *Igf-1*(-/-)-Mäuse-Mutanten eine generalisierte Muskeldystrophie (siehe **Kapitel 1.13.1**) [645-650].

Eine Korrelation zwischen den Serumlevels von IGF-1 des fetalen Nabelschnurblutes und dem Geburtsgewicht (reduzierte Levels bei Feten mit IUGR und erhöhte Levels bei Feten mit gesteigertem Wachstum) wurde von Forschergruppen beschrieben. In einer Studie untersuchten Thakur *et al.* die Ontogenese einer IUGR an fetalen Hasen und die Wirkung

von endogen appliziertem IGF-1. Dabei wurden eine reduzierte Expression von gewebespezifischer *Igf-1*-mRNA und eine Reduktion der Levels von Igf-1 im Serum und in der amniotischen Flüssigkeit dieser wachstumsrestringierten fetalen Hasen im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe beobachtet. Auch eine Korrelation zwischen den Serum Igf-1-Levels und dem Prozentsatz der Gewichtsveränderung wurde beschrieben. Diese Daten und die Beobachtung von verstärkter Protein- und Fettanreicherung bei wachstumsrestringierten Ferkeln, die mit exogenem IGF-1 behandelt wurden, deuteten auf eine Evidenz der Wirksamkeit der antenatalen Behandlung einer IUGR mit IGF-1 hin [682,709,710,714,715].

Weitere Studien am Menschen und am Tiermodell ergaben, dass die Verabreichung von IGF-1 eine potenzielle Therapie für die Verbesserung des Gewebewachstums und des Gewichtszuwachses darstellte und somit dem Gewichtsverlust vorbeugte [723-727].

Bei kontinuierlicher prolongierter intraamniotischer Infusion von rhIGF-1 mittels eines Katheters, wie dies beispielsweise in einer Studie von Skarsgard *et al.* an fetalen Hasen durchgeführt wurde (siehe **Kapitel 1.13.3**), konnte ein signifikanter Anstieg der Igf-1-Levels des Serums und der Plazentagewichte der IGF-1-infundierten Feten im Vergleich zu den mit einem Placebo behandelten Kontrollfeten beobachtet werden. Es ließ sich auch ein Trend bezüglich eines Anstieges der fetalen Gewichte der infundierten, im Gegensatz zu den nicht-infundierten Feten feststellen, der allerdings nicht signifikant war [708].

Diese Beschreibung steht in Widerspruch zu der in unserer experimentellen Studie beobachteten signifikanten Gewichtsreduktion der IGF-1-behandelten fetalen Ratten, die in dieser Form nicht zu erwarten war. In unserer Studie konnten auch keine Unterschiede der Plazentagewichte festgestellt werden.

Allerdings kann einer anderen Studie von Bloomfield *et al.* [767] entnommen werden, dass eine intraamniotische Verabreichung von IGF-1 zu einer Suppression der fetalen zirkulierenden Igf-1-Konzentrationen führte. Es fielen dabei auch die *Igf-1*-mRNA-Levels in der Leber, der Muskulatur und der Plazenta signifikant ab, was die Autoren dadurch zu erklären versuchten, dass *exogen* zugeführtes IGF-1 die *endogene Expression* des *Igf-1* supprimiert haben könnte. Dieser negative Feedback-Mechanismus scheint auch die in unserer Studie beobachtete Reduktion des ratteneigenen Igf-1 in den fetalen Lungen nach intraamniotischer Applikation des rhIGF-1 zu erklären.

Kind *et al.* schilderten, dass aus einer intravenösen Verabreichung höherer Dosen von IGF-1 während einer Periode von zehn Tagen eine Reduktion der mRNA-Expression des *Igf-1* in der Leber fetaler Schafe resultierte. In einer weiteren Studie von Bloomfield *et al.* zeigte sich, dass radioaktiv markiertes IGF-1, welches in die amniotische Flüssigkeit appliziert wurde, in intakter Form über den fetalen Darm in die Zirkulation der Pfortader aufgenommen wurde und so auch die fetale Leber erreichen konnte [773,774].

Somit könnte es auch bei den in unserer Studie untersuchten, rhIGF-1-behandelten Rattenfeten zu einer Unterdrückung der *Igf-1*-mRNA-Expression in der Leber und in der Folge zu einem systemischen Abfall des Igf-1 gekommen sein, der die Reduktion der Körpergewichte teilweise mit verursacht haben könnte. Wie in einer Publikation von Yakar *et al.* nachzulesen ist, stammt das Igf-1 der Maus hauptsächlich aus der Leber und sie könnte vermutlich auch bei anderen Nagetieren, wie beispielsweise der Ratte, die Hauptquelle dieses Proteins darstellen [1000]. Somit hätte die Expressionsreduktion in der Leber möglicherweise entsprechende Folgen auf die Igf-1-Levels des Organismus und könnte somit auch das fetale Körperwachstum und Körpergewicht beeinflussen.

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Das IGF-1 in der Amnionflüssigkeit könnte auch einen direkten Effekt auf die Plazenta ausgeübt haben, denn IGF-1-Rezeptoren wurden auch dort nachgewiesen. Die Wirkung von IGF-1 auf die Plazenta beinhaltet, wie es in der Publikation von Sorem *et al.* nachzulesen ist, die Stimulation des Aminosäure-Transfers, die Throphoblast-Differenzierung und eine Reduktion der Thromboxan-Produktion [706,717].

Eine potentielle Konsequenz der hohen Levels von exogenem IGF-1 am Fetus manifestiert sich, den Beschreibungen von Skarsgard *et al.* folgend, durch die Effekte auf die endogene IGF-1-Produktion und Sensitivität der Rezeptoren. Diese wurden in ihrer Studie während der Phase der exogenen IGF-1-Exposition herab reguliert und könnten damit Einfluss auf die Langzeitkontrolle des fetalen Wachstums genommen haben [706,708].

Denkbar wäre auch, dass es, wie dies in einer Studie von Tarantal *et al.* [722] zwar nicht bestätigt, aber auch nicht explizit ausgeschlossen werden konnte, durch eine exogene Zufuhr von IGF-1 zu einer fetalen Hypoglykämie gekommen sein könnte (Siehe **Kapitel 1.13.4**). Allerdings fanden die Autoren in ihrer Studie keine Evidenz für eine, durch die Behandlung mit IGF-1 verursachte, fetale Hypoglykämie. Dennoch könnte sich eine Abnahme der fetalen Blutzuckerspiegel durch das in unserer experimentellen Studie applizierte rhIGF-1 möglicherweise auch auf die fetalen Körpergewichte der Ratten ausgewirkt haben.

In der Publikation von Eremia *et al.* [746] lassen sich diesbezüglich auch Hinweise finden, denn den Autoren fielen in der Kontrollgruppe höhere Blutglucosespiegel, als in den IGF-1-behandelten Gruppen auf.

Den Beschreibungen von Tarantal *et al.* folgend, führte die intermittierende Verabreichung von IGF-1 zu einer signifikanten Wirkung auf das fetale Organwachstum, wenn auch keine Effekte bezüglich der Veränderung der Körpergewichte auftraten. Auch diese Beobachtungen decken sich mit jenen, die von Lok und Mitarbeitern an fetalen Schafen mit chronischer IGF-1-Infusionsbehandlung gemacht wurden. Die Effekte auf die Organe könnten hierbei laut Vermutung der Autoren durch eine direkte Wirkung des IGF-1 auf den IGF-1R, oder durch synergistische Effekte mit anderen wachstumsfördernden Faktoren ausgeübt worden sein [722,734].

Nachdem in unserer Studie außer den Lungen keine inneren Organe der Rattenfeteten untersucht wurden, können keine Vergleiche in Hinsicht auf deren eventuelle Gewichts- oder Größenveränderungen angestellt werden. Es wäre allerdings denkbar, dass die hier vorgenommene zweimalige Injektion von rhIGF-1 zu einer Verringerung des fetalen Organwachstums geführt haben könnte (vor allem der Leber, Milz, etc.). Dies müsste allerdings durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Wie bereits bekannt ist, zeigten u. a. Clark *et al.* in ihrer Studie, dass die chronische Verabreichung von 100 µg rhIGF-1 für sieben Tage an adulte Mäuse die Lymphozytenzahl im Thymus, in den Lymphknoten und in der Milz steigerte. Der Anstieg der Gewichte des Thymus und der Milz wurde von den Autoren u. a. auf die steigende Zahl der Lymphozyten-Population in diesen Organen zurückgeführt [722,742].

Es wäre auch möglich, wenn auch eher unwahrscheinlich, dass die zweimalige und diskontinuierliche Applikation des rhIGF-1 in unserer experimentellen Studie an den Rattenfeteten gegenteilige Effekte auf den Thymus, die Milz und die Lymphknoten gehabt haben und somit auch einen, wenn auch sehr geringen, Teilbetrag zur gesamten Körpergewichtsreduktion beigetragen haben könnte. Diesbezüglich wurden in unserer experimentellen Studie aber keine weiteren Untersuchungen angestellt.

In einer früheren Studien von Bloomfield *et al.* wurde bereits eine Reduktion der Gewichte der fetalen Leber, der Milz und des Thymus, sowie der zirkulierenden Levels von IGF-1, bei gleichzeitig beobachteter Steigerung des Darmwachstums, nach amniotischer IGF-1-Verabreichung (20 µg rhIGF-1, einmal täglich, über zehn Tage) berichtet [766], so dass diese Möglichkeit hier, in Bezug auf die Darstellung eines Teilaspektes der fetalen Gewichtsreduktion der Ratten unserer Studie, in Betracht kommen könnte. Im Vergleich zu der in der Studie von Eremia *et al.* verabreichten Dosis von 360 µg/Woche, wurde von Bloomfield *et al.* dabei insgesamt allerdings eine um mehr als 40% reduzierte Dosis (200 µg rhIGF-1) appliziert. Eine postnatale enterale Verabreichung von IGF-1 führte zu einem Anstieg des Gewichtes der Leber in anderen Spezies. In ähnlicher Weise führte die intravenöse Verabreichung von IGF-1 in einer 50-fach höheren Dosis als in der Studie von Eremia *et al.*, zu einem Anstieg der Lebergewichte, aber dieser Effekt zeigte sich bei niedrigeren Dosen nicht [746,766,768,769].

Eremia *et al.* [746] untersuchten die Wirkung verschiedener Applikationsformen von IGF-1 auf fetale Schafe mit einer Wachstumsrestriktion und fanden dabei heraus, dass nur die intraamniotische Applikation zu einer signifikanten Steigerung der fetalen Lebergewichte führte (siehe **Kapitel 1.13.5**). Vielleicht hatten die Applikationsform, -dosis und das Applikationsintervall in unserer experimentellen Studie gegenteilige Effekte auf die fetale Leber und somit auch auf die fetalen Gewichte der Ratten. Sie könnte auch Auswirkungen auf das fetale braune Fettgewebe gehabt haben, denn IGF-1 ist, wie dies von Lorenzo *et al.* beschrieben wurde, für die Zellteilung und Differenzierung des fetalen braunen Fettgewebes der Ratten sehr wichtig [770]. Somit könnte es auch hierdurch zu einer Gewichtsreduktion der fetalen Ratten gekommen sein. Einen Überblick über die verschiedenen IGF-1-Dosen, –Applikationsformen und deren Wirkung an den verschiedenen Spezies liefert die Tabelle im **Anhang** dieser Arbeit.

Die signifikant verringerten Körpergewichte der fetalen Ratten der IGF-1-Gruppe könnten auch auf einen verringerten Gewichtszuwachs im Vergleich zur Placebogruppe zurückzuführen sein und somit nicht die Folge von katabolen Stoffwechselfvorgängen, sondern jene einer Arretierung des Anabolismus der fetalen Ratten darstellen.

Möglicherweise wurde ein Teil des intraamniotisch applizierten rhIGF-1 an verschiedene IGFBPs (vermutlich vorwiegend an IGFBP-3) gebunden und konnte somit, bei zweimaliger Applikation, keine entsprechenden wachstumssteigernden Effekte hervorrufen. Diese Annahme basiert auf der Beobachtung von Eremia *et al.*, die bei Schafen IGFBP-3 als das innerhalb der Amnionflüssigkeit am reichlichsten vorhandene Bindungsprotein identifizierten und auch erkannten, dass die fetale IGFBP-3-Produktion durch Nährstoffe, Insulin und auch IGF-1 reguliert wurde. Ein Anstieg der amniotischen IGFBP-Konzentrationen könnte laut Beschreibung der Autoren die Bioverfügbarkeit des amniotischen IGF-1 reduziert und somit seine Aufnahme durch die Feten und damit auch ihr Wachstum verringert haben [746].

Die folgenden Beschreibungen von Bloomfield *et al.* sollen in diesem Zusammenhang ebenfalls erwähnt werden. Die Autoren beobachteten in ihrer Versuchsreihe der intraamniotischen Applikation von radioaktiv-markiertem IGF-1 (¹²⁵I-IGF-1) an fetale Schafen (siehe **Kapitel 1.13.6**), dass die Verteilung des ¹²⁵I-IGF-1 im Fruchtwasser schnell voranging. Die gemessene Halbwertszeit von ¹²⁵I-IGF-1 betrug etwa 24 Stunden. Die Höhe des an seine Bindungsproteine gebundenen Anteils von ¹²⁵I-IGF-1 variierte stark unter den verschiedenen Tieren, aber auch 144 Stunden nach der Injektion war noch ein bemerkenswerter Teil der gebundenen Fraktion vorhanden. Etwa 6 Stunden nach der

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Injektion von ^{125}I -IGF-1 traten Peaks mit kleinerem Molekulargewicht auf, die offenbar Abbauprodukte von IGF-1 darstellten. Als vorherrschendes Bindungsprotein wurde auch hier das IGFBP-3 identifiziert. Die durchgeführte Analyse ergab Hinweise auf eine sehr hohe Korrelation zwischen der Prozentzahl des gebundenen ^{125}I -IGF-1 und der Dichte der IGFBP-3-Bande im Fruchtwasser. IGFBP-3 war offenbar nach Annahme der Autoren für den größten Anteil des gebundenen IGF-1 verantwortlich. Die Daten dieser Studie von Bloomfield *et al.* deuteten darauf hin, dass das intraamniotisch verabreichte ^{125}I -IGF-1 offensichtlich vom Fetus geschluckt und über den Darm in die portale Vene aufgenommen wurde. Das ^{125}I -IGF-1 verweilte im Fruchtwasser für mindestens 6 Tage in gebundener und freier Form. Dies ließ die Autoren eine anhaltende Freisetzung von ^{125}I -IGF-1 aus dem Fruchtwasser in die systemische Zirkulation des Fetus nach einer einzelnen Injektion vermuten [773].

Demzufolge könnte in unserer experimentellen Studie die verringerte Wirkung des rhIGF-1 auf die Rattenfetten einerseits, wie oben erwähnt, durch die Bindung an die unterschiedlichen IGFBPs, aber andererseits auch durch seinen Abbau im Fruchtwasser zu erklären sein.

Auch ein von Bloomfield *et al.* beschriebener Verlust des applizierten IGF-1 über die Plazenta käme in Betracht, denn die Messwerte für ^{125}I -IGF-1 stiegen, wie dem Bericht der Studie der Autoren entnommen wurde, im maternalen Plasma 12 Stunden nach der intraamniotischen IGF-1-Injektion an [773].

Auch das Vorkommen von Proteasen im Fruchtwasser der Ratten könnte in unserer Studie zu einem Abbau der IGFBPs und damit zu einer Verringerung der Wirkung des applizierten rhIGF beigetragen haben. Das Vorhandensein von Proteasen, speziell einer Serin-Protease, ist im menschlichen Fruchtwasser bekannt und diese degradiert IGFBP-3, -4 und -5 [793].

Die Levels von IGF-1 könnten von Bindungsproteinen, oder auch umgekehrt, die Levels der Bindungsproteine von IGF-1 beeinflusst und geregelt werden. IGFBP-3 spielt mit großer Wahrscheinlichkeit eine wichtige Rolle bei der Regulation der Levels von IGF-1 im Fruchtwasser. Die Bioverfügbarkeit von ^{125}I -IGF-1 belief sich in einer Studie von Kimura *et al.* auf etwa 9% der verabreichten Dosis. Den Berichten von zwei weiteren Untersuchungen, von welchen eine an Ratten, die andere an Schweinen durchgeführt wurde, konnte entnommen werden, dass höhere Werte von radioaktiv markiertem IGF-1 im portalen, als im systemischen Blut vorhanden waren und diese Berichte wiesen damit stark auf die Aufnahme dieser Verbindung über den Darm hin [773,787].

Den Beobachtungen von Nagata *et al.* folgend, wäre eine Proliferationssteigerung unterschiedlicher Zelltypen in den fetalen Rattenlungen zu erwarten gewesen. Die Autoren stellten vor allem für SMA und TTF1 Wachstumssteigerungen in den mit IGF-1 und IGF-2 behandelten Lungenzellkulturen fest [967] (siehe **Kapitel 1.16**).

Allerdings waren in diesen Versuchen die Zellkulturen einem mit IGF-1 angereichertem Medium ausgesetzt, was einen direkten Vergleich der Ergebnisse unseres *in vivo*-Modells nicht zulässt.

Auffallend war die bei der RT-PCR-Analyse der fetalen Lungengewebe festgestellte signifikante Steigerung der *Igf-2r*-mRNA-Expression. Diese wurde von einer nur sehr geringen Steigerung der mRNA-Expression des *Igf-1r* begleitet, welche auch keine Signifikanz erreichte.

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Wie in einem Review von Hiden *et al.* [888] beschrieben, besteht aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der IGFs eine gewisse Überlappung in Bezug auf ihre Rezeptor-Bindungsaffinität auf der einen, und eine Wechselwirkung zwischen Insulin und den IGFs auf der anderen Seite. Allerdings bindet Insulin vorwiegend an den Insulinrezeptor (IR) und IGF-1 hauptsächlich an den IGF-1R. Im Gegensatz dazu, bindet IGF-2 ebenfalls an den IGF-1R, aber auch an die IR-Isoform IR 11-. Die Affinität zwischen IGF-2 und dem IR 11- ist dabei nur wenig geringer, als jene zwischen diesem Rezeptor und Insulin, während die Bindung von IGF-1 an den IR 11- keine physiologische Relevanz erreicht. Die Bindungsaffinität von IGF-2 bezüglich des IGF-1R ist jener von IGF-1 vergleichbar, aber Insulin bindet dort nur schwach [888].

Frühere Untersuchungen führten zu der Erkenntnis, dass IGF-1 als Wachstumsfaktor eine wichtige Rolle in den späten Stadien der Lungenentwicklung spielte, während IGF-2 dieses Verhalten sowohl in der embryonalen, als auch in der fetalen Periode aufwies. Beide, sowohl IGF-1, als auch IGF-2, binden an den IGF-1R und regulieren damit wichtige Signalwege in der Lungenentwicklung. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch der IGF-2R die beiden IGFs binden könnte [647,648,967].

Anhand der Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse kann in dieser Studie angenommen werden, dass das applizierte rhIGF-1, vermutlich hauptsächlich durch die Vermittlung des *Igf-1r*, in den fetalen Lungen der Ratten zu einer signifikanten Reduktion der endogenen *Igf-1*-Proteinexpression führte. Möglicherweise stellte die nicht signifikante Steigerung der *Igf-1r*-mRNA-Expression eine Reaktion auf die erhöhten Spiegel des exogenen rhIGF-1 im Fruchtwasser dar und es sollte damit die Aufnahme des rhIGF-1 bewerkstelligt werden. Nachdem das rhIGF-1 vermutlich auch zu einem gewissen Grad an den *Igf-2r* binden kann bzw. konnte, könnte es dort die signifikante Steigerung der Genexpression mit verursacht haben.

Warum diese Expressionssteigerung allerdings gerade für die mRNA des *Igf-2r* und nicht des *Igf-1r* signifikant ausfiel, kann an dieser Stelle nicht vollständig geklärt werden. Es wäre denkbar, dass das applizierte rhIGF-1 den *Igf-1r* der Ratten blockiert und somit die Bindung des *Igf-2* an diesen Rezeptor unterbunden oder zumindest vermindert haben könnte. Somit wäre die in unserer Studie beobachtete Steigerung der mRNA-Expression des *Igf-2r* möglicherweise eine Folge davon und ihre Ursache könnte im gesteigerten Clearance-Bedarf für das nicht mehr an den *Igf-1r* bindende *Igf-2* liegen.

Die Beobachtung der gesteigerten *Igf-2r*-mRNA-Expression ist auch deshalb nicht völlig schlüssig, weil IGF-1 zu einem geringeren Teil an den *Igf-2r*, als an den *Igf-1r* bindet. Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass die *Igf-1r*-mRNA-Expression in unserer Studie zu einem früheren Zeitpunkt (beispielsweise nach der ersten Applikation des rhIGF-1 am Tag 19 oder der zweiten Applikation am Tag 20) signifikant gesteigert gewesen war und dann, im Zuge der vermehrten Aufnahme des rhIGF-1, zum Zeitpunkt der Gewinnung der fetalen Lungengewebe am Tag 21,5 bereits attenuiert und somit nicht mehr signifikant gesteigert war.

Wie es u. a. der Publikation von Harris *et al.* entnommen werden kann, übt der IGF-2R eine wichtige Wirkung als Clearance-Rezeptor aus, bindet IGF-2 und führt es mittels Rezeptor-mediierter Endozytose dem Abbau in den Lysosomen zu. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass er eine solche Wirkung zumindest teilweise, aber mit geringerer Affinität, auch auf IGF-1 haben könnte [1001].

Es wäre somit, den Resultaten unserer Studie folgend auch denkbar, dass die über den *Igf-1r* medierte übermäßige Aufnahme des applizierten rhIGF-1 aus dem Fruchtwasser gebremst werden sollte und darum die *Igf-1r*-mRNA-Expression zum Zeitpunkt der

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Analyse zwar erhöht, aber nicht bzw. nicht mehr signifikant gesteigert war, sondern ein vermehrter Abbau des rhIGF-1 durch den Igf-2-Rezeptor eingeleitet werden sollte. Dieser bindet zwar IGF-1 mit geringerer Affinität, könnte aber trotzdem eine gewisse Clearance des IGF-1 bewirken [967,1001,1002].

Möglich wäre also, als Folge der beobachteten Expressionsveränderungen, eine Reduktion der rhIGF-1-Aufnahme über den Igf-1r (Attenuation der Steigerung der *Igf-1r*-mRNA-Expression) und ein vermehrter Abbau des applizierten rhIGF-1 über den Igf-2r (hoch signifikante Steigerung der *Igf-2r*-mRNA-Expression). Der vermehrte Bedarf einer rhIGF-1-Clearance könnte somit möglicherweise die hoch signifikante Expressionssteigerung der *Igf-2r*-mRNA teilweise erklären bzw. mit hervorgerufen haben.

Das in dieser experimentellen Studie intraamniotisch verabreichte rhIGF-1 führte zu einer signifikanten Reduktion der endogenen Igf-1-Proteinexpression in den fetalen Rattenlungen, wurde aber teilweise von den Rattenfetten auch geschluckt und somit in den Gastrointestinaltrakt aufgenommen. Obwohl für unsere Studie ein spezifischer Antikörper verwendet wurde, war die Unterscheidung zwischen dem ratteneigenen Igf-1 und dem verabreichten rhIGF-1 nicht möglich, da er offenbar mit beiden Proteinen reagierte. Ganz deutlich konnte dies anhand der gesteigerten Proteinexpression des Igf-1 der Rattenfetten der Placebogruppe im Vergleich zur IGF-1- und Kontrollgruppe erkannt werden. Die in der Placebogruppe beobachteten hohen Levels des Igf-1 konnten demnach nur aus der ratteneigenen endogenen Produktion stammen.

Nachdem die ratteneigene Igf-1-Proteinexpression in den Lungengeweben sowohl in der rhIGF-1-, als auch in der Placebogruppe gegenüber der Kontrollgruppe gesteigert war, wäre es denkbar, dass diese Steigerung eine Folge des verabreichten Nitroflens dargestellt haben könnte.

Als Ursache für den Anstieg der Igf-1-Proteinexpression in der Behandlungsgruppe könnten aber möglicherweise auch die chirurgische Intervention (Stich und Injektion des rhIGF-1), ein Fruchtwasserverlust oder eine mögliche Infektion verantwortlich gewesen sein.

Vielleicht war das in dieser experimentellen Studie an den beiden aufeinander folgenden Tagen (E19 und 20) verabreichte rhIGF-1 (je 0,2 µg) quantitativ zu gering bzw. der entsprechende Stimulus zu kurz oder zu diskontinuierlich, um eine Wachstumssteigerung der fetalen Rattengewebe (speziell der Lungen) hervorzurufen. Er war aber offenbar ausreichend, um die ratteneigene Igf-1-Proteinexpression signifikant, möglicherweise auch systemisch, zu senken. Es scheint, als wäre durch diese Applikationsform eher eine Verzögerung des Anabolismus der fetalen Ratten, als dessen Förderung eingetreten.

Außerdem wurde in einer Studie von Nagata *et al.* [967] an Kulturen von murinen Lungengeweben eine signifikante Expressionssteigerung der *Igf-1r*- sowie auch der *Igf-2r*-mRNA in den späteren Stadien der Lungenentwicklung im Vergleich zu früheren Stadien nachgewiesen. Demnach könnte auch an der Ratte, also *in vivo*, von einer ähnlichen Expressionssteigerung ausgegangen werden und diese zeigte sich hier zwar in Bezug auf die Expression der *Igf-2r*-mRNA, allerdings konnte sie, wider Erwarten, bei der *Igf-1r*-mRNA-Expression der fetalen Rattenlungen unserer Studie nicht, oder nicht mehr, verzeichnet werden.

Neben den bereits erwähnten signifikanten Veränderungen zeigte sich in den Geweben der fetalen Rattenlungen ein Trend zur Reduktion der *Fgf10*-mRNA-Expression der IGF-1- im Vergleich zur Placebogruppe, der allerdings keine Signifikanz erreichte. Teramoto *et al.*

berichteten über eine Reduktion der mRNA-Expression des *Fgf10* in CDH-Lungen, was darauf hindeutete, dass die verminderte Synthese von *Fgf10* die pulmonale Hypoplasie mit verursachen könnte (siehe **Kapitel 1.12.7**) [978]. Somit könnte der in unserer experimentellen Studie beobachtete Trend zur Expressionsreduktion des *Fgf10* zumindest ansatzweise eine Lungenhypoplasie bewirkt haben, oder eine Folge davon gewesen sein.

Die in unserer Studie auch nur als Trend beobachtete Reduktion der *Plat*-mRNA-Expression und Steigerung der Ki67-Proteinexpression, sowie Steigerung der *Ttfl*-, *T1α*-, *Vegf-a*-, *Pecam-1*-, *Kdr/Flk-1 (Vegfr-2)*- und *Flt-1 (Vegfr-1)*-mRNA-Expression, kann vermutlich als unspezifische Reaktionen auf den Gewebeumbau und die damit in Verbindung stehende Zellmigration in den fetalen Rattenlungen interpretiert werden [975,997].

Es konnte auch ein Trend zur Reduktion der mRNA-Expression des *Bmp4* im Vergleich der IGF-1- zur Placebogruppe beobachtet werden. Ein solcher könnte sich für das Wachstum und die Reifung der Lungen der fetalen Ratten als wenig förderlich erweisen, denn eine Blockade des Signalwegs von BMP4 führte, wie es den Berichten von Gosh *et al.* zu entnehmen ist, zu einer Reduktion der distalen Typen der Alveolarepithelzellen, begleitet von einem Anstieg der Zilien-tragenden Zellen und Clara-Zellen. BMP4 ist von großer Wichtigkeit für die Kontrolle der Verzweigung der Lunge und die Entwicklung des proximal-distalen Differenzierungsmuster des sich entwickelnden Lungenepithels [167,976,977]. Demnach könnte sich eine Reduktion seiner mRNA-Expression auch auf diese elementaren Entwicklungsschritte negativ auswirken.

Anhand der mRNA-Expression der entsprechenden Marker konnten signifikante Veränderungen weder bezüglich der Vasculo- und Angiogenese, noch bezüglich der Endothelzellbildung in den Lungengeweben der fetalen Ratten festgestellt werden.

Es soll hier abschließend festgehalten werden, dass sich die Gründe der mangelnden Wirkung des applizierten rhIGF-1 ohne zusätzliche Analysen an dieser Stelle nicht hinreichend klären lassen.

Es müsste diesbezüglich beispielsweise genauer ergründet werden, inwiefern die Applikationsform des rhIGF-1 (Dauer, Dosis und Kontinuität) hier einen entsprechenden Einfluss ausgeübt haben könnten. Weiters wäre es interessant, genauer zu ergründen, durch welche Faktoren die Reduktion der fetalen Körpergewichte hervorgerufen wurde und zu welchen Anteilen daran beispielsweise die Gewichtsveränderungen der fetalen Organe bzw. der fetalen Fettgewebe oder eine veränderte Flüssigkeitsverteilung beteiligt waren.

Auch eine Untersuchung der *Igf-1*- und *Igf-2*-mRNA-Expression der Lungengewebe könnte eventuell hierzu noch Informationen liefern. Interessant wäre in dieser Hinsicht auch eine Untersuchung der fetalen Leber in Bezug auf ihr Gewicht und die mRNA-Expression von *Igf-1*, um damit auch die eventuelle systemische Wirkung des intraamniotisch applizierten rhIGF-1 genauer einschätzen zu können.

Als aufschlussreich bezüglich der mRNA-Expression des *Igf-1r* und *Igf-2r* könnte sich auch die Analyse zu einem früheren Zeitpunkt nach der rhIGF-1-Applikation (Tag 19 und 20) erweisen, um die direkte und frühe Reaktion der Expression dieser Rezeptoren und ihre Veränderung über die Zeit genauer charakterisieren zu können.

Die Untersuchungen der fetalen und ggf. mütterlichen Blutglucosespiegel, sowie deren IGF-1-Serumlevels, könnten ebenfalls Aufschluss über die Wirkung des rhIGF-1 geben und damit eventuell einen weiteren Anhaltspunkt für den fetalen Gewichtsverlust liefern. Als nützlich bezüglich der Aufklärung der Ursache der fetalen Gewichtsreduktion könnte sich auch die Analyse der IGF-1-Levels des fetalen Nabelschnurblutes erweisen, denn wie

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

bereits erwähnt, existiert offenbar eine Korrelation zwischen ihnen und den fetalen Geburtsgewichten [709,710,714,715].

Aufgrund der signifikanten Gewichtsreduktion und der mangelnden Effekte auf das Lungenwachstum und die Lungenreifung der fetalen Ratten, ist die in unserer experimentellen Studie untersuchte intraamniotische Applikation von rhIGF-1 in der hier durchgeführten Art und Weise als Therapieansatz bei Feten mit angeborener Lungenhypoplasie vermutlich nicht geeignet. Sie scheint sich in dieser zweimaligen und damit kurzen und diskontinuierlichen Applikationsform als non-profitabel für das fetale Wachstum und die Entwicklung herausgestellt zu haben.

5. Quellenverzeichnis

- ¹ Allan Douglas W, Greer JJ. Pathogenesis of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in fetal rats. *J Appl Physiol.* 1997;83(2):338–347.
- ² Harding R. Development of the respiratory system; textbook of Fetal Physiology, edited by G. D. Thorburn and R. Harding. New York: Oxford Univ. Press, p. 140–167, 1994.
- ³ Adzick NS, Harrison MR, Glick PL, Nakayama DK, Manning FA, deLorimier AA. Diaphragmatic hernia in the fetus: Prenatal diagnosis and outcome in 94 cases. *J Pediatr Surg.* 1985;20:357-361.
- ⁴ Strang LB. Fetal lung liquid: secretion and reabsorption. *Physiol Rev.* 1991;7: 991.
- ⁵ Harding R, Sigger JN, Wickham PJ, Bocking AD. The regulation of flow of pulmonary fluid in fetal sheep. *Respir Physiol.* 1984;57: 47.
- ⁶ Goldin GV, Wessells NK. Mammalian lung development: the possible role of cell proliferation in the formation of supernumerary tracheal buds and in branching morphogenesis. *J Exp Zool.* 1979 Jun;208(3): 337-46.
- ⁷ Kotecha S. Lung growth for beginners. *Paediatric Respiratory Reviews.* 2000;1(4), 308–313.
- ⁸ Drews U. Taschenatlas der Embryologie. Georg Thieme Verlag. 2006.
- ⁹ Wert SE. Normal and abnormal structural development of the lung. In: Polin RA, Fox WW, Abman SH, ed. *Fetal and Neonatal Physiology*, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company. 2004:783.
- ¹⁰ Wells LJ, Boyden EA. Development of the bronchopulmonary segments in human embryos of Horizons XVII-XIX. *Am J Anat.* 1954;95:163.
- ¹¹ Ten-Have Opbroek AWW. The development of the lung in mammals: an analysis of concepts and findings. *Am J Anat.* 1981;162:201.
- ¹² Kitaoka H, Burri Ph, Weibel ER. Development of the human fetal airway tree; analysis of the numerical density of airway endtips. *Anat Rec.* 1996;244:207.
- ¹³ Jeffery PK. The development of large and small airways. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:S174–80.
- ¹⁴ Adamson JYR. Development of Lung Structure. *The Lung.* Scientific Foundations Second Edition (1997) Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, page 994.
- ¹⁵ Shannon JM, Deterding RR. Epithelial-mesenchymal interactions in lung development. In McDonald JA (ed): *Lung Growth and Development.* New York, Marcel Dekker, 1997, p 81.
- ¹⁶ Crouch EC, Mecham RP, Davila RM and Noguchi A. Collagens and Elastin Fiber Proteins in Lung Development. In: *Lung Growth and Development.*, edited by McDonald JA. New York: Marcel Dekker, 1997, p. 327-364.
- ¹⁷ Scarpelli EM. Lung cells from embryo to maturity. In Scarpelli EM (ed): *Pulmonary Physiology: Fetus, Newborn, Child, and Adolescent.* 2nd ed. Philadelphia. Lea & Febiger, 1990. pp 42-82.
- ¹⁸ Thurlbeck WM. Pre- and postnatal organ development. In Chernick J, Mellins RB (eds): *Basic Mechanisms of Pediatric Respiratory Disease: Cellular and Integrative.* Philadelphia, RC Decker, 1991, pp 23-35.
- ¹⁹ Sunday ME. Neuropeptides and lung development. In McDonald JA (ed): *Lung Growth and Development.* New York, Marcel Dekker, 1997, p 401.
- ²⁰ Bucher U, Reid L. Development of the intrasegmental bronchial tree: the patterns of branching and development of cartilage at various stages of intrauterine Life. *Thorax* 1961;16:207.
- ²¹ Jeffery PR, Reid LM. Ultrastructure of airway epithelium and submucosal gland development. In: Hodson WA (ed): *Development of the Lung.* New York, Marcel Dekker, 1979, p 87.
- ²² McCray PB Jr. Spontaneous contractility of human fetal airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1993;8:573.
- ²³ Sparrow MP, Weichselbaum M and McCray PB, Jr. Development of the innervation and airway smooth muscle in human fetal lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999;20:550–560.
- ²⁴ Kitaoka H, Burri PH, Weibel ER. Development of the human fetal airway tree: analysis of the numerical density of airway endtips. *Anat Rec.* 1996 Feb;244(2):207-13.
- ²⁵ Shan L, Emanuel RL, Dewald D, Torday JS, Asokanathan N, Wada K, Wada E, Sunday ME. Bombesin-like peptide (blp) receptor gene expression, regulation and function in fetal murine lung. *Am J Physiol.* 2004 Jan;286(1):L165-73.
- ²⁶ Mercus PJFM, Have-Opbroek AAW, Quanjer PH. Human lung growth: a review. *Pediatr Pulmonol.* 1996;21(6):383–97.
- ²⁷ Khor A, Stahlman MT, Gray ME, Whitsett JA. Temporal-spatial distribution of SP-B and SP-C proteins and mRNAs in the developing respiratory epithelium of the human lung. *J Histochem Cytochem.* 1994 Sep;42(9):1187-99.
- ²⁸ Congdon ED. Transformation of the aortic arch system during development of the human embryo.

Carnegie Inst Contrib Embryol. 1922;14:47.

²⁹ Hislop A, Reid L. Intrapulmonary arterial development during fetal life: branching pattern and structure. *J Anat.* 1962;113:35.

³⁰ Verbeken EK, Cauberghe M, Van der Woestijne KP. Membranous bronchioles and connective tissue network of normal and emphysematous lungs. *J Appl Physiol.* 1996;81:2468-2480.

³¹ deMello DE, Reid LM. Embryonic and early fetal development of human lung vasculature and its functional implications. *Pediatr Dev Pathol.* 2000;3:439.

³² Hall SM, Hislop AA, Pierce C, Haworth SG. Prenatal origins of human intrapulmonary arteries: formation and smooth muscle maturation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000;23:194-203.

³³ Leslie KO, Mitchell JJ, Woodcock-Mitchell JL, Low RB. Alpha smooth muscle actin expression in developing and adult human lung. *Differentiation.* 1990;44:143.

³⁴ Miano JM, Cserjesi P, Ligon K. Smooth muscle myosin heavy chain exclusively marks the smooth muscle lineage during mouse embryogenesis. *Circ Res.* 1994;75:803.

³⁵ Kotecha S. Lung growth: implications for the newborn infant. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2000;82:F69-74.

³⁶ Zhou I, Lim L, Costa RH, Whitsett JA. Thyroid transcription factor-1, hepatocyte nuclear factor-3 β , surfactant protein B, C, and Clara cell secretory protein in developing mouse lung. *J Histochem Cytochem.* 1996;44:1183-93.

³⁷ Khor A, Stahlman MT, Gray ME, Whitsett JA. Temporal-spatial distribution of SP-B and SP-C proteins and mRNAs in the developing respiratory epithelium of the human lung. *J Histochem Cytochem.* 1994 Sep;42(9):1187-99.

³⁸ Williams MC, Mason R. Development of the Type II cells in the fetal rat lung. *Am Rev Respir Dis.* 1977;115:37.

³⁹ Ballard PL. Hormonal regulation of pulmonary surfactant. *Endocr Rev.* 1989;10:165.

⁴⁰ Mendelson CR, Boggaram V. Hormonal control of the surfactant system in fetal lung. *Annu Rev Physiol.* 1991;53:415.

⁴¹ Rooney SA, Young SL, Mendelson CR. Molecular and cellular processing of lung surfactant. *FASEB J.* 1994;8:957-967.

⁴² Burri PH. Structural aspects of prenatal and postnatal development and growth of the lung. In McDonald JA (rd): *Lung Growth and development.* New York, Marcel Dekker. 1997;p 1.

⁴³ Blanco CE. Maturation of fetal breathing activity. *Biol Neonate.* 1994;65(3-4):182-8.

⁴⁴ Crouch E, Rust K, Marienckel W, Parghi D, Chang D, Persson A. Developmental expression of pulmonary surfactant protein D (SP-D). *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1991 Jul;5(1):13-8.

⁴⁵ Khor A, Stahlman MT, Gray ME, Whitsett JA. Temporal-spatial distribution of SP-B and SP-C proteins and mRNAs in the developing respiratory epithelium of the human lung. *J Histochem Cytochem.* 1994 Sep;42(9):1187-99.

⁴⁶ Chi EY. The ultrastructural study of glycogen and lamellar bodies in the development of fetal monkey lung. *Exp Lung Res.* 1985;8:275.

⁴⁷ Rannels SR, Rannels DE. The type II pneumocyte as a model of lung cell interaction with the extracellular matrix. *J Mol Cell Cardiol.* 1989 Feb; 21 Suppl 1:151-9.

⁴⁸ Joshi S, Kotecha S. Lung growth and development.

Early Human Development. 2007;83:789-794; doi:10.1016/j.earlhumdev.2007.09.007.

⁴⁹ Noguee LM, Garnier G, Dietz HC. A mutation in the Surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindred. *J Clin.* 1994;93:1860-1863.

⁵⁰ Noguee LM, Wert SE, Proffitt SA, Hull WM, Whitsett JA. Allelic heterogeneity in surfactant protein B (SP-B) deficiency. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;161:973-981.

⁵¹ Thurlbeck WM. Postnatal human lung growth. *Thorax.* 1982;37:564-571.

⁵² Harding R, Hooper SB. Regulation of lung expansion and lung growth before birth. *J Appl Physiol.* 1996;81:209.

⁵³ Olver RE, Strang LB. Ion fluxes across the pulmonary epithelium and the secretion of lung liquid in the foetal lamb. *J Physiol.* 1974;241:327.

⁵⁴ Embryology.ch. Einteilung der adulten Lunge. Verfügbar unter:

<http://www.embryology.ch/allemand/rrespiratory/phasen07.html> [Internet]. Abgerufen am 15.09.2011.

⁵⁵ Koshida S, Hirai Y. Identification of cellular recognition sequence of epimorphin and critical role of cell/epimorphin interaction in lung branching morphogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 May 19;234(2):522-5.

⁵⁶ Ochs M, Nyengaard JR, Jung A, Knudsen L, Voigt M, Wahlers T. The number of alveoli in human lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;169:120-4.

- ⁵⁷ Zeman KL, Bennet WD. Growth of the small airways and alveoli from childhood to the adult lung measured by aerosol-derived airway morphology. *J Appl Physiol.* 2006;100:956–71.
- ⁵⁸ Kitterman JA, Chapin CJ, Vanderbilt JN, Porta NFM, Scavo LM, Dobbs LG, Ertsey R, Goerke J. Pre- and postnatal lung development, maturation and plasticity. Effects of oligohydramnios on lung growth and maturation in the fetal rat. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;282(3):L431–9.
- ⁵⁹ Rehan VK, Wang Y, Sugano S, Santos J, Patel S, Sakurai R, Boros LG, Lee WP, Torday JS. In utero nicotine exposure alters fetal rat lung alveolar type II cell proliferation, differentiation and metabolism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007; 292(1): L323–33.
- ⁶⁰ Tschanz SA, Makanya AN, Haenni B, Burri PH. Effects of neonatal high-dose short-term glucocorticoid treatment on the lung: a morphologic and morphometric study in the rat. *Pediatr Res.* 2003;53(1):72–80.
- ⁶¹ Jones RAK. Randomized, controlled trial of dexamethasone in neonatal chronic lung disease: 13–17 year follow-up study: II. Respiratory status, growth, and blood pressure. *Pediatrics.* 2005;116(2): 379–84.
- ⁶² Nixon PA, Washburn LK, Schechter MS, O’Shea TM. Follow-up study of randomized controlled trial of postnatal dexamethasone therapy in very low birth weight infants: effects on pulmonary outcome at age 8 to 11 years. *J Pediatr.* 2007;150(4): 345–50.
- ⁶³ Griese M. Pulmonary surfactant in health and human lung disease: state of the art. *Eur Respir J.* 1999;13:1455–1476.
- ⁶⁴ Jain L. Alveolar fluid clearance in developing lungs and its role in neonatal transition. *Clin Perinatol.* 1999;26:585–599.
- ⁶⁵ McDonald JA. *Lung Growth and Development.* New York: Marcel Dekker. 1997.
- ⁶⁶ Wigglesworth JS, Desai R. Effect on lung growth of cervical cord section in the rabbit fetus. *Early Hum Dev.* 1979;3:51–65.
- ⁶⁷ Fewell JE, Lee CC, Kitterman JA. Effects of phrenic nerve section on the respiratory system of fetal lambs. *J Appl Physiol.* 1981;51:293–297.
- ⁶⁸ Richardson B, Natale R, Patrick J. Human fetal breathing activity during electively induced labor at term. *Am J Obstet Gynecol.* 1979;133:247–255.
- ⁶⁹ Ash KM, Morrison I, Manning FA. Observations of intrapartum fetal activities. *Am J Obstet Gynecol.* 1993;168:760–764.
- ⁷⁰ Mulder EJ, Boersma M, Meeuse M, van der Wal M, van de Weerd E, Visser GH. Patterns of breathing movements in the near-term human fetus: relationship to behavioural states. *Early Hum Dev.* 1994;36:127–135.
- ⁷¹ Van Vliet MA, Martin CB, Jr., Nijhuis JG, Prechtel HF. The relationship between fetal activity and behavioral states and fetal breathing movements in normal and growth-retarded fetuses. *Am J Obstet Gynecol.* 1985;153:582–588.
- ⁷² Jansen AH, Chernick V. Respiratory control in the fetus. In: Chernick V, Mellins RB (eds). *Basic mechanisms of pediatric respiratory disease: cellular and integrative.* Philadelphia: BC Decker Inc. 1991. p. 273–287.
- ⁷³ Ash KM, Morrison I, Manning FA. Observations of intrapartum fetal activities. *Am J Obstet Gynecol.* 1993;168:760–764.
- ⁷⁴ Hooper SB, Harding R. Fetal lung liquid: a major determinant of the growth and functional development of the fetal lung. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1995;22:235–247.
- ⁷⁵ Miller AA, Hooper SB, Harding R. Role of fetal breathing movements in control of fetal lung distension. *J Appl Physiol.* 1993;75:2711–2717.
- ⁷⁶ Smith PG, Janiga KE, Bruce MC. Strain increases airway smooth muscle cell proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1994;10:85–90.
- ⁷⁷ Besinger RE, Compton AA, Hayashi RH. The presence or absence of fetal breathing movements as a predictor of outcome in preterm labor. *Am J Obstet Gynecol.* 1987;157:753–757.
- ⁷⁸ Blott M, Greenough A, Nicolaides KH, Campbell S. The ultrasonographic assessment of the fetal thorax and fetal breathing movements in the prediction of pulmonary hypoplasia. *Early Hum Dev.* 1990;21:143–151.
- ⁷⁹ Blott M, Greenough A, Nicolaides KH. Fetal breathing movements in pregnancies complicated by premature membrane rupture in the second trimester. *Early Hum Dev.* 1990;21:41–48.
- ⁸⁰ Moessinger AC, Harding R, Adamson TM, Singh M, Kiu GT. Role of lung fluid volume in growth and maturation of the fetal sheep lung. *J Clin Invest.* 1990;86:1270–1277.
- ⁸¹ Kizilcan F, Tanyel FC, Cakar N, Buyukpamukcu N, Hicsonmez A. The effect of low amniotic pressure without oligohydramnios on fetal lung development in a rabbit model. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;173:36–41.

- ⁸² Bland RD. Fetal lung liquid and its removal near term. In: Crystal RG, West JB, Weibel ER, Barnes PJ, (eds). *The Lung: Scientific Foundations*, second ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1997. p. 2115–2127.
- ⁸³ O’Brodivich HM. Immature epithelial Na⁺ channel expression is one of the pathogenetic mechanisms leading to human neonatal respiratory distress syndrome. *Proc Assoc Am Physicians*. 1996;108:345–355.
- ⁸⁴ Olver RE, Ramsden CA, Strang LB, Walters DV. The role of amiloride-blockable sodium transport in adrenaline-induced lung liquid reabsorption in the fetal lamb. *J Physiol (Lond)*. 1986;376:321–340.
- ⁸⁵ Barker PM, Walters DV, Markiewicz M, Strang LB. Development of the lung liquid reabsorptive mechanism in fetal sheep: synergism of triiodothyronine and hydrocortisone. *J Physiol (Lond)*. 1991;433–449.
- ⁸⁶ Margraf LR, Paciga JE, Balis JU. Surfactant-associated glycoproteins accumulate in alveolar cells and secretions during reparative stage of hyaline membranes disease. *Hum Pathol*. 1990;21:329–396.
- ⁸⁷ Hislop AA, Wigglesworth JS, Desai R, Aber V. The effects of preterm delivery and mechanical ventilation on human lung growth. *Early Hum Dev*. 1987;15:147–164.
- ⁸⁸ Coalson JJ, Winter V, deLemos RA. Decreased alveolarization in baboon survivors with bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152:640–646.
- ⁸⁹ Ghezzi F, Gomez R, Romero R, Yoon BH, Edwin SS, David C, Janisse J, Mazor M. Elevated interleukin-8 concentrations in amniotic fluid of mothers whose neonates subsequently develop bronchopulmonary dysplasia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1998 May;78(1):5–10.
- ⁹⁰ Watterberg KL, Demers LM, Scott SM, Murphy S. Chorioamnionitis and early lung inflammation in infants in whom bronchopulmonary dysplasia develops. *Pediatrics*. 1996;97:210–215.
- ⁹¹ Hislop AA, Pierce CM. Growth of the vascular tree. *Paediatric Respiratory Reviews*. 2000;1:321–327. doi:10.1053/prrv.2000.0071
- ⁹² Hislop AA, Reid LM. Formation of the pulmonary vasculature. In: Hodson WA (ed). *Development of the Lung Monograph*. New York: Marcel Dekker, 1977:37–86.
- ⁹³ Hall SM, Hislop AA, Pierce C, Haworth SG. Prenatal origins of human intrapulmonary arteries: formation and maturation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000;23:194–203.
- ⁹⁴ Haworth SG. Pulmonary hypertension in childhood. *Eur Respir J*. 1993;6:1037–1043.
- ⁹⁵ Morrell NW, Weiser MCM, Stenmark KR. Development of the Pulmonary Vasculature. In: Gaultier C, Bourbon JR, Post M. (eds). *Lung Development*. Oxford: Oxford University Press. 1999:152–195.
- ⁹⁶ Folkman J, D’Amore PA. Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell*. 1996;87:1153–1155.
- ⁹⁷ Dukarm RC, Steinhorn RH, Morin III FC. The normal pulmonary vascular transition at birth. *Clin Perinatol*. 1996;23:711–726.
- ⁹⁸ Abman S, Kinsella JP, Mercier J-C. Nitric oxide and endothelin in the developing pulmonary circulation: physiologic and clinical implications. In: Gaultier C, Bourbon JR, Post M (eds). *Lung Development*. Oxford: Oxford University Press. 1999;196–220.
- ⁹⁹ Hislop AA, Springall DR, BATTERY LDK, Pollock JS, Haworth SG. Abundance of endothelial nitric oxide synthase in newborn intrapulmonary arteries. *Arch Dis Child*. 1995;12:F17–F21.
- ¹⁰⁰ MacAllister RJ, Fickling SA, Whitley GStJ, Vallance P. Metabolism of methylarginines by human vasculature; implications for the regulation of nitric oxide synthesis. *Br J Pharmacol*. 1994;112:43–48.
- ¹⁰¹ Fagan KA, Fouty BW, Tyler RC, Morris Jr KG, Hepler LKSK, LeCras TD, Abman SH, Weinberger HD, Huang PL, McMurtry IF, Rodman DM. The pulmonary circulation of homozygous or heterozygous eNOS-null mice is hyperresponsive to mild hypoxia. *J Clin Invest*. 1999;103:291–299.
- ¹⁰² Noguchi Y, Hislop AA, Haworth SG. Influence of hypoxia on endothelin-1 binding sites in neonatal porcine pulmonary vasculature. *Am J Physiol*. 1997;272:H669–H678.
- ¹⁰³ Shehata SMK, Tibboel D, Sharma HS, Mooi WJ. Impaired structural remodelling of pulmonary arteries in newborns with congenital diaphragmatic hernia: a histological study of 29 cases. *J Pathol*. 1999;189:112–118.
- ¹⁰⁴ Nichols WC, Koller DL, Slovis B, Foroud T, Terry VH, Arnold ND, Siemieniak DR, Wheeler L, Phillips JAI, Newman JH, Conneally PM, Ginsburg D, Lloyd JE. Localization of the gene for familial primary pulmonary hypertension to chromosome 2q31–32. *Nat Genet*. 1997;15:277–280.
- ¹⁰⁵ Coalson JJ. Pathology of chronic lung disease of early infancy. In: Bland RD, Coalson JJ. (eds). *Chronic lung disease in early infancy*. New York: Marcel Dekker. 2000:85–124.
- ¹⁰⁶ Clark RH, Kueser TJ, Walker MW, Southgate WM, Huckaby JL, Perez JA, Roy BJ, Keszler M, Kinsella JP. Low-dose nitric oxide therapy for persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Clinical Inhaled Nitric Oxide Research Group*. *New England J Med*. 2000;342:469–474.
- ¹⁰⁷ Hilfer SR. Morphogenesis of the lung: control of embryonic and fetal branching. *Annu Rev Physiol*. 1996;58:93.

- ¹⁰⁸ Shannon JM, Deterding RR. Epithelial-mesenchymal interactions in lung development. In McDonald JA (ed): Lung Growth and Development. New York, Marcel Dekker. 1997;p. 81.
- ¹⁰⁹ Taderera JV. Control of lung differentiation in vitro. *Dev Biol.* 1976;16:489.
- ¹¹⁰ Spooner BS, Wessells NK. Mammalian lung development: interactions in primordium formation and bronchial morphogenesis. *J Exp Zool.* 1970;175:445.
- ¹¹¹ Perl A-KT, Whitsett JA. Molecular mechanisms controlling lung morphogenesis. *Clin Genet.* 1999;56:14.
- ¹¹² Kaplan F. Molecular determinants of fetal lung organogenesis. *Mol Genet Metabol.* 2000;71:321.
- ¹¹³ Cardoso WV. Molecular regulation of lung development. *Annu Rev Physiol.* 2001;63:471.
- ¹¹⁴ Ang SL, Wierda A, Wong D, Stevens KA, Cascio C, Rossant J and Zaret KS. The formation and maintenance of the definitive endoderm lineage in the mouse: involvement of HNF3/forkhead proteins. *Development.* 1993;119:1301.
- ¹¹⁵ Lai E, Clark KL, Burley SK and Darnell JE Jr. Hepatocyte nuclear factor 3 forkhead or "winged helix" proteins: a family of transcription factors of diverse biologic function. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:10421.
- ¹¹⁶ Stahlman MT, Gray ME and Whitsett JA. Temporal-spatial distribution of hepatocyte nuclear factor-3beta in developing human lung and other foregut derivatives. *J Histochem Cytochem.* 1998;46:pp. 955-962.
- ¹¹⁷ Morrissey EE, Tang Z, Sigrist K, Lu MM, Jiang F, Ip HS, Parmacek MS. GATA-6 regulates HNF-4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo. *Genes Dev.* 1998 Nov 15;12(22):3579-90.
- ¹¹⁸ Ang SL, Rossant J. HNF-3β is essential for node and notochord formation in mouse development. *Cell.* 1994;78:561.
- ¹¹⁹ Stahlman MT, Gray ME, Whitsett JA. Expression of thyroid transcription factor-1(TTF-1) in fetal and neonatal human lung. *J Histochem Cytochem.* 1996 Jul;44(7):673-8.
- ¹²⁰ Kimura S, Hara Y, Pineau T, Fernandez-Salguero P, Fox CH, Ward JM, Gonzalez FJ. The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes Dev.* 1996;10(1):60-9.
- ¹²¹ Minoo P, Su G, Drum H, Bringas P, Kimura S. Defects in tracheoesophageal and lung morphogenesis in NKx2.1 (-/-) mouse embryos. *Dev Biol.* 1999;209:60.
- ¹²² Villavicencio EH, Walterhouse DO, Iannaccone PM. The sonic hedgehog-patched-Gli pathway in human development and disease. *Am J Hum Genet.* 2000;67:1047.
- ¹²³ Litingtung Y, Lei L, Westphal H, Chiang C. Sonic hedgehog is essential for the development of the foregut. *Nature Genetics.* 1998;20:58-61. doi:10.1038/1717
- ¹²⁴ Motoyama J, Liu J, Mo R, Ding Qi, Post M, Hui C-C. Essential function of Gli2 and Gli3 in the formation of lung, trachea and oesophagus. *Nat Genet.* 1998;20:54-57.
- ¹²⁵ Min H, Danilenko DM, Scully SA, Bolon B, Ring BD, Tarpley JE, DeRose M and Simonet WS. Fgf-10 is required for both limb and lung developmental and exhibits striking functional similarity to Drosophila branchless. *Genes Dev.* 1998;12:3156. doi:10.1101/gad.12.20.3156
- ¹²⁶ Sekine K, Ohuchi H, Fujiwara M, Yamasaki M, Yoshizawa T, Sato T, Yagishita N, Matsui D, Koga Y, Itoh N, Kato S. Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nat Genet.* 1999;21:138.
- ¹²⁷ Peters K, Werner S, Liao X, Wert S, Whitsett J, Williams L. Targeted expression of a dominant negative FGF receptor blocks branching morphogenesis and epithelial differentiation of the mouse lung. *EMBO J.* 1994;13:3296.
- ¹²⁸ De Moerlooze L, Spencer-Dene B, Revest J, Hajihosseini M, Rosewell I, Dickson C. An important role for the IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in mesenchymal-epithelial signaling during mouse organogenesis. *Development.* 2000;127:483.
- ¹²⁹ Hajihosseini MK, Wilson S, De Moerlooze L, Dickson C. A splicing switch and gain-of-function mutation in Fgfr2-IIIc hemizygotes causes Apert/Pfeiffer-syndrome-like phenotypes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:3855.
- ¹³⁰ Mendelsohn C, Lohnes D, Décimo D, Lufkin T, LeMeur M, Chambon P, Mark M. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development. II. Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development.* 1994;120:2749.
- ¹³¹ Malpel S, Mendelsohn C, Cardoso WV. Regulation of retinoic acid signaling during lung morphogenesis. *Development.* 2000;127:3057.
- ¹³² Volpe MV, Vosatka RJ, Nielsen HC. Hoxb-5 control of early airway formation during branching morphogenesis in the developing mouse lung. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1475:337.
- ¹³³ Kappen C. Hox genes in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1996;15:56.
- ¹³⁴ Volpe MV, Archavachotikul K, Bhan I, Lessin MS, Nielsen HC. Association of bronchopulmonary sequestration with expression of the homeobox protein Hoxb-5. *J Pediatr Surg.* 2000;35:1817.

- ¹³⁵ Aubin J, Lemieux M, Tremblay M, Bérard J, Jeannotte L. Early postnatal lethality in *Hoxa-5* mutant mice is attributable to respiratory tract defects. *Dev Biol.* 1997;192:432.
- ¹³⁶ Moens CB, Auerbach AB, Conlon RA, Joyner AL, Rossant J. A targeted mutation reveals a role for *N-myc* in branching morphogenesis of the embryonic mouse lung. *Genes Dev.* 1992 May;6(5):691-704.
- ¹³⁷ Van Tuyl M, Post M. From fruitflies to mammals: Mechanisms of signalling via the Sonic hedgehog pathway in lung development. *Respir Res.* 2000;1:30-35.
- ¹³⁸ Chuang PT, Kawcak T, McMahon AP. Feedback control of mammalian hedgehog signaling by the hedgehog-binding protein, *Hip1*, modulates *Fgf* signaling during branching morphogenesis of the lung. *Genes Dev.* 2003;17:342-347.
- ¹³⁹ Litingtung Y, Lei L, Westphal H, Chiang C. Sonic hedgehog is essential to foregut development. *Nat Genet.* 1998;20:58-61.
- ¹⁴⁰ Miller LA, Wert SE, Whitsett JA. Immunolocalization of sonic hedgehog (*Shh*) in developing mouse lung. *J Histochem Cytochem.* 2001;49:1593-1604.
- ¹⁴¹ Bellusci S, Furuta Y, Rush MG, Henderson R, Winnier G, Hogan BL. Involvement of Sonic hedgehog (*Shh*) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis. *Development.* 1997;124:53-63.
- ¹⁴² Miller LA, Wert SE, Clark JC, Xu Y, Perl AK, Whitsett JA. Role of Sonic hedgehog in patterning of tracheal-bronchial cartilage and the peripheral lung. *Dev Dyn.* 2004;231:57-71.
- ¹⁴³ Minoo P, Su G, Drum H, Bringas P, Kimura S. Defects in tracheoesophageal and lung morphogenesis in *Nkx2.1(-/-)* mouse embryos. *Dev Biol.* 1999;209:60-71.
- ¹⁴⁴ Iwatani N, Mabe H, Devriendt K, Kodama M, Miike T. Deletion of *Nkx2.1* gene encoding thyroid transcription factor-1 in two siblings with hypothyroidism and respiratory failure. *J Pediatr.* 2000;137:272-276.
- ¹⁴⁵ Rice R, Spencer-Dene B, Connor EC, Gritli-Linde A, McMahon AP, Dickson C, Thesleff I, Rice DP. Disruption of *Fgf10/Fgfr2b*-coordinated epithelial-mesenchymal interactions causes cleft palate. *J Clin Invest.* 2004;113:1692-1700.
- ¹⁴⁶ Weaver M, Dunn NR, Hogan BL. *Bmp4* and *Fgf10* play opposing roles during lung bud morphogenesis. *Development.* 2000;127:2695-2704.
- ¹⁴⁷ Cebra-Thomas JA, Bromer J, Gardner R, Lam GK, Sheipe H, Gilbert SF. T-box gene products are required for mesenchymal induction of epithelial branching in the embryonic mouse lung. *Dev Dyn.* 2003;226:82-90.
- ¹⁴⁸ Hiroi Y, Kudoh S, Monzen K, Ikeda Y, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. *Tbx5* associates with *Nkx2-5* and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. *Nat Genet.* 2001;28:276-280.
- ¹⁴⁹ Borges M, Linnoila RI, van de Velde HJ, Chen H, Nelkin BD, Mabry M, Baylin SB, Ball DW. An achaete-scute homologue essential for neuroendocrine differentiation in the lung. *Nature.* 1997;386:852-855.
- ¹⁵⁰ Ito T, Udaka N, Yazawa T, Okudela K, Hayashi H, Sudo T, Guillemot F, Kageyama R, Kitamura H. Basic helix-loop-helix transcription factors regulate the neuroendocrine differentiation of fetal mouse pulmonary epithelium. *Development.* 2000;127:3913-3921.
- ¹⁵¹ Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: Cell fate control and signal integration in development. *Science.* 1999;284:770-776.
- ¹⁵² Kong Y, Glickman J, Subramaniam M, Shahsafaei A, Allamneni KP, Aster JC, Sklar J, Sunday ME. Functional diversity of notch family genes in fetal lung development. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;286:L1075-L1083.
- ¹⁵³ Quaggin SE, Schwartz L, Cui S, Igarashi P, Deimling J, Post M, Rossant J. The basic-helix-loop-helix protein *pod1* is critically important for kidney and lung organogenesis. *Development* 1999;126:5771-5783.
- ¹⁵⁴ Bruno MD, Bohinski RJ, Huelsman KM, Whitsett JA, Korfhagen TR. Lung cell-specific expression of the murine surfactant protein A (SP-A) gene is mediated by interactions between the SP-A promoter and thyroid transcription factor-1. *J Biol Chem.* 1995;270:6531-6536.
- ¹⁵⁵ Bohinski RJ, Di Lauro R, Whitsett JA. The lung-specific surfactant protein B gene promoter is a target for thyroid transcription factor 1 and hepatocyte nuclear factor 3, indicating common factors for organ-specific gene expression along the foregut axis. *Mol Cell Biol.* 1994;14:5671-5681.
- ¹⁵⁶ Liu C, Glasser SW, Wan H, Whitsett JA. *GATA-6* and thyroid transcription factor-1 directly interact and regulate surfactant protein-C gene expression. *J Biol Chem.* 2002;277:4519-4525.
- ¹⁵⁷ Kang S, Graham JM Jr, Olney AH, Biesecker LG. *GLI3* frameshift mutations cause autosomal dominant Pallister-Hall syndrome. *Nat Genet.* 1997;15:266.
- ¹⁵⁸ Jones KL. *Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation.* 5th ed. Philadelphia. WB Saunders Co. 1997.
- ¹⁵⁹ Cohen MM Jr, Kreiborg S. Visceral anomalies in the Apert syndrome. *Am J Med Genet.* 1993;15:45:758.

- ¹⁶⁰ Noorily MR, Farmer DL, Belenky WM, Philippart AI. Congenital tracheal anomalies in the craniosynostosis syndromes. *J Pediatr Surg.* 1999;34:1036.
- ¹⁶¹ Simonet WS, DeRose ML, Bucay N, Nguyen HQ, Wert SE, Zhou L, Ulich TR, Thomason A, Danilenko DM, Whitsett JA. Pulmonary malformation in transgenic mice expressing human keratinocyte growth factor in the lung. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:1246.
- ¹⁶² Tichelaar JW, Lim L, Costa RH, Whitsett JA. HNF-3/forkhead homologue-4 influences lung morphogenesis and respiratory epithelial cell differentiation in vivo. *Dev Biol.* 1999;213(2):405-17.
- ¹⁶³ Guo L, Degenstein L, Fuchs E. Keratinocyte growth factor is required for hair development but not for wound healing. *Genes Dev.* 1996;10:165.
- ¹⁶⁴ Colvin JS, White AC, Pratt SJ, Ornitz DM. Lung hypoplasia and neonatal death in *Fgf9*-null mice identify this gene as an essential regulator of lung mesenchyme. *Development.* 2001;128:2095.
- ¹⁶⁵ Perl A-KT, Whitsett JA. Molecular mechanisms controlling lung morphogenesis. *Clin Genet.* 1999;56:14.
- ¹⁶⁶ Kaplan F. Molecular determinants of fetal lung organogenesis. *Mol Genet Metabol.* 2000;71:321.
- ¹⁶⁷ Weaver M, Yingling JM, Dunn NR, Bellusci S, Hogan BL. BMP signaling regulates proximal-distal differentiation of endoderm in mouse lung development. *Development.* 1999;126:4005.
- ¹⁶⁸ Lu MM, Yang H, Zhang L, Shu W, Blair DG, Morrisey EE. The bone morphogenic protein antagonist gremlin regulates proximal-distal patterning of the lung. *Dev Dyn.* 2001;222:667.
- ¹⁶⁹ Shi W, Zhao J, Anderson KD, Warburton D. Gremlin negatively modulates BMP4 induction of embryonic mouse lung branching morphogenesis. *Am J Physiol.* 2001;280:L1030.
- ¹⁷⁰ Meno C, Shimono A, Saijoh Y, Yashiro K, Mochida K, Ohishi S, Noji S, Kondoh H, Hamada H. *Lefty-1* is required for left-right determination as a regulator of *lefty-2* and *nodal*. *Cell.* 1998;94:287.
- ¹⁷¹ Rankin CT, Bunton T, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of left-right patterning in mice by growth/differentiation factor-1. *Nat Genet.* 2000;24:262.
- ¹⁷² Gaio U, Schweickert A, Fischer A, Garratt AN, Müller T, Ozcelik C, Lankes W, Strehle M, Britsch S, Blum M, Birchmeier C. A role of the cryptic gene in the correct establishment of the left-right axis. *Curr Biol.* 1999;9:1339.
- ¹⁷³ Chen J, Knowles HJ, Hebert JL, Hackett BP. Mutation of the mouse hepatocyte nuclear factor/forkhead homologue 4 gene results in an absence of cilia and random left-right asymmetry. *J Clin Invest.* 1998;102:1077.
- ¹⁷⁴ Carmeliet P, Collen D. Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. *Curr Topics Microbiol Immunol.* 1999;237:133.
- ¹⁷⁵ Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller GA, Rangell L, Wright BD, Radtke F, Aguet M, Ferrara N. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development.* 1999;126:1149.
- ¹⁷⁶ Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of Flt-1 receptor kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature.* 1995;376:66.
- ¹⁷⁷ Ruhrberg C, Gerhardt H, Golding M, Watson R, Ioannidou S, Fujisawa H, Betsholtz C, Shima DT. Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev.* 2002;16:2684.
- ¹⁷⁸ Galambos C, Ng YS, Ali A, Noguchi A, Lovejoy S, D'Amore PA, DeMello DE. Defective pulmonary development in the absence of heparin-binding vascular endothelial growth factor isoforms. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002;27:194.
- ¹⁷⁹ George EL, Georges-Labouesse EN, Patel-King RS, Rayburn H, Hynes RO. Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development.* 1993;117:1079.
- ¹⁸⁰ Akeson AL, Greenberg JM, Cameron JE, Thompson FY, Brooks SK, Wiginton D, Whitsett JA. Temporal and spatial regulation of VEGF-A controls vascular patterning in the embryonic lung. *Dev Biol.* 2003;264:443-455.
- ¹⁸¹ Leuwerke SM, Kaza AK, Tribble CG, Kron IL, Laubach VE. Inhibition of compensatory lung growth in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;282:L1272-L1278.
- ¹⁸² Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:5510-5514.
- ¹⁸³ Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J.* 2002;16:1151-1162.
- ¹⁸⁴ Compennolle V, Brusselmans K, Franco D, Moorman A, Dewerchin M, Collen D, Carmeliet P. *Cardia bifida*, defective heart development and abnormal neural crest migration in embryos lacking hypoxia-inducible factor-1 α . *Cardiovasc Res.* 2003;60:569-579.
- ¹⁸⁵ Groenman F, Unger S, Post M. The Molecular Basis for Abnormal Human Lung Development. S. Karger AG, Basel. 2005; *Biol Neonate.* 2005;87(3):164-77.

- ¹⁸⁶ Schwarz MA, Zhang F, Gebb S, Starnes V, Warburton D. Endothelial monocyte activating polypeptide II inhibits lung neovascularization and airway epithelial morphogenesis. *Mech Dev.* 2000;95:123–132.
- ¹⁸⁷ Kubato Y, Kleinman HK, Martin GR, Lawley TJ. Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells in capillary-like structures. *J Cell Biol.* 1988;107:1589.
- ¹⁸⁸ Muratore CS, Nguyen HT, Ziegler MM, Wilson JM. Stretch-induced upregulation of VEGF gene expression in murine pulmonary culture: A role for angiogenesis in lung development. *J Pediatr Surg.* 2000;35:906–912; discussion 912–913.
- ¹⁸⁹ Le Cras TD, Spitzmiller RE, Albertine KH, Greenberg JM, Whitsett JA, Akeson AL. VEGF causes pulmonary hemorrhage, hemosiderosis, and air space enlargement in neonatal mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;287:L134–L142.
- ¹⁹⁰ Reynolds PR, Mucenski ML, Le Cras TD, Nichols WC, Whitsett JA. Midkine is regulated by hypoxia and causes pulmonary vascular remodeling. *J Biol Chem.* 2004;279:31124–31132.
- ¹⁹¹ Kalinichenko VV, Lim L, Stolz DB, Shin B, Rausa FM, Clark J, Whitsett JA, Watkins SC, Costa RH. Defects in pulmonary vasculature and perinatal lung hemorrhage in mice heterozygous null for the Forkhead Box fl transcription factor. *Dev Biol.* 2001;235:489–506.
- ¹⁹² Boström H, Willetts K, Pekny M, Levéen P, Lindahl P, Hedstrand H, Pekna M, Hellström M, Gebre-Medhin S, Schalling M, Nilsson M, Kurland S, Törnell J, Heath JK, Betsholtz C. PDGF-A signaling is a critical event in lung myofibroblast development and alveogenesis. *Cell.* 1996;85:863.
- ¹⁹³ Wendel DP, Taylor DG, Albertine KH, Keating MT, Li DY. Impaired distal airway development in mice lacking elastin. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000;23:320.
- ¹⁹⁴ McGowan SE, Doro MM, Jackson SK. Endogenous retinoids increase perinatal elastin gene expression in rat lung fibroblasts and fetal explants. *Am J Physiol.* 1997;273:L410.
- ¹⁹⁵ McGowan S, Jackson SK, Jenkins-Moore M, Dai HH, Chambon P, Snyder JM. Mice bearing deletions of retinoic acid receptor demonstrate reduced lung elastin and alveolar numbers. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000;23:162.
- ¹⁹⁶ Weinstein M, Xu X, Ohyama K, Deng CX. FGFR3 and FGFR4 function cooperatively to direct alveogenesis in the murine lung. *Development.* 1998;125:361.
- ¹⁹⁷ Van Tuyl M, Post M. Molecular mechanisms of lung development and lung branching morphogenesis. In: Polin RA, Fox WW, Abman SH: *Fetal and Neonatal Physiology*, pp. 812–821. Philadelphia: Saunders, 2004.
- ¹⁹⁸ Shaw-White JR, Bruno MD, Whitsett JA. GATA-6 activates transcription of thyroid transcription factor-1. *J Biol Chem.* 1999;274:2658.
- ¹⁹⁹ Bruno MD, Korfhagen TR, Liu C, Morrisey EE, Whitsett JA. GATA-6 activates transcription of surfactant protein A. *J Biol Chem.* 2000;275:1043.
- ²⁰⁰ Yang H, Lu MM, Zhang L, Whitsett JA, Morrisey EE. GATA-6 regulates differentiation of distal lung epithelium. *Development.* 2002;129:2233.
- ²⁰¹ Noguee LM, Dunbar AE 3rd, Wert SE, Askin F, Hamvas A, Whitsett JA. Mutations in the surfactant protein C (SP-C) gene associated with interstitial lung disease. *N Engl J Med.* 2001;344:573.
- ²⁰² Skandalakis JE, Gray SW, Ricketts RR. The esophagus. In Skandalakis JE, Gray SW (eds): *Embryology for Surgeons*. 2nd ed, Baltimore, Williams & Wilkins, 1994; p. 65.
- ²⁰³ Snyder JM. Regulation of Alveolarization. In: Polin RA, Fox WW, Abman SH (eds.): *Fetal and Neonatal Physiology*. Saunders, Philadelphia, pp. 794–801.
- ²⁰⁴ Weibel ER, Taylor CR. Functional design of the human lung for gas exchange. In: Fishman GP (ed.) *Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders*. McGraw-Hill, New York, 1998; pp. 21–61.
- ²⁰⁵ Spilde TL, Bhatia AM, Marosky JK, Preuett B, Kobayashi H, Hembree MJ, Prasad K, Daume E, Snyder CL, Gittes GK. Fibroblast growth factor signaling in the developing tracheoesophageal fistula. *J Pediatr Surg.* 2003;38:474–477; discussion 474–477.
- ²⁰⁶ Crisera CA, Grau JB, Maldonado TS, Kadison AS, Longaker MT, Gittes GK. Defective epithelial-mesenchymal interactions dictate the organogenesis of tracheoesophageal fistula. *Pediatr Surg Int.* 2000;16:256–261.
- ²⁰⁷ Gould SJ, Hasleton PS. Congenital abnormalities. In: Hasleton PS (cd): *Spencer's Pathology of the Lung*, 5th ed. New York. McCraw-Hill, 1996, p 57.
- ²⁰⁸ Kan SH, Elanko N, Johnson D, Cornejo-Roldan L, Cook J, Reich EW, Tomkins S, Verloes A, Twigg SR, Rannan-Eliya S, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Wall SA, Muenke M, Wilkie AO. Genomic screening of fibroblast growth-factor receptor 2 reveals a wide spectrum of mutations in patients with syndromic craniosynostosis. *Am J Hum Genet.* 2002;70:472.
- ²⁰⁹ Katzenstein A-LA. *Katzenstein and Askin's Surgical Pathology of Non-Neoplastic Lung Disease*, 3rd ed. Philadelphia, WB Saunders CO, 1997; p 361.

- ²¹⁰ Harrison MR, Sydorak RM, Farrell JA, Kitterman JA, Filly RA, Albanese CT. Fetoscopic temporary tracheal occlusion for congenital diaphragmatic hernia: Prelude to a randomized, controlled trial. *J Pediatr Surg.* 2003;38:1012–1020.
- ²¹¹ Wu J, Ge X, Verbeken EK, Gratacos E, Yesildaglar N, Deprest JA. Pulmonary effects of in utero tracheal occlusion are dependent on gestational age in a rabbit model of diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 2002;37:11–17.
- ²¹² Flecknoe S, Harding R, Maritz G, Hooper SB. Increased lung expansion alters the proportions of type I and type II alveolar epithelial cells in fetal sheep. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;278:L1180–L1185.
- ²¹³ Bin Saddiq W, Piedboeuf B, Laberge JM, Gamache M, Petrov P, Hashim E, Manika A, Chen MF, Belanger S, Piuze G. The effects of tracheal occlusion and release on type II pneumocytes in fetal lambs. *J Pediatr Surg.* 1997;32:834–838.
- ²¹⁴ Kay S, Laberge JM, Flageole H, Richardson S, Belanger S, Piedboeuf B. Use of antenatal steroids to counteract the negative effects of tracheal occlusion in the fetal lamb model. *Pediatr Res.* 2001;50:495–501.
- ²¹⁵ McCabe AJ, Carlino U, Holm BA, Glick PL. Upregulation of keratinocyte growth factor in the tracheal ligation lamb model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 2001;36:128–132.
- ²¹⁶ Nobuhara KK, DiFiore JW, Ibla JC, Siddiqui AM, Ferretti ML, Fauza DO, Schnitzer JJ, Wilson JM. Insulin-like growth factor-I gene expression in three models of accelerated lung growth. *J Pediatr Surg.* 1998;33:1057–1060.
- ²¹⁷ Quinn TM, Sylvester KG, Kitano Y, Liechty KW, Jarrett BP, Adzick NS, Flake AW. TGFbeta2 is increased after fetal tracheal occlusion. *J Pediatr Surg.* 1999;34:701–704.
- ²¹⁸ Morotti RA, Cangiarella J, Gutierrez MC, Jagirdar J, Askin F, Singh G, Profitt SA, Wert SE, Whitsett JA, Greco M. Congenital cystic adenomatoid malformation of the lung (CCAM): evaluation of the cellular components. *Hum Pathol.* 1999;30:618.
- ²¹⁹ Snyder JM. Regulation of Alveolarization. In: Polin RA, Fox WW, Abman SH (eds.): *Fetal and Neonatal Physiology.* Saunders, Philadelphia, pp. 794-801.
- ²²⁰ Weibel ER, Taylor CR. Functional design of the human lung for gas exchange. In: Fishman GP (ed.) *Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders.* McGraw-Hill, New York, 1998; pp. 21-61.
- ²²¹ Langston C, Kida K, Reed M, Thurlbeck WM. Human lung growth in late gestation and in the neonate. *Am Rev Respir Dis.* 1984;129:607-613.
- ²²² Hislop AA, Wigglesworth JS, Desai R. Alveolar development in the human fetus and infant. *Early Hum Dev.* 1986;13:1-11.
- ²²³ Husain AN, Siddiqui NH, Stocker JT. Pathology of arrested acinar development in postsurfactant bronchopulmonary dysplasia. *Hum Pathol.* 1998;27:710-717.
- ²²⁴ Jobe AH, Ikegami M. Prevention of bronchopulmonary dysplasia. *Curr Opin Pediatr.* 2001;13:124-129.
- ²²⁵ Coalson JJ, Winter V, deLemos RA. Decreased alveolarization in baboon survivors with bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;152:640-646.
- ²²⁶ Jobe AH, Ikegami M. Prevention of bronchopulmonary dysplasia. *Curr Opin Pediatr.* 2001;13:124-129.
- ²²⁷ Gilbert KA, Petrovic-Dovat L, Rannels DE. Hormonal control of compensatory lung growth. In: MacDonald JA (ed.) *Lung Growth and Development, Lung Biology In Health and Disease.* Marcel Dekker, New York. 1997;pp. 627-666.
- ²²⁸ Takeda S, Hsia CC, Wagner E, Ramanathan M, Estrera AS, Weibel ER. Compensatory alveolar growth normalizes gas-exchange function in immature dogs after pneumonectomy. *J Appl Physiol.* 1999;86:1301-1310.
- ²²⁹ Massaro D, Massaro GD. Invited Review: pulmonary alveoli: formation, “the call for oxygen.” and other regulators. *Am J Physiol.* 2002;282:1345-358.
- ²³⁰ Massaro GD, Massaro D. Postnatal treatment with retinoic acid increases the number of pulmonary alveoli in rats. *Am J Physiol.* 1996;270:L305-310.
- ²³¹ Weibel ER, Crystal RG. Structural organization of the pulmonary interstitium. In: Crystal RG: *The Lung.* Scientific Foundations. Lippincott-Raven, Philadelphia. 1997;pp. 685-695.
- ²³² Mallampalli RK, Acarregui MJ, Snyder JM. Differentiation of the alveolar epithelium in the fetal lung. In: MacDonald JE (ed.) *Lung Growth and Development.* Marcel Dekker, New York. 1997;pp. 119-162.
- ²³³ Crapo JD, Young SL, Fram EK, Pinkerton PE, Barry BE, Crapo RO. Morphometric characteristics of cells in the alveolar region of mammalian lungs. *Am Rev Respir Dis.* 1983;128:S42-46.
- ²³⁴ Frerking I, Gunther A, Seeger W, Pison U. Pulmonary surfactant: functions, abnormalities and therapeutic options. *Intensive Care Med.* 2001;27:1699-1717.
- ²³⁵ Zeltner TB, Burri PH. The postnatal development and growth of the human lung. II. Morphology. *Respir Physiol.* 1987;67:269-282.

- ²³⁶ Margraf LR, Tomashefski JF Jr, Bruce MC, Dahms BB. Morphometric analysis of the lung in bronchopulmonary dysplasia. *Am Rev Respir Dis.* 1991;143:391-400.
- ²³⁷ Bum PH, Dbaly J, Weibel ER. The postnatal growth of the rat lung. I. Morphometry. *Anat Rec.* 1974;178:711-730.
- ²³⁸ Randell SH, Mercer RR, Young SL. Neonatal hyperoxia alters the pulmonary alveolar and capillary structure of 40-day-old rats. *Am J Pathol.* 1990;136:1259-1266.
- ²³⁹ Kauffman SL. Cell proliferation in the mammalian lung. *Int Rev Exp Pathol.* 1980;22:131-191.
- ²⁴⁰ McGowan SE, Torday JS. The pulmonary lipofibroblast (lipid interstitial cell) and its contributions to alveolar development. *Annu Rev Physiol.* 1997;59:43-62.
- ²⁴¹ Kapachi Y GG. Contractile cells in pulmonary alveolar tissue. In: Crystal RG (ed.) *Scientific Foundations.* Lippincott-Raven, Philadelphia. 1997;pp. 697-707.
- ²⁴² Mariani TJ, Pierce RA. Development of lung elastic matrix. In: Gaultier C, Bourbon JR, Post M (eds.) *Lung Development.* Oxford University Press, New York. 1999;pp. 28-45.
- ²⁴³ Mercer RR, Crapo JD. Spatial distribution of collagen and elastin fibres in the lungs. *J Appl Physiol.* 1999;69:756-765.
- ²⁴⁴ Noguchi A, Firsching K, Kursar JD, Reddy R. Developmental tropoelastin synthesis by rat pulmonary fibroblasts and effects of dexamethasone. *Pediatr Res.* 1990;28:379-382.
- ²⁴⁵ Kida K, Thurlbeck WM. Lack of recovery of lung structure and function after the administration of beta-amino-propionitrile in the postnatal period. *Am Rev Respir Dis.* 1980;122:467-475.
- ²⁴⁶ Tanaka R, Al-Jamal R, Ludwig MS. Maturation changes in extracellular matrix and lung tissue mechanics. *J Appl Physiol.* 2001;91:2314-2321.
- ²⁴⁷ Sannes PI, Wang J. Basement membranes and pulmonary development. *Exp Lung Res.* 1997;23:101-108.
- ²⁴⁸ deMello DE, Sawyer D, Calvin N, Reid LM. Early fetal development of lung vasculature. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1993;16:568-581.
- ²⁴⁹ Burri PH, Tarek MR. A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. *Anat Rec.* 1990;228:35-45.
- ²⁵⁰ Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res.* 2000;55:15-35, discussion 35-16.
- ²⁵¹ Ng YS, Rohan R, Sunday ME, Demello DE, D'Amore PA. Differential expression of VEGF isoforms in mouse during development and in the adult. *Dev Dyn.* 2001;220:112-121.
- ²⁵² Zeng X, Wen SE, Federici R, Peters KG, Whitsett JA. VEGF enhances pulmonary vasculogenesis and disrupts lung morphogenesis in vivo. *Dev Dyn.* 1998;211:215-227.
- ²⁵³ Brown KR, England KM, Goss KL, Snyder JM, Acarregui MJ. VEGF induces airway epithelial cell proliferation in human fetal rat lung in vitro. *Am J Physiol.* 2001;281:L1001-1010.
- ²⁵⁴ Compennolle V, Brusselmans K, Acker T, Hoet P, Tjwa M, Beck H, Plaisance S, Dor Y, Keshet E, Lupu F, Nemery B, Dewerchin M, Van Veldhoven P, Plate K, Moons L, Collen D, Carmeliet P. Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fetal respiratory distress in premature mice. *Nat Med.* 8:702-710.
- ²⁵⁵ Kasahara Y, Tudor RM, Taraseviciene-Stewart L, Le Cras TD, Abman S, Hirth PK, Waltenberger J, Voelkel NF. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest.* 106:1311-1319.
- ²⁵⁶ Le Cras TD, Markham NE, Tudor RM, Voelkel NE, Abman SH. Treatment of newborn rats with a VEGF receptor inhibitor causes pulmonary hypertension and abnormal lung structure. *Am J Physiol.* 2002;283:L555-562.
- ²⁵⁷ Jakkula M, Le Cras TD, Gebb S, Hirth KP, Tudor RM, Voelkel NF, Abman SH. Inhibition of angiogenesis decreases alveolarization in the developing rat lung. *Am J Physiol.* 2000;279:L600-607.
- ²⁵⁸ Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:1723-1729.
- ²⁵⁹ Bhatt AJ, Pryhuber GS, Huyck H, Watkins RH, Metlay IA, Maniscalco WM. Disrupted pulmonary vasculature and decreased vascular endothelial growth factor, Flt-1, and TIE-2 in human infants dying with bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:1971-1980.
- ²⁶⁰ Albertine KH, Jones GP, Starcher BC, Bohnsack JF, Davis PL, Cho SC, Carlton DP, Bland RD. Chronic lung injury in preterm lambs: disordered respiratory tract development. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 Mar;159(3):945-58.
- ²⁶¹ D'Angi CT, Maniscalco WM. The role of vascular growth factors in hyperoxia-induced injury to the developing lung. *Front Biosci.* 2002 Jul 1;7:d1609-23. Epub 2002 Jul 1.
- ²⁶² Loughna S, Sato TN. Angiopoietin and Tie signaling pathways in vascular development. *Matrix Biol.* 2001;20:319-325.

- ²⁶³ Maniscalco WM, Watkins RH, Pryhuber GS, Bhan A, Shea C, Huyck H. Angiogenic factors and alveolar vasculature: development and alterations by injury in very premature baboons. *Am J Physiol.* 2002;282:811-823.
- ²⁶⁴ Kullander K, Klein R. Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3:475-486.
- ²⁶⁵ Neufeld G, Cohen T, Shraga N, Lange T, Kessler O, Herzog Y. The neuropillins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med.* 2002;12:13-19.
- ²⁶⁶ Ito T, Kagoshima M, Sasaki Y, Li C, Udaka N, Kitsukawa T, Fujisawa H, Taniguchi M, Yagi T, Kitamura H, Goshima Y. Repulsive axon guidance molecule *Sema3A* inhibits branching morphogenesis of fetal mouse lung. *Mech Dev.* 2000 Oct;97(1-2):35-45.
- ²⁶⁷ Betsholtz C, Karlsson L, Lindahl I. Developmental roles of platelet derived growth factors. *Bioessays.* 2001;23:494-507.
- ²⁶⁸ Han RN, Mawdsley C, Souza RT, Tanswell AK, Post M. Platelet-derived growth factors and growth-related genes in rat lung. III. Immunolocalization during fetal development. *Pediatr Res.* 1992;31:323-329.
- ²⁶⁹ Boström H, Willetts K, Pekny M, Levéen P, Lindahl P, Hedstrand H, Pekna M, Hellström M, Gebre-Medhin S, Schalling M, Nilsson M, Kurland S, Törnell J, Heath JK, Betsholtz C. PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis. *Cell.* 1996 Jun 14;85(6):863-73.
- ²⁷⁰ Boström H, Gritti-Linde A, Betsholtz C. PDGF-A/PDGF alpha-receptor signaling is required for lung growth and the formation of alveoli but not for early lung branching morphogenesis. *Dev Dyn.* 2002;223:155-162.
- ²⁷¹ Bolt RJ, van Weissenbruch MM, Lafeber HN, Delemarre-van de Waal HA. Glucoconicoids and lung development in the fetus and preterm infant. *Pediatr Pulmonol.* 2001;32:76-91.
- ²⁷² Liggins GC, Howie RN. A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics.* 1972;50:515-525.
- ²⁷³ Willet KE, McMenamin P, Pinkerton KE, Ikegami M, Jobe AH, Gurrin L, Sly PD. Lung morphometry and collagen and elastin content: changes during normal development and after prenatal hormone exposure in sheep. *Pediatr Res.* 1999 May;45(5 Pt 1):615-25.
- ²⁷⁴ Massaro D, Massaro GD. Dexamethasone accelerates postnatal alveolar wall thinning and alters wall composition. *Am J Physiol.* 1986;251:R218-224.
- ²⁷⁵ Massaro D, Teich N, Maxwell S, Massaro GD, Whitney P. Postnatal development of alveoli. Regulation and evidence for a critical period in rats. *J Clin Invest.* 1985;76:1297-1305.
- ²⁷⁶ Bunton TE, Plopper CG. Triamcinolone-induced structural alterations in the development of the lung of the fetal rhesus macaque. *Am J Obstet Gynecol.* 1984;148:203-215.
- ²⁷⁷ Muglia LJ, Bae DS, Brown TT, Vogt SK, Alvarez JG, Sunday ME, Majzoub JA. Proliferation and differentiation defects during lung development in corticotropin-releasing hormone-deficient mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999 Feb;20(2):181-8.
- ²⁷⁸ Cole TJ, Blendy JA, Monaghan AP, Kriegstein K, Schmid W, Aguzzi A, Fantuzzi G, Hummler E, Unsicker K, Schütz G. Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev.* 1995 Jul 1;9(13):1608-21.
- ²⁷⁹ Jobe AH. Pulmonary surfactant therapy. *N Engl J Med.* 1993;328:861-868.
- ²⁸⁰ Bolt RJ, van Weissenbruch MM, Lafeber HN, Delemarre-van de Waal HA. Glucoconicoids and lung development in the fetus and preterm infant. *Pediatr Pulmonol.* 2001;32:76-91
- ²⁸¹ Jobe AH. Glucocorticoids, inflammation and the perinatal lung. *Semin Neonatol.* 2001;6:331-342.
- ²⁸² Chytil E. The lungs and vitamin A. *Am J Physiol.* 1992;262:L517-527.
- ²⁸³ Chambon P. The molecular and genetic dissection of the retinoid signaling pathway. *Recent Prog Horm Res.* 1995;50:317-332.
- ²⁸⁴ Massaro GD, Massaro D, Chan WY, Clerch LB, Ghyselinck N, Chambon P, Chandraratna RA. Retinoic acid receptor-beta: an endogenous inhibitor of the perinatal formation of pulmonary alveoli. *Physiol Genomics.* 2000 Nov 9;4(1):51-7.
- ²⁸⁵ Massaro GD, Massaro D. Postnatal treatment with retinoic acid increases the number of pulmonary alveoli in rats. *Am J Physiol.* 1996;270:L305-310.
- ²⁸⁶ Massaro GD, Massaro D. Retinoic acid treatment abrogates elastase-induced pulmonary emphysema in rats. *Nat Med.* 1997;3:675-677.
- ²⁸⁷ Veness-Meehan KA, Pierce RA, Moats-Staats BM, Stiles AD. Retinoic acid attenuates O₂-induced inhibition of lung septation. *Am J Physiol.* 2002;283:L971-980.
- ²⁸⁸ McGowan S, Jackson SK, Jenkins-Moore M, Dai HH, Chambon P, Snyder JM. Mice bearing deletions of retinoic acid receptors demonstrate reduced lung elastin and alveolar numbers. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000;23:162-167.

- ²⁸⁹ McGowan SE, Doro MM, Jackson SK. Endogenous retinoids increase perinatal elastin gene expression in rat lung fibroblasts and fetal explants. *Am J Physiol.* 1997;273:L410-416.
- ²⁹⁰ McGowan SE, Harvey CS, Jackson SK. Retinoids, retinoic acid receptors, and cytoplasmic retinoid binding proteins in perinatal rat lung fibroblasts. *Am J Physiol.* 1995;269:L463-472.
- ²⁹¹ Shenai JP, Kennedy KA, Chytil F, Stahlman MT. Clinical trial of vitamin A supplementation in infants susceptible to bronchopulmonary dysplasia. *J Pediatr.* 1987;111:269-277.
- ²⁹² Kennedy KA, Stoll BJ, Ehrenkranz RA, Oh W, Wright LL, Stevenson DK, Lemons JA, Sowell A, Mele L, Tyson JE, Verter J. Vitamin A to prevent bronchopulmonary dysplasia in very-low-birth-weight infants: has the dose been too low? The MCHD Neonatal Research Network. *Early Hum Dev.* 1997 Jul 24;49(1):19-31.
- ²⁹³ Tyson JE, Wright LL, Oh W, Kennedy KA, Mele L, Ehrenkranz RA, Stoll BJ, Lemons JA, Stevenson DK, Bauer CR, Korones SB, Fanaroff AA. Vitamin A supplementation for extremely-low-birth-weight infants: National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *N Engl J Med.* 1999 Jun 24;340(25):1962-8.
- ²⁹⁴ Walter R, Gottlieb DJ, O'Connor GT. Environmental and genetic risk factors and gene-environment interactions in the pathogenesis of chronic obstructive lung disease. *Environ Health Perspect.* 2000;108 Suppl 4:733-742.
- ²⁹⁵ Mao JT, Goldin JG, Dermand J, Ibrahim G, Brown MS, Emerick A, McNitt-Gray MF, Gjertson DW, Estrada F, Tashkin DP, Roth MD. A pilot study of all-transretinoic acid for the treatment of human emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Mar 1;165(5):718-23.
- ²⁹⁶ Nielsen HC, Torday JS. Sex difference in fetal lung development. In: Mendelson CR (ed.) *Endocrinology of the Lung.* Human Press, Totowa, NJ. 2000;pp. 141-159.
- ²⁹⁷ Torday JS, Nielsen HC, Fencl M de M, Avery ME. Sex differences in fetal lung maturation. *Am Rev Respir Dis.* 1981;123:205-208.
- ²⁹⁸ Massaro GD, Mortola JP, Massaro D. Estrogen modulates the dimensions of the lung's gas-exchange surface area and alveoli in female rats. *Am J Physiol.* 1996 Jan;270(1 Pt 1):L110-4.
- ²⁹⁹ Massaro GD, Mortola JP, Massaro D. Sexual dimorphism in the architecture of the lung's gas-exchange region. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995 Feb 14;92(4):1105-7.
- ³⁰⁰ Challis JRG, Matthews SG, Gibb W, Lye SJ. Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. *Endocr Rev.* 2000;21:514-550.
- ³⁰¹ Trotter A, Maier L, Pohlandt E. Management of the extremely preterm infant: is the replacement of estradiol and progesterone beneficial? *Paediatr Drugs.* 2001;3:629-637.
- ³⁰² Gonzales-Pacheco DM, Buss WC, Koehler KM, Woodside WF, Alpert SS. Energy restriction reduces metabolic rate in adult male Fisher-344 rats. *J Nutr.* 1993;123:90-97.
- ³⁰³ Sahebajami H, Wirman JA. Emphysema-like changes in the lungs of starved rats. *Am Rev Respir Dis.* 1981;124:619-624.
- ³⁰⁴ Massaro G, Radaeva S, Clerch LB, Massaro D. Lung alveoli: endogenous programmed destruction and regeneration. *Am J Physiol.* 2002;283:L305-309.
- ³⁰⁵ Tenney SM, Remmers JE. Comparative quantitative morphology of the mammalian lung diffusing area. *Nature.* 1963;197:54-56.
- ³⁰⁶ Burri PH, Weibel ER. Morphometric estimation of pulmonary diffusion capacity. II. Effect of PO₂ on the growing lung, adaption of the growing rat lung to hypoxia and hyperoxia. *Respir Physiol.* 1971;11:247-264.
- ³⁰⁷ Randell SH, Mercer RR, Young SL. Postnatal growth of pulmonary acini and alveoli in normal and oxygen-exposed rats studied by serial section reconstructions. *Am J Anat.* 1989;186:55-68.
- ³⁰⁸ Maniscalco WM, Watkins RH, D'Angio CT, Ryan RM. Hyperoxic injury decreases alveolar epithelial cell expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in neonatal rabbit lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997;16:557-567.
- ³⁰⁹ McGrath-Morrow SA, Stahl J. Apoptosis in neonatal murine lung exposed to hyperoxia. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;25:150-155.
- ³¹⁰ Massaro GD, Olivier J, Dzikowski C, Massaro D. Postnatal development of lung alveoli: suppression by 13% O₂ and a critical period. *Am J Physiol.* 1990;258:L321-327.
- ³¹¹ Clark RH, Gerstmann DR, Jobe AH, Moffitt ST, Slutsky AS, Yoder BA. Lung injury in neonates: causes, strategies for prevention, and long-term consequences. *J Pediatr.* 2001;139:478-486.
- ³¹² Lyon A. Chronic lung disease of prematurity: the role of intra-uterine infection. *Eur J Pediatr.* 2000;159: 798-802.
- ³¹³ Parks WC, Shapiro SD. Matrix metalloproteinases in lung biology. *Respir Res.* 2001;2:10-19.
- ³¹⁴ Crouch E, Wright JR. Surfactant proteins A and D and pulmonary host defense. *Annu Rev Physiol.* 2001;63:521-554.

- ³¹⁵ Wert SE, Yoshida M, LeVine AM, Ikegami M, Jones T, Ross GF, Fisher JH, Korfhagen TR, Whitsett JA. Increased metalloproteinase activity, oxidant production, and emphysema in surfactant protein D gene-inactivated mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000 May 23;97(11):5972-7.
- ³¹⁶ Jeffery PK. Lymphocytes, chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease. *Novartis Found Symp*. 2001;234:149-161.
- ³¹⁷ Massaro D, Teich N, Massaro GD. Postnatal development of pulmonary alveoli: modulation in rats by thyroid hormones. *Am J Physiol*. 1986;250:R51-55.
- ³¹⁸ Ware LB, Manhay MA. Keratinocyte and hepatocyte growth factors in the lung: roles in lung development, inflammation, and repair. *Am J Physiol*. 2002;282:L924-940.
- ³¹⁹ Weinstein M, Xu X, Ohyama K, Deng CX. FGFR-3 and FGFR-4 function cooperatively to direct alveogenesis in the murine lung. *Development*. 1998;125:3615-3623.
- ³²⁰ Costa RH, Kalinichenko W, Lim L. Transcription factors in mouse lung development and function. *Am J Physiol*. 2001;280:L823-838.
- ³²¹ Harrison MR, Langer JC, Adzick NS, Golbus MS, Filly RA, Anderson RL, Rosen MA, Callen PW, Goldstein RB, deLorimier AA. Correction of congenital diaphragmatic hernia in utero, V. Initial clinical experience. *J Pediatr Surg*. 1990 Jan;25(1):47-55;discussion 56-7.
- ³²² Keijzer R, Liu J, Deimling J, Tibboel D, Post M. Dual-hit hypothesis explains pulmonary hypoplasia in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia. *Am J Pathol*. 2000;156:1299-1306.
- ³²³ Davenport M. Diaphragmatic hernia. In: Rennie JM, Robertson NRC (eds): *Textbook of Neonatology*. Edinburgh, Churchill Livingstone. 1999;pp. 654-661.
- ³²⁴ Chang R, Andreoli S, Ng YS, Truong T, Smith SR, Wilson J, D'Amore PA. VEGF expression is downregulated in nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*. 2004;39:825-828;discussion 825-828.
- ³²⁵ Teramoto H, Yoneda A, Puri P. Gene expression of fibroblast growth factors 10 and 7 is downregulated in the lung of nitrofen-induced diaphragmatic hernia in rats. *J Pediatr Surg*. 2003;38:1021-1024.
- ³²⁶ Unger S, Copland I, Tibboel D, Post M. Down-regulation of sonic hedgehog expression in pulmonary hypoplasia is associated with congenital diaphragmatic hernia. *Am J Pathol*. 2003;162:547-555.
- ³²⁷ Leinwand MJ, Zhao J, Tefft JD, Anderson KD, Warburton D. Murine nitrofen-induced pulmonary hypoplasia does not involve induction of TGF-beta signaling. *J Pediatr Surg*. 2002;37:1123-1127.
- ³²⁸ Guarino N, Solari V, Shima H, Puri P. Upregulated expression of EGF and TGF-alpha in the proximal respiratory epithelium in the human hypoplastic lung in congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int*. 2004;19:755-759.
- ³²⁹ Babiuk RP, Thebaud B, Greer JJ. Reductions in the incidence of nitrofen-induced diaphragmatic hernia by vitamin A and retinoic acid. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;286:L970-L973.
- ³³⁰ Greer JJ, Babiuk RP, Thebaud B. Etiology of congenital diaphragmatic hernia: The retinoid hypothesis. *Pediatr Res*. 2003;53:726-730.
- ³³¹ Chinoy MR, Nielsen HC, Volpe MV. Mesenchymal nuclear transcription factors in nitrofen-induced hypoplastic lung. *J Surg Res*. 2002;108:203-211.
- ³³² Solari V, Puri P. Glucocorticoid receptor gene expression in the hypoplastic lung of newborns with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*. 2002;37:715-718.
- ³³³ Hosgor M, Ijzendoorn Y, Mooi WJ, Tibboel D, De Krijger RR. Thyroid transcription factor-1 expression during normal human lung development and in patients with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*. 2002;37:1258-1262.
- ³³⁴ Doné E, Gucciardo L, Van Mieghem T, Jani J, Cannie M, Van Schoubroeck D, Devlieger R, Catte LD, Klaritsch P, Mayer S, Beck V, Debeer A, Gratacos E, Nicolaidis K, Deprest J. Prenatal diagnosis, prediction of outcome and in utero therapy of isolated congenital diaphragmatic hernia. *Prenat Diagn*. 2008 Jul;28(7):581-91.
- ³³⁵ Skari H, Bjornland K, Haugen G, Egeland T, Emblem R. Congenital Diaphragmatic Hernia: a meta-analysis of mortality factors. *J Pediatr Surg*. 2000 Aug;35(8):1187-97.
- ³³⁶ Graham G, Devine PC. Antenatal diagnosis of Congenital Diaphragmatic Hernia. *Semin Perinatol*. 2005;29:69-76.
- ³³⁷ Deprest J, Jani J, Cannie M, Van Schoubroeck D, Verbeke E, Devlieger H, Dymarkowski S. Progress in intra-uterine assessment of the fetal lung and prediction of neonatal function. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2005;25:108-111.
- ³³⁸ Jani J, Keller RL, Benachi A, Nicolaidis KH, Favre R, Gratacos E, Laudy J, Eisenberg V, Eggink A, Vaast P, Deprest J. Antenatal-CDH-Registry Group. Prenatal prediction of survival in isolated left-sided diaphragmatic hernia. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2006 Jan;27(1):18-22.

- ³³⁹ Metkus AP, Filly RA, Stringer MD, Harrison MR, Adzick NS. Sonographic predictors of survival in fetal diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 1996;31:148–152.
- ³⁴⁰ Cannie M, Jani J, Dymarkowski S, Deprest J. Fetal MRI: luxury or necessity? *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2006;27:471–476.
- ³⁴¹ Jani J, Nicolaidis KH, Benachi A, Moreno O, Favre R, Gratacos E, Deprest J. Timing of lung size assessment using the observed to expected lung area to head circumference ratio in the prediction of postnatal survival in fetuses with isolated diaphragmatic hernia. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008;31:37–40.
- ³⁴² Jani J, Nicolaidis KH, Keller RL, Benachi A, Peralta CF, Favre R, Moreno O, Tibboel D, Lipitz S, Eggink A, Vaast P, Allegaert K, Harrison M, Deprest J. Antenatal-CDH-Registry Group. Observed to expected lung area to head circumference ratio in the prediction of survival in fetuses with isolated diaphragmatic hernia. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007 Jul;30(1):67-71.
- ³⁴³ Moya FR, Lally KP. Evidence based management of infants with Congenital Diaphragmatic Hernia. *Semin Perinatol.* 2005;29:112–117.
- ³⁴⁴ Boloker J, Bateman D, Wung J, Stolar C. Congenital diaphragmatic hernia in 120 infants treated consecutively with permissive hypercapnea/spontaneous respiration/elective repair. *J Pediatr Surg.* 2002;37:357–366.
- ³⁴⁵ Smith NP, Jesudason EC, Featherstone NC, Corbett HJ, Losty PD. Recent advances in congenital diaphragmatic hernia. *Arch Dis Child.* 2005 Apr;90(4):426-8
- ³⁴⁶ Kinsella J, Parker T, Dunbar I, Abman S. Noninvasive delivery of inhaled nitric oxide therapy for late pulmonary hypertension in newborn infants with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr.* 2003;142:397–401.
- ³⁴⁷ Kinsella J, Dunbar I, Abman S. Pulmonary vasodilator therapy in congenital diaphragmatic hernia: acute, late, and chronic pulmonary hypertension. *Semin Perinatol.* 2005;29:123–128.
- ³⁴⁸ Van Meurs and Congenital Diaphragmatic Hernia Study Group. Is surfactant therapy beneficial in the treatment of the term newborn infant with congenital diaphragmatic hernia? *J Pediatr.* 2004;145:312–316.
- ³⁴⁹ Tonks A, Wylides M, Somerset DA, Dent K, Abhyankar A, Bagchi I, Lander A, Roberts E, Kilby MD. Congenital malformations of the diaphragm: findings of the West Midlands Congenital Anomaly Register 1995 to 2000. *Prenat Diagn.* 2004 Aug;24(8):596-604.
- ³⁵⁰ Javid P, Jaksic T, Skarsgard E, Lee S. Canadian Neonatal Network. Survival rate in congenital diaphragmatic hernia: the experience of the Canadian Neonatal Network. *J Pediatr Surg.* 2004;39:657–660.
- ³⁵¹ Sartoris J, Varnholt V, Dahlheim D, Schaible T. CDH in Mannheim—algorithm and results. *Monatsschr Kinderheilkd.* 2006;153:717.
- ³⁵² Muratore CS, Kharasch V, Lund DP, Sheils C, Friedman S, Brown C, Utter S, Jaksic T, Wilson JM. Pulmonary morbidity in 100 survivors of congenital diaphragmatic hernia monitored in a multidisciplinary clinic. *J Pediatr Surg.* 2001 Jan;36(1):133-40.
- ³⁵³ West S, Wilson J. Follow up of infants with congenital diaphragmatic hernia. *Semin Perinatol.* 2005;29:129–133.
- ³⁵⁴ Sokol J, Bohn D, Lacro RV, Ryan G, Stephens D, Rabinovitch M, Smallhorn J, Hornberger LK. Fetal pulmonary artery diameters and their association with lung hypoplasia and postnatal outcome in congenital diaphragmatic hernia. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;186:1085–1090.
- ³⁵⁵ Sokol J, Shimizu N, Bohn D, Dohert D, Ryan G, Hornberger LK. Fetal pulmonary artery diameter measurements as a predictor of morbidity in antenatally diagnosed congenital diaphragmatic hernia: a prospective study. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;195:470–477.
- ³⁵⁶ Ruano R, de Fatima Yukie Maeda M, Ikeda Niigaki J, Zugaib M. Pulmonary artery diameters in healthy fetuses from 19–40 weeks gestation. *J Ultrasound Med.* 2007;26:309–316.
- ³⁵⁷ Broth RE, Wood DC, Rasanen J, Sabogal JC, Komwilaisak R, Weiner S, Berghella V. Prediction of lethal pulmonary hypoplasia: the hyperoxygenation test for pulmonary artery reactivity. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;187:940–945.
- ³⁵⁸ Doné E, Jani J, Van Schoubroeck D, Debeer A, Deprest J. Maternal hyperoxygenation test in fetuses with prenatally treated severe diaphragmatic hernia: longitudinal observation study. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;195:45.
- ³⁵⁹ DiFiore JW, Fauza DO, Slavin R, Peters CA, Fackler JC, Wilson JM. Experimental fetal tracheal ligation reverses the structural and physiological effects of pulmonary hypoplasia in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 1994;29:248–256; discussion: 256–257.
- ³⁶⁰ Flageole H, Evrard VA, Piedboeuf B, Laberge JM, Lerut TE, Deprest JA. The plug-unplug sequence: an important step to achieve type II pneumocyte maturation in the fetal lamb model. *J Pediatr Surg.* 1998 Feb;33(2):299-303.

- ³⁶¹ Deprest J, Jani J, Gratacos E, Nicolaides K, The FETO Task Group, Nelson S. Deliberately delayed and shortened fetoscopic tracheal occlusion—a different strategy after prenatal diagnosis of life-threatening congenital diaphragmatic hernias. *J Pediatr Surg.* 2006;41:1345–1346.
- ³⁶² Flake A, Crombleholme T, Johnson M, Howell L, Adzick NS. Treatment of severe congenital diaphragmatic hernia by fetal tracheal occlusion: clinical experience with fifteen cases. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;183:1059–1066.
- ³⁶³ Deprest J, Gratacos E, Nicolaides KH. Fetoscopic tracheal occlusion (FETO) for severe congenital diaphragmatic hernia: evolution of a technique and preliminary results. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2004;24:121–126.
- ³⁶⁴ Deprest JA, Evrard VA, Van Ballaer PP, Verbeken E, Vandenberghe K, Lerut TE, Flageole H. Tracheoscopic endoluminal plugging using an inflatable device in the fetal lamb model. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1998;81:165–169.
- ³⁶⁵ Jani JC, Nicolaides KH, Gratacós E, Vandecruys H, Deprest JA; FETO Task Group. Fetal lung-to-head ratio in the prediction of survival in severe left-sided diaphragmatic hernia treated by fetal endoscopic tracheal occlusion (FETO). *Am J Obstet Gynecol.* 2006;195:1646–1650.
- ³⁶⁶ Peralta CF, Jani J, Van Schoubroeck D, Nicolaides KH, Deprest JA. Fetal lung volume after endoscopic tracheal occlusion in the prediction of postnatal outcome. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;198(1):60.e1-5.
- ³⁶⁷ Khan PA, Cloutier M, Piedboeuf B. Tracheal occlusion: A review of obstructing fetal lungs to make them grow and mature. *Am J Med Genet. Part C Semin Med Genet.* 2007;145C:125–138.
- ³⁶⁸ Adzick NS, Harrison MR, Glick PL, Villa RL, Finkbeiner W. Experimental pulmonary hypoplasia and oligohydramnios: Relative contributions of lung fluid and fetal breathing movements. *J Pediatr Surg.* 1984;19:658–665.
- ³⁶⁹ Hedrick MH, Ferro MM, Filly RA, Flake AW, Harrison MR, Adzick NS. Congenital high airway obstruction syndrome (CHAOS): A potential for perinatal intervention. *J Pediatr Surg.* 1994;29:271–274.
- ³⁷⁰ Olver RE, Walters DV, Wilson SM. Developmental regulation of lung liquid transport. *Annu Rev Physiol.* 2004;66:77–101.
- ³⁷¹ Hedrick MH, Estes JM, Sullivan KM, Bealer JF, Kitterman JA, Flake AW, Adzick NS, Harrison MR. Plug the lung until it grows (PLUG): A new method to treat congenital diaphragmatic hernia in utero. *J Pediatr Surg.* 1994;29:612–617.
- ³⁷² Wilson JM, DiFiore JW, Peters CA. Experimental fetal tracheal ligation prevents the pulmonary hypoplasia associated with fetal nephrectomy: Possible application for congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 1993;28:1433–1439; discussion: 1439–1440.
- ³⁷³ Carmel JA, Friedman F, Adams FH. Fetal tracheal ligation and lung development. *Am J Dis Child.* 1965;109:452–456.
- ³⁷⁴ De Paepe ME, Johnson BD, Papadakis K, Luks FI. Lung growth response after tracheal occlusion in fetal rabbits is gestational agedependent. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999;21:65–76.
- ³⁷⁵ Maltais F, Seaborn T, Guay S, Piedboeuf B. In vivo tracheal occlusion in fetal mice induces rapid lung development without affecting surfactant protein C expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003;284:L622–632.
- ³⁷⁶ Ten Have-Opbroek AA. Lung development in the mouse embryo. *Exp Lung Res.* 1991;17:111–130.
- ³⁷⁷ Hooper SB, Wallace MJ. Role of the physicochemical environment in lung development. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006;33:273–279.
- ³⁷⁸ Benachi A, Chailley-Heu B, Delezoide AL, Dommergues M, Brunelle F, Dumez Y, Bourbon JR. Lung growth and maturation after tracheal occlusion in diaphragmatic hernia. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:921–927.
- ³⁷⁹ Davey MG, Hooper SB, Tester ML, Johns DP, Harding R. Respiratory function in lambs after in utero treatment of lung hypoplasia by tracheal obstruction. *J Appl Physiol.* 1999;87:2296–2304.
- ³⁸⁰ Deprest JA, Evrard VA, Verbeken EK, Perales AJ, Delaere PR, Lerut TE, Flageole H. Tracheal side effects of endoscopic balloon tracheal occlusion in the fetal lamb model. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2000;92:119–126.
- ³⁸¹ Piedboeuf B, Laberge JM, Ghitulescu G, Gamache M, Petrov P, Belanger S, Chen MF, Hashim E, Possmayer F. Deleterious effect of tracheal obstruction on type II pneumocytes in fetal sheep. *Pediatr Res.* 1997;41:473–479.
- ³⁸² Bin Saddiq W, Piedboeuf B, Laberge JM, Gamache M, Petrov P, Hashim E, Manika A, Chen MF, Belanger S, Piuze G. The effects of tracheal occlusion and release on type II pneumocytes in fetal lambs. *J Pediatr Surg.* 1997;32:834–838.
- ³⁸³ Kay S, Laberge JM, Flageole H, Richardson S, Belanger S, Piedboeuf B. Use of antenatal steroids to counteract the negative effects of tracheal occlusion in the fetal lamb model. *Pediatr Res.* 2001;50: 495–501.

- ³⁸⁴ Nobuhara KK, DiFiore JW, Ibla JC, Siddiqui AM, Ferretti ML, Fauza DO, Schnitzer JJ, Wilson JM. Insulin-like growth factor-I gene expression in three models of accelerated lung growth. *J Pediatr Surg.* 1998;33:1057–1060; discussion: 1061.
- ³⁸⁵ Quinn TM, Sylvester KG, Kitano Y, Liechty KW, Jarrett BP, Adzick NS, Flake AW. TGF-beta2 is increased after fetal tracheal occlusion. *J Pediatr Surg.* 1999;34:701-704; discussion: 704–705.
- ³⁸⁶ Gillett AM, Wallace MJ, Gillespie MT, Hooper SB. Increased expansion of the lung stimulates calmodulin 2 expression in fetal sheep. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;282:L440–447.
- ³⁸⁷ Filby CE, Hooper SB, Sozo F, Zahra VA, Flecknoe SJ, Wallace MJ. VDU P1: A potential mediator of expansion-induced lung growth and epithelial cell differentiation in the ovine fetus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006;290:L250–258.
- ³⁸⁸ Alcorn D, Adamson TM, Lambert TF, Maloney JE, Ritchie BC, Robinson PM. Morphological effects of chronic tracheal ligation and drainage in the fetal lamb lung. *J Anat.* 1977;123:649–660.
- ³⁸⁹ Bratu I, Flageole H, Laberge JM, Chen MF, Piedboeuf B. Pulmonary structural maturation and pulmonary artery remodeling after reversible fetal ovine tracheal occlusion in diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 2001;36:739–744.
- ³⁹⁰ Cloutier M, Seaborn T, Piedboeuf B, Bratu I, Flageole H, Laberge JM. Effect of temporary tracheal occlusion on the endothelin system in experimental cases of diaphragmatic hernia. *Exp Lung Res.* 2005;31:391–404.
- ³⁹¹ Bratu I, Flageole H, Laberge JM, Possmayer F, Harbottle R, Kay S, Khalife S, Piedboeuf B. Surfactant levels after reversible tracheal occlusion and prenatal steroids in experimental diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 2001;36:122–127.
- ³⁹² Danzer E, Robinson LE, Davey MG, Schwarz U, Volpe M, Adzick NS, Flake AW, Hedrick HL. Tracheal occlusion in fetal rats alters expression of mesenchymal nuclear transcription factors without affecting surfactant protein expression. *J Pediatr Surg.* 2006;41:774–780.
- ³⁹³ Nelson SM, Hajivassiliou CA, Haddock G, Cameron AD, Robertson L, Olver RE, Hume R. Rescue of the hypoplastic lung by prenatal cyclical strain. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171:1395–1402.
- ³⁹⁴ Hashim E, Laberge JM, Chen MF, Quillen EW Jr. Reversible tracheal obstruction in the fetal sheep: Effects on tracheal fluid pressure and lung growth. *J Pediatr Surg.* 1995;30:1172–1177.
- ³⁹⁵ VanderWall KJ, Bruch SW, Meuli M, Kohl T, Szabo Z, Adzick NS, Harrison MR. Fetal endoscopic (‘Fetendo’) tracheal clip. *J Pediatr Surg.* 1996;31:1101–1103; discussion: 1103–1104.
- ³⁹⁶ Flageole H, Evrard VA, Vandenberghe K, Lerut TE, Deprest JA. Tracheoscopic endotracheal occlusion in the ovine model: Technique and pulmonary effects. *J Pediatr Surg.* 1997;32:1328–1331.
- ³⁹⁷ David AL, Weisz B, Gregory L, Themis M, Cook T, Roubliova X, Deprest J, Coutelle C, Rodeck CH, Peebles DM. Ultrasound-guided injection and occlusion of the trachea in fetal sheep. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2006;28:82–88.
- ³⁹⁸ Muensterer OJ, Flemmer AW, Bergmann F, Hajek KS, Lu HQ, Simbruner G, Deprest JA, Till H. Postnatal lung mechanics, lung composition, and surfactant synthesis after tracheal occlusion vs. prenatal intrapulmonary instillation of perfluorocarbon in fetal rabbits. *J Pediatr Surg.* 2005;40:26–31.
- ³⁹⁹ Muensterer OJ, Till H, Bergmann F, Klis VJ, Metzger R, Deprest JA, Simbruner G. Lung growth induced by prenatal instillation of perfluorocarbon into the fetal rabbit lung. *Pediatr Surg Int.* 2004;20:248–252.
- ⁴⁰⁰ De Paepe ME, Sardesai MP, Johnson BD, Lesieur-Brooks AM, Papadakis K, Luks FI. The role of apoptosis in normal and accelerated lung development in fetal rabbits. *J Pediatr Surg.* 1999;34:863–870; discussion: 870–871.
- ⁴⁰¹ Hail N Jr, Kim HJ, Lotan R. Mechanisms of fenretinide-induced apoptosis. *Apoptosis.* 2006;11:1677–1694.
- ⁴⁰² De Paepe ME, Mao Q, Luks FI. Expression of apoptosis-related genes after fetal tracheal occlusion in rabbits. *J Pediatr Surg.* 2004;39:1616–1625.
- ⁴⁰³ Chapin CJ, Ertsey R, Yoshizawa J, Hara A, Sbragia L, Greer JJ, Kitterman JA. Congenital diaphragmatic hernia, tracheal occlusion, thyroid transcription factor-1, and fetal pulmonary epithelial maturation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005;289:L44–52.
- ⁴⁰⁴ Kitano Y, Davies P, von Allmen D, Adzick NS, Flake AW. Fetal tracheal occlusion in the rat model of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *J Appl Physiol.* 1999;87:769–775.
- ⁴⁰⁵ Kitano Y, Von Allmen D, Kanai M, Quinn TM, Davies P, Flake AW. Fetal lung growth after short-term tracheal occlusion is linearly related to intratracheal pressure. *J Appl Physiol.* 2001;90:493–500.
- ⁴⁰⁶ Yoshizawa J, Chapin CJ, Sbragia L, Ertsey R, Gutierrez JA, Albanese CT, Kitterman JA. Tracheal occlusion stimulates cell cycle progression and type I cell differentiation in lungs of fetal rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003;285:L344–353.
- ⁴⁰⁷ Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science.* 1997;277:48–50.
- ⁴⁰⁸ Beck L Jr, D’Amore PA. Vascular development: Cellular and molecular regulation.

FASEB J. 1997;11:365–373.

⁴⁰⁹ Pauling MH, Vu TH. Mechanisms and regulation of lung vascular development.

Curr Top Dev Biol. 2004;64:73–99.

⁴¹⁰ Mitzner W, Wagner EM. Vascular remodeling in the circulations of the lung.

J Appl Physiol. 2004 Nov;97(5):1999–2004.

⁴¹¹ Papaioannou AI, Kostikas K, Kollia P, Gourgoulanis KI. Clinical implications for vascular endothelial growth factor in the lung: friend or foe? *Respir Res.* 2006 Oct 17;7:128.

⁴¹² Hara A, Chapin CJ, Ertsey R, Kitterman JA. Changes in fetal lung distension alter expression of vascular endothelial growth factor and its isoforms in developing rat lung. *Pediatr Res.* 2005;58:30–37.

⁴¹³ Acarregui MJ, Penisten ST, Goss KL, Ramirez K, Snyder JM. Vascular endothelial growth factor gene expression in human fetal lung in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999;20:14–23.

⁴¹⁴ Kumar VH, Ryan RM. Growth factors in the fetal and neonatal lung.

Front Biosci. 2004 Jan 1;9:464–80.

⁴¹⁵ Jung YJ, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Neckers L. IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis.

FASEB J. 2003;17:2115–2117.

⁴¹⁶ Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 1992;359:843–845.

⁴¹⁷ Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O’Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature.* 1996;380:439–442.

⁴¹⁸ Shalaby F, Ho J, Stanford WL, Fischer KD, Schuh AC, Schwartz L, Bernstein A, Rossant J. A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell.* 1997;89:981–990.

⁴¹⁹ Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature.* 1995;376:66–70.

⁴²⁰ Le Cras TD, Markham NE, Tudor RM, Voelkel NF, Abman SH. Treatment of newborn rats with a VEGF receptor inhibitor causes pulmonary hypertension and abnormal lung structure.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2002;283:L555–562.

⁴²¹ Muratore CS, Kharasch V, Lund DP, Sheils C, Friedman S, Brown C, Utter S, Jaksic T, Wilson JM. Pulmonary morbidity in 100 survivors of congenital diaphragmatic hernia monitored in a multidisciplinary clinic. *J Pediatr Surg.* 2001;36:133–140.

⁴²² Luks FI, Wild YK, Piasecki GJ, De Paepe ME. Short-term tracheal occlusion corrects pulmonary vascular anomalies in the fetal lamb with diaphragmatic hernia. *Surgery.* 2000;128:266–272.

⁴²³ Roubliova X, Verbeken E, Wu J, Yamamoto H, Lerut T, Tibboel D, Deprest J. Pulmonary vascular morphology in a fetal rabbit model for congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 2004;39:1066–1072.

⁴²⁴ Yamataka T, Puri P. Active collagen synthesis by pulmonary arteries in pulmonary hypertension complicated by congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 1997;32:682–687.

⁴²⁵ Uhal BD. Cell cycle kinetics in the alveolar epithelium. *Am J Physiol.* 1997;272:L1031–1045.

⁴²⁶ Torday JS, Torres E, Rehan VK. The role of fibroblast transdifferentiation in lung epithelial cell proliferation, differentiation, and repair in vitro. *Pediatr Pathol Mol Med.* 2003;22:189–207.

⁴²⁷ Roth-Kleiner M, Post M. Similarities and dissimilarities of branching and septation during lung development. *Pediatr Pulmonol.* 2005;40:113–134.

⁴²⁸ Barr M Jr. The teratogenicity of cadmium chloride in two stocks of Wistar rats. *Teratology.* 1993;7:237–242.

⁴²⁹ Gosche JR, Islam S, Boulanger SC. Congenital diaphragmatic hernia: Searching for answers.

Am J Surg. 2005;190:324–332.

⁴³⁰ Solomon HM, Wier PJ, Johnson CM, Posobiec LM, Rendemonti JE, Rumberger DF. Benzofuranyl ureas with potent cardiovascular teratogenicity in rats. *Teratology.* 2000;61:211–221.

⁴³¹ Nieves D, Moreno JJ. Hydroxyeicosatetraenoic acids released through the cytochrome P-450 pathway regulate 3T6 fibroblast growth. *J Lipid Res.* 2006;47:2681–2689.

⁴³² Moncada S, Vane JR. Unstable metabolites of arachidonic acid and their role in haemostasis and thrombosis. *Br Med Bull.* 1978;34:129–135.

⁴³³ Sutherland MF, Parkinson MM, Hallett P. Teratogenicity of three substituted 4-biphenyls in the rat as a result of the chemical breakdown and possible metabolism of a thromboxane A2-receptor blocker.

Teratology. 1989;39:537–545.

⁴³⁴ Cappon GD, Cook JC, Hurtt ME. Relationship between cyclooxygenase 1 and 2 selective inhibitors and fetal development when administered to rats and rabbits during the sensitive periods for heart development and midline closure. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2003;68:47–56.

- ⁴³⁵ Reixach N, Adamski-Werner SL, Kelly JW, Koziol J, Buxbaum JN. Cell based screening of inhibitors of transthyretin aggregation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;348:889–897.
- ⁴³⁶ Cappon GD, Fleeman TL, Cook JC, Hurtt ME. Combined treatment potentiates the developmental toxicity of ibuprofen and acetazolamide in rats. *Drug Chem Toxicol.* 2005;28:409–421.
- ⁴³⁷ Rordorf CM, Choi L, Marshall P, Mangold JB. Clinical pharmacology of lumiracoxib: A selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44:1247–1266.
- ⁴³⁸ Lin IC, Ko SF, Shieh CS, Huang CF, Chien SJ, Liang CD. Recurrent congenital diaphragmatic hernia in Ehlers-Danlos syndrome. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2006;29:920–923.
- ⁴³⁹ Harding R, Hooper SB. Physiological Mechanisms of Normal and Altered Lung Growth. In: Polin RA, Fox WW, Abman SH: *Fetal and Neonatal Physiology.* Saunders; 2nd Edition. 1998 January 15.
- ⁴⁴⁰ Strang LB. Fetal lung liquid: secretion and reabsorption. *Physiol Rev.* 1991;71:991.
- ⁴⁴¹ Harding R, Hooper SB. Regulation of lung expansion and lung growth before birth. *J Appl Physiol.* 1996;81:209.
- ⁴⁴² Hooper SB, Harding R. Fetal lung liquid: a major determinant of the growth and functional development of the fetal lung. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1995;22:235.
- ⁴⁴³ Harding R, Sigger JN, Wickham PJ, Bocking AD. The regulation of flow of pulmonary fluid in fetal sheep. *Respir Physiol.* 1984 Jul;57(1):47-59.
- ⁴⁴⁴ Cassin S, Perks AM. Estimation of lung liquid production in fetal sheep with blue dye dextran and radioiodinated serum albumin. *J Appl Physiol.* 2002;92:1531.
- ⁴⁴⁵ Davey MG, Johns DP, Harding R. Postnatal development of respiratory function in lambs studied serially between birth and 8 weeks. *Respir Physiol.* 1998;113:83.
- ⁴⁴⁶ Miller AA, Hooper SB, and Harding R. Role of fetal breathing movements in control of fetal lung distension. *J Appl Physiol.* 1993;75:2711.
- ⁴⁴⁷ Harding R, Hooper SB, Dickson KA. A mechanism leading to reduced lung expansion and lung hypoplasia in fetal sheep during oligohydramnios. *Am J Obstet Gynecol.* 1990;163:1904.
- ⁴⁴⁸ Hooper SB, Dickson KA, Harding R. Lung liquid secretion, flow and volume in response to moderate asphyxia in fetal sheep. *J Dev Physiol.* 1988;10:473.
- ⁴⁴⁹ Harding R, Bocking AD, Sigger JN. Influence of upper respiratory tract on liquid flow to and from fetal lungs. *J Appl Physiol.* 1986;61:68.
- ⁴⁵⁰ Vilos GA, Liggins GC. Intrathoracic pressures in fetal sheep. *J Dev Physiol.* 1982;4:247.
- ⁴⁵¹ Harding R, Bocking AD, Sigger JN. Upper airway resistance in fetal sheep: the influence of breathing activity. *J Appl Physiol.* 1986 Jan;60(1):160-5.
- ⁴⁵² Dickson KA, Maloney JE, Berger PJ. State-related changes in lung liquid secretion and tracheal flow rate in fetal lambs. *J Appl Physiol.* 1987;62:34.
- ⁴⁵³ Adamson TM, Boyd RD, Platt HS, Strang LB. Composition of alveolar liquid in foetal lamb. *J Physiol.* 1969 Sep;204(1):159-68.
- ⁴⁵⁴ Harding R, Hooper SB, Han VK. Abolition of fetal breathing movements by spinal cord transection leads to reductions in fetal lung liquid volume, lung growth and IGF-II gene expression. *Pediatr Res.* 1993;34:148.
- ⁴⁵⁵ Nardo L, Hooper SB, Harding R. Lung hypoplasia can be reserved by short-term obstruction of the trachea in fetal sheep. *Pediatr Res.* 1995;38:690.
- ⁴⁵⁶ Hooper SB, Han VK, Harding R. Changes in lung expansion alter pulmonary DNA synthesis and IGF-II gene expression in fetal sheep. *Am J Physiol.* 1993;265:L403.
- ⁴⁵⁷ Alcorn D, Adamson TM, Maloney JE, Robinson PM. Morphological effects of chronic bilateral phrenectomy or vagotomy in fetal lamb lung. *J Anat.* 1980 Jun;130(Pt 4):683-95.
- ⁴⁵⁸ Joyce BJ, Wallace MJ, Pierce RA, Harding R, Hooper SB. Sustained changes in lung expansion alter tropoelastin mRNA levels and elastin content in fetal sheep lungs. *Am J Physiol.* 2003;284:L643.
- ⁴⁵⁹ Flecknoe SJ, Wallace MJ, Harding R, Hooper SB. Determination of alveolar epithelial cell phenotypes in fetal sheep. *J Physiol.* 2002;542:245.
- ⁴⁶⁰ Shannon JM, Jennings SD, Nielsen LD. Modulation of alveolar type II cell differentiation function in vitro. *Am J Physiol.* 1992;262:L427.
- ⁴⁶¹ Nardo L, Maritz G, Harding R, Hooper SB. Changes in lung structure and cellular division induced by tracheal obstruction in fetal sheep. *Exp Lung Res.* 2000 Mar;26(2):105-19.
- ⁴⁶² Moessinger AC, Harding R, Adamson TM, Singh M, Kiu GT. Role of lung fluid volume in growth and maturation of the fetal sheep lung. *J Clin Invest.* 1990;86:1270.
- ⁴⁶³ Keramidaris E, Hooper SB, Harding R. Effect of gestational age on the increase in fetal lung growth following tracheal obstruction. *Exp Lung Res.* 1996 May-Jun;22(3):283-98.
- ⁴⁶⁴ Nardo L, Hooper SB, Harding R. Stimulation of lung growth by tracheal obstruction in fetal sheep. *Pediatr Res.* 1998;43:184.

- ⁴⁶⁵ Probyn ME, Wallace MJ, Hooper SB. Effect of increased lung expansion on lung growth and development near midgestation in fetal sheep. *Pediatr Res.* 2000;47:806.
- ⁴⁶⁶ De Paepe ME, Johnson BD, Papadakis K, Sueishi K, Luks FI. Temporal pattern of accelerated lung growth after tracheal occlusion in the fetal rabbit. *Am J Pathol.* 1998;152:179.
- ⁴⁶⁷ Flecknoe S, Harding R, Maritz G, Hooper SB. Increased lung expansion alters the proportions of type I and type II alveolar epithelial cells in fetal sheep. *Am J Physiol.* 2000;278:L1180.
- ⁴⁶⁸ Dawes GS, Gardner WN, Johnston BM, Walker DW. Breathing in fetal lambs: the effect of brain stem section. *J Physiol (Lond).* 1983;335:535.
- ⁴⁶⁹ Harding R. Fetal breathing movements. In: *The Lung: Scientific Foundations*, 2nd ed. Philadelphia, Lippincott-Raven. 1997;p. 1655.
- ⁴⁷⁰ Maloney JE, Adamson TM, Brodecky AV, Cranage S, Lambert TF, Ritchie BC. Diaphragmatic activity and lung liquid flow in the unanesthetized fetal sheep. *J Appl Physiol.* 1975;39:423.
- ⁴⁷¹ Moessinger AC. Fetal akinesia deformation sequence: an animal model. *Pediatrics.* 1983;7:857.
- ⁴⁷² Alcorn D, Adamson TM, Maloney JE, Robinson PM. Morphological effects of chronic bilateral phrenectomy or vagotomy in fetal lamb lung. *J Anat.* 1980;130:683.
- ⁴⁷³ Liggins GC, Vilos GA, Campos GA, Kitterman JA, Lee CH. The effect of spinal cord transection on lung development in fetal sheep. *J Dev Physiol.* 1981;3:267.
- ⁴⁷⁴ Liggins GC, Vilos GA, Campos GA, Kitterman JA, Lee CH. The effect of bilateral thoracoplasty on lung development in fetal sheep. *J Dev Physiol.* 1981;3:275.
- ⁴⁷⁵ Liu M, Xu J, Liu J, Kraw ME, Tanswell AK, Post M. Mechanical strain-enhanced fetal lung cell proliferation is mediated by phospholipase C and D and protein kinase C. *Am J Physiol.* 1995;268:L729.
- ⁴⁷⁶ Harding R, Liggins GC. Changes in thoracic dimensions induced by breathing movements in fetal sheep. *Reprod Fertil Dev.* 1996;8:117.
- ⁴⁷⁷ Badalian SS, Chao CR, Fox HE, Timor-Tritsch IE. Fetal breathing-related nasal fluid flow velocity in uncomplicated pregnancies. *Am J Obstet Gynecol.* 1993;563-7.
- ⁴⁷⁸ Kalache KD, Chaoui R, Marcks B, Nguyen-Dobinsky TN, Wernicke KD, Wauer R, Bollmann R. Differentiation between human fetal breathing patterns by investigation of breathing-related tracheal fluid flow velocity. *Prenat Diagn.* 2000;20:45.
- ⁴⁷⁹ Chicurel ME, Chen CS, Ingber DE. Cellular control lies in the balance of forces. *Curr Opin Cell Biol.* 1998;10:232.
- ⁴⁸⁰ Ingber DE, Karp S, Plopper G, Hansen L, Mooney D. Mechanochemical transduction across extracellular matrix and through the cytoskeleton. In: Frangos JA, Ives CL, eds. *Physical Forces and the Mammalian Cell*. San Diego: Academic Press. 1993;61-79.
- ⁴⁸¹ Wirtz HR, Dobbs LG. The effects of mechanical forces on lung functions. *Respir Physiol.* 2000;119:1.
- ⁴⁸² Sims JR, Karp S, Ingber DE. Altering the cellular mechanical force balance results in integrated changes in cell cytoskeletal and nuclear shape. *J Cell Sci.* 1992;103:1215.
- ⁴⁸³ Rubin K, Gullberg D, Tomasini-Johansson B, Reed RK, Ryden C, Borg TK. Molecular recognition of the extracellular matrix by cell surface receptors. In Comper WD (ed): *Extracellular Matrix*, Amsterdam, Harwood Academic Publishers. 1997, p. 262-309.
- ⁴⁸⁴ Hooper SB, Han VK, Harding R. Changes in lung expansion alter pulmonary DNA synthesis and IGF-II gene expression in fetal sheep. *Am J Physiol.* 1993;265:L403.
- ⁴⁸⁵ Nardo L, Hooper SB, Harding R. Stimulation of lung growth by tracheal obstruction in fetal sheep. *Pediatr Res.* 1998;43:184.
- ⁴⁸⁶ Papadakis K, Luks FI, DePaepe ME, Piasecki GJ, Wesselhoeft CW. Fetal lung growth after tracheal ligation is not solely a pressure phenomenon. *J Pediatr Surg.* 1997;32:347.
- ⁴⁸⁷ Harding R, Albuquerque CA. Pulmonary hypoplasia: role of mechanical factors in prenatal lung growth. In Gaultier C: *Lung Development*. Oxford, Oxford University Press. 1999;p. 364.
- ⁴⁸⁸ Moessinger AC, Collins MH, Blanc WA, Rey HR, James LS. Oligohydramnios-induced lung hypoplasia: the influence of timing and duration in gestation. *Pediatr Res.* 1986;20:951.
- ⁴⁸⁹ Miller AA, Hooper SB, Harding R. Role of fetal breathing movements in control of fetal lung distension. *J Appl Physiol.* 1993;75:2711.
- ⁴⁹⁰ Thomas IT, Smith DW. Oligohydramnios, cause of the nonrenal features of Potter's syndrome, including pulmonary hypoplasia. *J Pediatr.* 1974;84:811.
- ⁴⁹¹ French NP, Hagan R, Evans SF, Godfrey M, Newnham JP. Repeated antenatal corticosteroids: size at birth and subsequent development. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;180:114.
- ⁴⁹² Schellenberg JC, Liggins GC, Stewart AW. Growth, elastin concentration, and collagen concentration of perinatal rat lung: effects of dexamethasone. *Pediatr Res.* 1987;21:603.
- ⁴⁹³ Jobe AH, Newnham J, Willet K, Sly P, Ikegami M. Fetal versus maternal and gestational age effects of repetitive antenatal glucocorticoids. *Pediatrics.* 1998;102:1116.

- ⁴⁹⁴ Wallace MJ, Hooper SB, Harding R. Role of the adrenal glands in the maturation of lung liquid secretory mechanisms in fetal sheep. *Am J Physiol.* 1996;270:R1.
- ⁴⁹⁵ Dayton JM, Young IR, Thorburn GD. Early hypophysectomy of sheep fetuses: effects on growth, placental steroidogenesis and prostaglandin production. *J Reprod Fertil.* 1993;97:513.
- ⁴⁹⁶ Muglia LJ, Bae DS, Brown TT, Vogt SK, Alvarez JG, Sunday ME, Majzoub JA. Proliferation and differentiation defects during lung development in corticotropin-releasing hormone-deficient mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999 Feb;20(2):181-8.
- ⁴⁹⁷ Muglia L, Jacobson L, Dikkes P, Majzoub JA. Corticotropin-releasing hormone deficiency reveals major fetal but not adult glucocorticoid need. *Nature.* 1995;373:427.
- ⁴⁹⁸ Jobe AH, Ikegami M. Lung development and function in preterm infants in the surfactant treatment era. *Annu Rev Physiol.* 2000;62:825.
- ⁴⁹⁹ Pinkerton KE, Kendall JZ, Randall GC, Chechowicz MA, Hyde DM, Plopper CG. Hypophysectomy and porcine fetal lung development. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1989;1:319.
- ⁵⁰⁰ Johnson JW, Mitzner W, Beck JC, London WT, Sly DL, Lee PA, Khouzami VA, Cavalieri RL. Long-term effects of betamethasone on fetal development. *Am J Obstet Gynecol.* 1981;141:1053.
- ⁵⁰¹ Boland RE, Nardo L, Hooper SB. Cortisol pretreatment enhances the lung growth response to tracheal obstruction in fetal sheep. *Am J Physiol.* 1997;273:L1126-L1131.
- ⁵⁰² Lum S, Hoo AF, Dezateux C, Goetz I, Wade A, DeRooy L, Costeloe K, Stocks J. The association between birthweight, sex and airway function in infants of nonsmoking mothers. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:2078.
- ⁵⁰³ Stein CE, Kumaran K, Fall CH, Shaheen SO, Osmond C, Barker DJ. Relation of fetal growth to adult lung function in south India. *Thorax.* 1997;52:895.
- ⁵⁰⁴ Edelman NH, Rucker RB, Peavy HH. Nutrition and the respiratory system: COPD. *Am Rev Respir Dis.* 1986;134:347.
- ⁵⁰⁵ Sahebajami H. Nutrition and lung structure and function. *Exp Lung Res.* 1993;19:105.
- ⁵⁰⁶ Gagnon R, Challis J, Johnston L, Fraher L. Fetal endocrine responses to chronic placental embolization in the late-gestation ovine fetus. *Am J Obstet Gynecol.* 1994;170:929.
- ⁵⁰⁷ Hooper SB, Bocking AD, White S, Challis JR, Han VK. DNA synthesis is reduced in selected fetal tissues during prolonged hypoxemia. *Am J Physiol.* 2002;261:508.
- ⁵⁰⁸ Faridy EE, Sani MR, Thliveris JA. Fetal lung growth: influence of maternal hypoxia and hyperoxia in rats. *Respir Physiol.* 1988;73:225.
- ⁵⁰⁹ Das RM. The effects of intermittent starvation on lung development in suckling rats. *Am J Pathol.* 1984 Nov;117(2):326-32.
- ⁵¹⁰ Maritz GS, Cock ML, Louey S, Joyce BJ, Albuquerque CA, Harding R. Effects of fetal growth restriction on lung development before and after birth: a morphometric analysis. *Pediatr Pulmonol.* 2001;32:201.
- ⁵¹¹ Gagnon R, Challis J, Johnston L, Fraher L. Fetal endocrine responses to chronic placental embolization in the late-gestation ovine fetus. *Am J Obstet Gynecol.* 1994;170:929.
- ⁵¹² Simmons RA, Gounis AS, Bangalore SA, Ogata ES. Intrauterine growth retardation, fetal glucose transport is diminished in lung but spared in brain. *Pediatr Res.* 1992;31:59.
- ⁵¹³ Lechner AJ. Perinatal age determines the severity of retarded lung development induced by starvation. *Am Rev Respir Dis.* 1985;131:638.
- ⁵¹⁴ Shibahara SU, Davidson JM, Smith K, Crystal RG. Modulation of tropoelastin production and elastin messenger ribonucleic acid activity in developing sheep lung. *Biochemistry.* 1981;20:6577.
- ⁵¹⁵ Mecham RP. Elastic fibres. In Crystal RG: *The Lung: Scientific Foundations*, 2nd ed. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1997, p. 729.
- ⁵¹⁶ Matsui R, Thurlbeck WM, Fujita Y, Yu SY, Kida K. Connective tissue, mechanical and morphometric changes in the lungs of weanling rats fed a low protein diet. *Pediatr Pulmonol.* 1989;7:L159.
- ⁵¹⁷ Desai R, Wigglesworth JS, Aber V. Assessment of elastin maturation by radioimmunoassay of desmosine in the developing human lung. *Early Hum Dev.* 1988;16:61.
- ⁵¹⁸ Dwyer CM, Stickland NC. The effects of maternal undernutrition on maternal and fetal serum insulin-like growth factors, thyroid hormones and cortisol in the guinea pig. *J Dev Physiol.* 1992;18:303.
- ⁵¹⁹ Pierce RA, Mariencheck WI, Sandefur S, Crouch EC, Parks WC. Glucocorticoids upregulate tropoelastin expression during late stages of fetal lung development. *Am J Physiol.* 1995;268:L491.
- ⁵²⁰ Willet KE, McMenamin P, Pinkerton KE, Ikegami M, Jobe AH, Gurrin L, Sly PD. Lung morphometry and collagen and elastin content: changes during normal development and after prenatal hormone exposure in sheep. *Pediatr Res.* 1999;45:615.
- ⁵²¹ Berk JL, Massoomi N, Hatch C, Goldstein RH. Hypoxia downregulates tropoelastin gene expression in rat lung fibroblasts by pretranslational mechanisms. *Am J Physiol.* 1999;277:L566.
- ⁵²² Brody JS, Vaccaro C. Postnatal formation of alveoli: interstitial events and physiologic consequences.

Fed Proc. 1979;38:215.

⁵²³ Sekhon HS, Thurlbeck WM. Lung growth in hypobaric normoxia, normo-baric hypoxia, and hypobaric hypoxia in growing rats. *J Appl Physiol.* 1995;78:L124.

⁵²⁴ Chambers RC, Laurent GJ. The Lung. In Comper WD (ed): *Extracellular Matrix.* Amsterdam, Harwood, Academic Publishers. 1996, p. 378.

⁵²⁵ Berg RA, Kerr JS. Nutritional aspects of collagen metabolism. *Annu Rev Nutr.* 1992;12:369.

⁵²⁶ Myers BA, Dubick MA, Gerreits J, Rucker RB, Jackson AC, Reiser KM, Williams SM, Last JA. Protein deficiency: effects on lung mechanics and the accumulation of collagen and elastin in rat lung. *J Nutr.* 1983;113:2308.

⁵²⁷ West JB, Mathieu-Costello O. Structure, strength, failure and remodeling of the pulmonary blood-gas barrier. *Annu Rev Physiol.* 1999;61:543.

⁵²⁸ Humphries DE, Lee SL, Fanburg BL, Silbert JE. Effects of hypoxia and hyperoxia on proteoglycan by bovine pulmonary artery endothelial cells. *J Cell Physiol.* 1986;126:249.

⁵²⁹ Figueroa JE, Tao Z, Sarphe TG, Smart FW, Glancy DL, Vijayagopal P. Effect of hypoxia and hypoxia/reoxygenation on proteoglycan metabolism by vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 1999;143:135.

⁵³⁰ Curle DC, Adamson IY. Retarded development of neonatal rat lung by maternal malnutrition. *J Histochem Cytochem.* 1978;26:401.

⁵³¹ Gagnon R, Langridge J, Inchley K, Murotsuki J, Possmayer F. Changes in surfactant-associated protein mRNA profile in growth-restricted fetal sheep. *Am J Physiol.* 1999;276:L459.

⁵³² Chytil F. Retinoids in lung development. *FASEB J.* 1996;10:986.

⁵³³ Zachman RD. Role of vitamin A in lung development. *J Nutr.* 1995;125:1634S

⁵³⁴ Chailley-Heu B, Chelly N, Lelièvre-Pégorier M, Barlier-Mur AM, Merlet-Bénichou C, Bourbon JR. Mild vitamin A deficiency delays fetal lung maturation in the rat. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999;21:89.

⁵³⁵ Bhandari A, Bhandari V. Pathogenesis, pathology and pathophysiology of pulmonary sequelae of bronchopulmonary dysplasia in premature infants. *Front Biosci.* 2003; 8:e370–e380.

⁵³⁶ Kotch LE, Iyer NV, Laughner E, Semenza GL. Defective vascularization of HIF-1alpha-null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Dev Biol.* 1999;209:254–267.

⁵³⁷ Compennolle V, Brusselmans K, Acker T, Hoet P, Tjwa M, Beck H, Plaisance S, Dor Y, Keshet E, Lupu F, Nemery B, Dewerchin M, Van Veldhoven P, Plate K, Moons L, Collen D, Carmeliet P. Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat Med.* 2002; 8:702–710.

⁵³⁸ Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller GA, Rangell L, Wright BD, Radtke F, Aguet M, Ferrara N. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development.* 1999;126:1149–1159.

⁵³⁹ Bhatt AJ, Pryhuber GS, Huyck H, Watkins RH, Metlay LA, Maniscalco WM. Disrupted pulmonary vasculature and decreased vascular endothelial growth factor, Flt-1, and TIE-2 in human infants dying with bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:1971–1980.

⁵⁴⁰ Brown KR, England KM, Goss KL, Snyder JM, Acarregui MJ. VEGF induces airway epithelial cell proliferation in human fetal lung in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;281:L1001–L1010.

⁵⁴¹ O'Shea TM, Doyle LW. Perinatal glucocorticoid therapy and neurodevelopmental outcome: An epidemiologic perspective. *Semin Neonatol.* 2001;6:293–307.

⁵⁴² Jankov RP, Keith Tanswell A. Growth factors, postnatal lung growth and bronchopulmonary dysplasia. *Paediatr Respir Rev.* 2004;5(suppl A):S265–S275.

⁵⁴³ Burri PH, Moschopoulos M. Structural Analysis of Fetal Rat Lung Development. *Anat Rec.* 1992;234:399-418.

⁵⁴⁴ Burri PH. The postnatal growth of the rat lung. 111. Morphology. *Anat Rec.* 1974;180:77-98.

⁵⁴⁵ Burri PH, Weibell ER. Ultrastructure and morphometry of the developing lung. In: *Development of the Lung.* Hodson WA, ed. Series: *Lung Biology in Health and Disease,* Lenfant C, exec. ed. M. Dekker Inc., New York and Basel, Vol. 6. 1977; pp. 215-267.

⁵⁴⁶ Zeltner TB, Burri PH. The postnatal development and growth of the human lung. 11. Morphology. *Respir Physiol.* 1987;67:269-282.

⁵⁴⁷ Joyce-Brady MF, Brody JS. Ontogeny of pulmonary alveolar epithelial markers of differentiation. *Dev Biol.* 1990;137:331-348.

⁵⁴⁸ Dobbs LG, Williams MC, Brandt AE. Changes in biochemical characteristics and pattern of lectin binding of alveolar type 2 cells with time in culture. *Biochim Biophys Acta.* 1985;846:155-166.

⁵⁴⁹ Otto-Verberne CJM, Ten Have-Opbroek AAW. Development of the pulmonary acinus in fetal rat lung: a study based on an antiserum recognizing surfactant-associated proteins. *Anat Embryol.* 1987;175:365-373.

⁵⁵⁰ Lechner AJ, Banchemo N. Advanced pulmonary development in newborn guinea pigs (*cavia porcellus*). *Am J Anat.* 1982;163:235-246.

- ⁵⁵¹ Mitchell JJ, Reynolds SE, Leslie KO, Low RB, Woodcock-Mitchell J. Smooth muscle cell markers in developing rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1990;35:15-523.
- ⁵⁵² Ten Have-Opbroek AAW. Immunological study of lung development in the mouse embryo. 11. First appearance of the great alveolar cell, as shown by immunofluorescence microscopy. *Dev Biol.* 1979;69:408-423.
- ⁵⁵³ Boyden EA. Development and growth of the airways. In: *Development of the Lung*. Hodson WA, ed. Series: *Lung Biology in Health and Disease*. Lenfant C, exec. ed. M. Dekker Inc., New York and Basel, Vol. 6. 1977;pp. 3-35.
- ⁵⁵⁴ Hilfer SR, Rayner RM, Brown JW. Mesenchymal control of branching pattern in the fetal mouse lung. *Tissue Cell.* 1985;17:523-528.
- ⁵⁵⁵ Zeltner TB, Burri PH. The postnatal development and growth of the human lung. 11. Morphology. *Respir Physiol.* 1987;67:269-282.
- ⁵⁵⁶ Koelliker A. *Entwicklungsgeschichte des Menschen und der höheren Tiere*. 2. Auflage, Leipzig. 1879;pp. 857-868.
- ⁵⁵⁷ Bender KW. Zur synthetischen Morphologie der Lungen, abgeleitet aus ihrer Entwicklungsgeschichte. *Anat Anz.* 1923;57:97-111.
- ⁵⁵⁸ Ham AW, Baldwin KW. A histological study of the development of the lung with particular reference to the nature of alveoli. *Anat Rec.* 1941;81:363-379.
- ⁵⁵⁹ Sorokin SP, Hoyt RF Jr. Pure population of nonmonocyte derived macrophages arising in organ cultures of embryonic rat lungs. *Anat Rec.* 1987;217:35-52.
- ⁵⁶⁰ Clugston RD, Zhang W, Greer JJ. Early Development of the Primordial Mammalian Diaphragm and Cellular Mechanisms of Nitrofen-Induced Congenital Diaphragmatic Hernia. *Birth Defects Research (Part A)*. 2010;88:15-24.
- ⁵⁶¹ Costlow RD, Manson JM. The heart and diaphragm: target organs in the neonatal death induced by nitrofen (2,4-dichlorophenyl-pnitrophenyl ether). *Toxicology.* 1981;20:209-227.
- ⁵⁶² Allan DW, Greer JJ. Pathogenesis of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in fetal rats. *J Appl Physiol.* 1997;83:338-347.
- ⁵⁶³ Clugston RD, Greer JJ. Diaphragm development and congenital diaphragmatic hernia. *Semin Pediatr Surg.* 2007;16:94-100.
- ⁵⁶⁴ Clugston RD, Klattig J, Englert C, Clagett-Dame M, Martinovic J, Benachi A, Greer JJ. Teratogen-induced, dietary and genetic models of congenital diaphragmatic hernia share a common mechanism of pathogenesis. *Am J Pathol.* 2006;169:1541-1549.
- ⁵⁶⁵ Brown TJ, Manson JM. Further characterization of the distribution and metabolism of nitrofen in the pregnant rat. *Teratology.* 1986;34:129-139.
- ⁵⁶⁶ Allan DW, Greer JJ. Pathogenesis of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in fetal rats. *J Appl Physiol.* 1997;83:338-347.
- ⁵⁶⁷ Babiuk RP, Zhang W, Clugston R, Allan DW, Greer JJ. Embryological origins and development of the rat diaphragm. *J Comp Neurol.* 2003 Jan 20;455(4):477-87.
- ⁵⁶⁸ Sadler TW. Development of the diaphragm. In *Langman's Medical Embryology* Edited by: Sadler TW. Baltimore, Williams and Wilkins. 2004.
- ⁵⁶⁹ Torfs CP, Curry CJ, Bateson TF, Honoré LH. A population-based study of congenital diaphragmatic hernia. *Teratology.* 1992;46:555-565.
- ⁵⁷⁰ Mey J, Babiuk RP, Clugston R, Zhang W, Greer JJ. Retinal dehydrogenase-2 is inhibited by compounds that induce congenital diaphragmatic hernias in rodents. *Am J Pathol.* 2003 Feb;162(2):673-9.
- ⁵⁷¹ Babiuk RP, Greer JJ. Diaphragm defects occur in a CDH hernia model independently of myogenesis and lung formation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;283:L1310-1314.
- ⁵⁷² Gonzalez-Reyes S, Martinez L, Martinez-Calonge W, Fernandez-Dumont V, Tovar JA. Effects of nitrofen and vitamins A, C and E on maturation of cultured human H441 pneumocytes. *Biol Neonate.* 2006;90(1):9-16. Epub 2006 Feb 20.
- ⁵⁷³ Kling DE, Aidlen JT, Fisher JC, Kinane TB, Donahoe PK, Schnitzer JJ. Nitrofen induces a redox-dependent apoptosis associated with increased p38 activity in P19 teratocarcinoma cells. *Toxicol In Vitro.* 2005 Feb;19(1):1-10.
- ⁵⁷⁴ Chen MH, MacGowan A, Ward S, Bavik C, Greer JJ. The activation of the retinoic acid response element is inhibited in an animal model of congenital diaphragmatic hernia. *Biol Neonate.* 2003;83(3):157-61.
- ⁵⁷⁵ Dawrant MJ, Giles S, Bannigan J, Puri P. Adramycin produces a reproducible model of gastrointestinal atresia in the mouse. *Pediatr Surg Int.* 2008;24:731-735.

- ⁵⁷⁶ Alles AJ, Losty PD, Donahoe PK, Manganaro TF, Schnitzer JJ. Embryonic cell death patterns associated with nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 1995;30:353–360.
- ⁵⁷⁷ Babiuk RP, Greer JJ. Diaphragm defects occur in a CDH hernia model independently of myogenesis and lung formation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;283:L1310–1314.
- ⁵⁷⁸ McBurney MW, Jones-Villeneuve EM, Edwards MK, Anderson PJ. Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line. *Nature.* 1982;299:165–167.
- ⁵⁷⁹ Gonzalez-Reyes S, Martinez L, Martinez- Calonge W, Fernandez-Dumont V, Tovar JA. Effects of antioxidant vitamins on molecular regulators involved in lung hypoplasia induced by nitrofen. *J Pediatr Surg.* 2006;41:1446–1452.
- ⁵⁸⁰ Jesudason EC, Connell MG, Fernig DG, Lloyd DA, Losty PD. Cell proliferation and apoptosis in experimental lung hypoplasia. *J Pediatr Surg.* 2000;35:129–133.
- ⁵⁸¹ Cilley RE, Zgleszewski SE, Krummel TM, Chinoy MR. Nitrofen dose-dependent gestational day-specific murine lung hypoplasia and left-sided diaphragmatic hernia. *Am J Physiol.* 1997 Feb;272(2 Pt 1):L362-71.
- ⁵⁸² Gray SW, Skandalakis JE. *Embryology for Surgeons.* Philadelphia, PA: Saunders, 1972, p. 359-385.
- ⁵⁸³ Harrison MR. The fetus with a diaphragmatic hernia: pathophysiology, natural history, and surgical management. In: *The Unborn Patient: Fetal Diagnosis and Treatment (2nd ed.)*, edited by Harrison MR, Golbus MS, and Filly RA. Philadelphia, PA: 24. Saunders, 1990, p. 295-319.
- ⁵⁸⁴ Iritani I. Experimental study on embryogenesis of congenital diaphragmatic hernia. *Anat Embryol (Berl).* 1984;169(2):133-9.
- ⁵⁸⁵ Nakao Y, Ueki R. Congenital diaphragmatic hernia induced by nitrofen in mice and rats: characteristics as animal model and pathogenetic relationship between diaphragmatic hernia and lung hypoplasia. *Congenital Anom.* 1987;27:397-417.
- ⁵⁸⁶ Blackburn WR, Logsdon P, Alexander JA. Congenital diaphragmatic hernia: studies of lung composition and structure (Abstract). *Am Rev Respir Dis Suppl.* 1977;115:275.
- ⁵⁸⁷ Glick PL, Stannard VA, Leach CL, Rossman J, Hosada Y, Morin FC, Cooney DR, Allen JE, Holm B. Pathophysiology of congenital diaphragmatic hernia II: the fetal lamb model is surfactant deficient. *J Pediatr Surg.* 1992;27:382-388.
- ⁵⁸⁸ Tovar JA, Alfonso LF, Sasieta MJ, Ingunza N, Alvarez FJ, Vallis I, Soler A. Lung phospholipids in experimental congenital diaphragmatic hernia (Abstract). In: *Proceedings of the 7th International Workshop of Surfactant Replacement.* San Sebastian, Spain: Proc. Int. Workshop Surfactant; Replacement, 1992, p. 63.
- ⁵⁸⁹ Manson JM. Mechanism of Nitrofen teratogenesis. *Environ Health Persp.* 1986;70:137-147.
- ⁵⁹⁰ Ten Have-Opbroek AAW, Wiersinga WM. Inhibition of T3-receptor binding by Nitrofen. *Biochem Biophys Acta.* 1996;1201:266-270.
- ⁵⁹¹ Kavlock RJ, Chernoff N, Rogers E, Whitehouse D, Carver B, Gray J, Robinson K. An analysis of fetotoxicity using biochemical endpoints of organ differentiation. *Teratology.* 1982;26:183-194.
- ⁵⁹² Lau C, Cameron AM, Irsula O, Antolick LL, Langston C, Kavlock RJ. Teratogenic effects of nitrofen on cellular and functional maturation of the rat lung. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1988;95:412-422.
- ⁵⁹³ Cunningham MD, Hollingsworth DR, Belin RP. Impaired surfactant production in cretin lambs. *Obstet Gynecol.* 1980;55:439-443.
- ⁵⁹⁴ Hitchcock KR. Hormones and the lung I.: Thyroid hormones and glucocorticoids in lung development. *Anat Rec.* 1979;194: 15-39.
- ⁵⁹⁵ Roche Lexikon Medizin. 4. Auflage. Urban & Schwarzenberg, 1998.
- ⁵⁹⁶ Erenberg A, Rhodes ML, Weinstein MM. The effect of thyroidectomy on ovine fetal lung maturation. *Pediatr Res.* 1979;13:230-235.
- ⁵⁹⁷ Kitterman JA, Liggins GC, Campos GA. Prepartum maturation of the lung: relation to cortisol. *J Appl Physiol.* 1981;51:384-390.
- ⁵⁹⁸ Brandsma AE, Tibboel D, Vulto IM, de Vijlder JJ, Ten Have-Opbroek AA, Wiersinga WM. Inhibition of T3-receptor binding by Nitrofen. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1201:266–270.
- ⁵⁹⁹ Manson JM. Mechanism of nitrofen teratogenesis. *Environ Health Perspect.* 1986;70:137–147.
- ⁶⁰⁰ Manson JM, Brown T, Baldwin DM. Teratogenicity of nitrofen (2, 4-dichloro-4'-nitrodiphenyl ether) and its effects on thyroid function in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1984;73:323–335.
- ⁶⁰¹ Gray LE, Kavlock RJ, Chernoff N, Ostby J, Ferrell J. Postnatal developmental alterations following prenatal exposure to the herbicide 2,4-dichlorophenyl-p-nitrophenyl ether: a dose response evaluation in the mouse. *Teratol Appl Pharmacol.* 1983;67:1–14.
- ⁶⁰² Naveed-ur-Rehman, Ahmad Z, Anwar-ul-Haq, Abbas KA. Down syndrome with morgagni hernia and hypothyroidism. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2004 Nov;14(11):689-90.
- ⁶⁰³ Massaro D, Teich N, Maxwell S, Massaro GD, Whitney P. Postnatal development of alveoli: regulation and evidence for a critical period in rats. *J Clin Invest.* 1985;76:1297-1305.

- ⁶⁰⁴ Ballard PL, Gonzales LW. Thyroid hormone binding to nuclear receptor and stimulation of phosphatidylcholine synthesis in the fetal lung (Abstract). *Pediatr Res*. 1983;17:371A.
- ⁶⁰⁵ Chinoy MR, Gonzales LW, Ballard PL, Fisher AB, Eckenhoff RG. Elemental composition of lamellar bodies from fetal and adult human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995;13:99-108.
- ⁶⁰⁶ Alfonso LF, Vilanova J, Aldazabal P, Lopez de Torre B, Tovar JA. Lung growth and maturation in the rat model of experimentally induced congenital diaphragmatic hernia. *Eur J Pediatr Surg*. 1993;3:6-11.
- ⁶⁰⁷ Sluiter W, Bos AP, Silveri F, Tenbrinck R, Kraakslee R, Tibboel D, Koster JF, Molenaar JC. Nitrofen-induced diaphragmatic hernias in rats: pulmonary antioxidant enzyme activities. *Pediatr Res*. 1992;32:394-398.
- ⁶⁰⁸ Nakao Y, Ueki R. Congenital diaphragmatic hernia induced by nitrofen in mice and rats: characteristics as animal model and pathogenetic relationship between diaphragmatic hernia and lung hypoplasia. *Congenital Anom*. 1987;27:397-417.
- ⁶⁰⁹ Suen HC, Catlin EA, Ryan DP, Wain JC, Donahoe PK. Biochemical immaturity of lungs in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*. 1993;28:471-477.
- ⁶¹⁰ Hedrick HL, Pacheco BA, Losty PD, Belch KD, Donahoe PK, Schnitzer JJ. Dexamethasone increases expression of surfactant-associated protein mRNA in rats with nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *Surg Forum*. 1995;46:654-657.
- ⁶¹¹ Harding R. Development of the respiratory system. In: *Textbook of Fetal Physiology*, edited by Thorburn GD and Harding R. New York: Oxford Univ. Press, p. 140-167, 1994.
- ⁶¹² Skandalakis JE, Gray SW, Ricketts RR. The diaphragm. In: *Embryology for Surgeons*, edited by Skandalakis JE and Gray SW. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, chapt. 15, p. 491-539, 1994.
- ⁶¹³ Ambrose AM, Larson PS, Borzelli JF, Blackwell-Smith R, Hennigar GR. Toxicologic studies on 2,4-dichlorophenyl-p-nitrophenyl ether. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1971;19:263-275.
- ⁶¹⁴ Costlow RD, Manson JM. The heart and diaphragm: target organs in the neonatal death induced by nitrofen (2,4-dichlorophenyl-p-nitrophenyl ether). *Toxicology*. 1981;20:209-227.
- ⁶¹⁵ Gray LE, Kavlock RJ, Chernoff N, Ostby J, Ferrell J. Postnatal developmental alterations following prenatal exposure to the herbicide 2,4-dichlorophenyl-p-nitrophenyl ether: a dose response evaluation in the mouse. *Teratol Appl Pharmacol*. 1983;67:1-14.
- ⁶¹⁶ Harris AJ, McCaig CD. Motoneuron death and Motor size during embryonic development of the rat. *J Neurosci*. 1984;4:13-24.
- ⁶¹⁷ Laskowski MB, Sanes JR. Topographic mapping of motor pools onto skeletal muscles. *J Neurosci*. 1987;252-260.
- ⁶¹⁸ Allan DW, Greer JJ. Spatiotemporal expression of polysialated NCAM during phrenic nerve outgrowth and intradiaphragmatic branching (Abstract). *Soc Neurosci Abstr*. 1995;25:740.8.
- ⁶¹⁹ Gattone VH, Morse DE. Pleuroperitoneal canal closure in the rat. *Anat Rec*. 1984;208:445-460.
- ⁶²⁰ Wheeler EF, Bothwell M. Spatiotemporal patterns of NGF and the low-affinity NGF receptor in rat embryos suggest functional roles in tissue morphogenesis and myogenesis. *J Neurosci*. 1992;12:930-945.
- ⁶²¹ Allan DW, Greer JJ. Embryogenesis of the phrenic nerve and diaphragm in the fetal rat. *J Comp Neurol*. 1997 Jun 16;382(4):459-68.
- ⁶²² Kluth D, Tenbrinck R, Ekesparre M, Kangah R, Reich P, Brandsma A, Tibboel D, Lambrecht W. The natural history of congenital diaphragmatic and pulmonary hypoplasia in the embryo. *J Pediatr Surg*. 1993;28:456-463.
- ⁶²³ Costlow RD, Manson JM. Distribution and metabolism of the teratogen nitrofen (2,4-dichloro-4-nitro diphenyl ether) in pregnant rats. *Toxicology*. 1983;26:11-23.
- ⁶²⁴ Tenbrinck R, Tibboel D, Gaillard JL, Kluth D, Bos AP, Lachmann B, Molenaar JC. Experimentally induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *J Pediatr Surg*. 1990;25:426-429.
- ⁶²⁵ Guilbert TW, Gebb SA, Shannon JM. Lung hypoplasia in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia occurs early in development. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;279:L1159-1171.
- ⁶²⁶ Jesudason EC, Connell MG, Fernig DG, Lloyd DA, Losty PD. Early lung malformations in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*. 2000;35:124-127, discussion 128.
- ⁶²⁷ Kling DE, Schnitzer JJ. Vitamin A deficiency (VAD), teratogenic and surgical models of congenital diaphragmatic hernia (CDH). *Am J Med Genet. Part C, Semin Med Genet*. 2007;145C:139-157.
- ⁶²⁸ Gray LE Jr, Kavlock RJ. The effects of the herbicide 2,4-dichlorophenyl-p-nitrophenyl ether (NIT) on serum thyroid hormones in adult female mice. *Toxicol Lett*. 1983;15:231-235.
- ⁶²⁹ Ackerman KG, Herron BJ, Vargas SO, Huang H, Tevosian SG, Kochilas L, Rao C, Pober BR, Babiuk RP, Epstein JA, Greer JJ, Beier DR. *Fog2* is required for normal diaphragm and lung development in mice and humans. *PLoS Genet*. 2005;1:58-65.
- ⁶³⁰ Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R. *WT-1* is required for early kidney development. *Cell*. 1993;74:679-691.

- ⁶³¹ Acosta JM, Chai Y, Meara JG, Bringas P Jr, Anderson KD, Warburton D. Prenatal exposure to nitrofen induces Fryns phenotype in mice. *Ann Plast Surg.* 2001;46:635–640.
- ⁶³² Kling DE, Narra V, Islam S, Kinane TB, Alessandrini A, Ercolani L, Donahoe PK, Schnitzer JJ. Decreased mitogen activated protein kinase activities in congenital diaphragmatic hernia-associated pulmonary hypoplasia. *J Pediatr Surg.* 2001;36:1490–1496.
- ⁶³³ Kling DE, Lorenzo HK, Trbovich AM, Kinane TB, Donahoe PK, Schnitzer JJ. MEK-1/2 inhibition reduces branching morphogenesis and causes mesenchymal cell apoptosis in fetal rat lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;282:L370–L378.
- ⁶³⁴ Jesudason EC, Smith NP, Connell MG, Spiller DG, White MR, Fernig DG, Losty PD. Developing rat lung has a sided pacemaker region for morphogenesis-related airway peristalsis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;32:118–127.
- ⁶³⁵ Jesudason EC, Smith NP, Connell MG, Spiller DG, White MR, Fernig DG, Losty PD. Peristalsis of airway smooth muscle is developmentally regulated and uncoupled from hypoplastic lung growth. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006;291:L559–565.
- ⁶³⁶ Ten Have-Opbroek AA, Plopper CG. Morphogenetic and functional activity of type II cells in early fetal rhesus monkey lungs. A comparison between primates and rodents. *Anat Rec.* 1992;234:93–104.
- ⁶³⁷ Brandsma AE, Ten Have-Opbroek AA, Vulto IM, Molenaar JC, Tibboel D. Alveolar epithelial composition and architecture of the late fetal pulmonary acinus: An immunocytochemical and morphometric study in a rat model of pulmonary hypoplasia and congenital diaphragmatic hernia. *Exp Lung Res.* 1994;20:491–515.
- ⁶³⁸ Mysore MR, Margraf LR, Jaramillo MA, Breed DR, Chau VL, Arevalo M, Moya FR. Surfactant protein A is decreased in a rat model of congenital diaphragmatic hernia. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:654–657.
- ⁶³⁹ Takayasu H, Nakazawa N, Montedonico S, Sugimoto K, Sato H, Puri P. Impaired alveolar epithelial cell differentiation in the hypoplastic lung in nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int.* 2007 May;23(5):405–10.
- ⁶⁴⁰ Alfanso LF, Arnaiz A, Alvarez FJ, Qi B, Diez-Pardo JA, Vallis-i-Soler A, Tovar JA. Lung hypoplasia and surfactant system immaturity induced in the fetal rat by prenatal exposure to nitrofen. *Biol Neonate.* 1996;69(2):94–100.
- ⁶⁴¹ Kumar AS, Gonzales LW, Ballard PL. Transforming growth factor-beta(1) regulation of surfactant protein B gene expression is mediated by protein kinase-dependent intracellular translocation of thyroid transcription factor-1 and hepatocyte nuclear factor 3. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1492:45–55.
- ⁶⁴² Jones JJ, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev.* 1995;16:3–34.
- ⁶⁴³ Han VK, Lund PK, Lee DC, D'Ercole AJ. Expression of somatomedin/insulin-like growth factor messenger ribonucleic acid in the human fetus: Identification, characterization, and tissue distribution. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988 Feb;66(2):422–9.
- ⁶⁴⁴ Hill DJ, Clemmons DR, Riley SC, Bassett N, Challis JR. Immunohistochemical localization of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF binding proteins-1, 22 and 23 in human placenta and fetal membranes. *Placenta.* 1993 Jan-Feb;14(1):1–12.
- ⁶⁴⁵ D'Ercole AJ. The insulin-like growth factors and fetal growth. In Spencer EM (Ed.), *Modern Concepts of Insulin-like Growth Factors.* New York: Elsevier, 1991, pp. 9–23.
- ⁶⁴⁶ Harding JE, Liu L, Evans PC, Gluckman PD. Insulin-like growth factor I alters fetoplacental protein and carbohydrate metabolism in fetal sheep. *Endocrinology.* 1994;134:1509.
- ⁶⁴⁷ Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell.* 1993;75:73–82.
- ⁶⁴⁸ Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell.* 1993;75:59–72.
- ⁶⁴⁹ Florini JR, Ewton DZ, Coolican SA. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr Rev.* 1996;17:481–517.
- ⁶⁵⁰ Powell-Braxton L, Hollingshead P, Warburton C, Dowd M, Pitts-Meek S, Dalton D, Gillet N, Stewart TA. IGF-1 is required for normal embryonic growth in mice. *Genes Dev.* 1993;7:2609–2617.
- ⁶⁵¹ De Troyer A, Estenne M. Functional anatomy of the respiratory muscles. *Clin Chest Med.* 1988;9:175–193.
- ⁶⁵² Fournier M, Lewis M. Influences of IGF-I gene disruption on the cellular profile of the diaphragm. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000;278:E707–E715.
- ⁶⁵³ Fournier M, Lewis MI. Muscle fiber type composition in the hamster diaphragm (Abstract). *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;151:A806.

- ⁶⁵⁴ Johnson SE, Allen RE. The effects of bFGF, IGF-I and TGF-beta on RMo skeletal muscle cell proliferation and differentiation. *Exp Cell Res.* 1990;187:250–254.
- ⁶⁵⁵ McWade FJ, Ewton DZ, Florini JR. Mitogenic competence factor, a serum component that is necessary for IGFs to stimulate myoblast proliferation and suppresses their ability to stimulate differentiation (Abstract). *Prog 77th Ann Meet Endocr Soc 1995.* Washington, DC: Endocr Soc., p. 520.
- ⁶⁵⁶ Engert JC, Berglund EB, Rosenthal N. Proliferation precedes differentiation in IGF-I-stimulated myogenesis. *J Cell Biol.* 1996;135:431–440.
- ⁶⁵⁷ McPherron AC, Lawler AM, Lee S-J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-b superfamily member. *Nature.* 1997;387:83–90.
- ⁶⁵⁸ Adesanya OO, Zhou J, Samathanan C, Powell-Braxton L, Bondy CA. Insulin-like growth factor 1 is required for G2 progression in the estradiol-induced mitotic cycle. *Proc Natl Acad Sci.* 1999;96:3287–329.
- ⁶⁵⁹ Sicinski P, Donaher JL, Parker SB, Li T, Fazeli A, Gardner H, Haslam SZ, Bronson RT, Elledge SJ, Weinberg RA. Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell.* 1995;82:621–630
- ⁶⁶⁰ Florini JR, Ewton DZ. Insulin acts as a somatomedin analog in stimulating myoblast growth in serum free medium. *In Vitro.* 1981;17:763–768.
- ⁶⁶¹ Florini JR, Ewton DZ, Roof SL. IGF-1 stimulates terminal myogenic differentiation by induction of myogenin gene expression. *Mol Endocrinol.* 1991;5:718–724.
- ⁶⁶² Coleman ME, Demayo F, Yin KC, Lee HM, Geske R, Montgomery C, Schwartz RJ. Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice. *J Biol Chem.* 1995;270:12109–12116.
- ⁶⁶³ Florini JR, Magri KA, Ewton DZ, James PL, Grindstaff K, Rotwein PS. “Spontaneous” differentiation of skeletal myoblasts is dependent upon autocrine secretion of insulin-like growth factor-II. *J Biol Chem.* 1991;266:15917–15923.
- ⁶⁶⁴ Dwyer CM, Madgwick A, Ward SS, Stickland NC. The effects of maternal undernutrition in early gestation on the development of fetal myofibres in the guinea pig. *Reprod Fertil Dev.* 1995;7:1285–1292.
- ⁶⁶⁵ Prakash YS, Fournier M, Sieck GC. Effects of prenatal undernutrition on developing rat diaphragm. *J Appl Physiol.* 1993;75:1044–1052.
- ⁶⁶⁶ Williams GT, Smith CA, Spooncer E, Dexter TM, Taylor DR. Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature.* 1990;343:76–79.
- ⁶⁶⁷ Stewart CEH, Rotwein P. Insulin-like growth factor-II is an autocrine survival factor for differentiating myoblasts. *J Biol Chem.* 1996;271:11330–11338.
- ⁶⁶⁸ Ewton DZ, Falen SL, Florini JR. The type II IGF receptor has low affinity for IGF-I analogs: pleiotypic actions of IGFs on myoblasts are apparently mediated by the type I receptor. *Endocrinology.* 1987;120:115–124.
- ⁶⁶⁹ Han VKM, Hill DJ. The involvement of insulin-like growth factors in embryonic and fetal development. In: *The Insulin-Like Growth Factors Structure and Biological Functions*, edited by P. N. Schofield. New York: Oxford, 1992, p. 178–220.
- ⁶⁷⁰ Jones JL, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev.* 1995;16:3–34.
- ⁶⁷¹ Daughaday WH, Rotwein P. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev.* 1989;10:68–91
- ⁶⁷² Quinn L, Haugk K, Grabstein K. Interleukin-15: a novel anabolic cytokine for skeletal muscle. *Endocrinology.* 1995;136:3669–3672.
- ⁶⁷³ Florini JR, Samuel DS, Ewton DZ, Kirk C, Sklar RM. Stimulation of myogenic differentiation by a neuregulin, glial growth factor 2. *J Biol Chem.* 1996;271:12699–12702.
- ⁶⁷⁴ Lewis MI, LoRusso TJ, Fournier M. Anabolic influences of insulin-like growth factor I and/or growth hormone on the diaphragm of young rats. *J Appl Physiol.* 1997;82:1972–1978.
- ⁶⁷⁵ Goad DL, Rubin J, Wang H, Tashjian AH Jr, Patterson C. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human SaOS-2 osteoblast-like cells and murine osteoblasts induced by insulin-like growth factor I. *Endocrinology.* 1996;137:2262–2268.
- ⁶⁷⁶ Arthur WT, Vernon RB, Sage EH, Reed MJ. Growth factors reverse the impaired sprouting of microvessels from aged mice. *Microvasc Res.* 1998;55:260–270.
- ⁶⁷⁷ Ontell M and Kozeka K. Organogenesis of the mouse extensor digitorum longus muscle: a quantitative study. *Am J Anat.* 1984;171:149–161.

- ⁶⁷⁸ Beck KD, Powell-Braxton L, Widmer H-R, Valverde J, Hefti F. Igfl gene disruption results in reduced brain size, CNS hypomyelination, and loss of hippocampal granule and striatal parvalbumin-containing neurons. *Neuron*. 1995;14:717–730.
- ⁶⁷⁹ McLennan IS. Quantitative relationships between motoneuron and muscle development in *Xenopus laevis*: implications for motoneuron cell death and motor unit formation. *J Comp Neurol*. 1988;271:19–29.
- ⁶⁸⁰ LeRoith D, Roberts CT Jr. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett*. 2003;195:127–137.
- ⁶⁸¹ Kurmasheva RT, Houghton PJ. IGF-I mediated survival pathways in normal and malignant cells. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1766:1–22.
- ⁶⁸² Choi JE, Lee SS, Sunde DA, Huizar I, Haugk KL, Thannickal VJ, Vittal R, Plymate SR, Schnapp LM. Insulin-like growth factor-I receptor blockade improves outcome in mouse model of lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Feb 1;179(3):212–9. Epub 2008 Nov 14.
- ⁶⁸³ Maeda A, Hiyama K, Yamakido H, Ishioka S, Yamakido M. Increased expression of platelet-derived growth factor A and insulin-like growth factor-I in BAL cells during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Chest*. 1996;109:780–786.
- ⁶⁸⁴ Krein PM, Sabatini PJ, Timmouth W, Green FH, Winston BW. Localization of insulin-like growth factor-I in lung tissues of patients with fibroproliferative acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167:83–90.
- ⁶⁸⁵ Schnapp LM, Donohoe S, Chen J, Sunde DA, Kelly PM, Ruzinski J, Martin T, Goodlett DR. Mining the acute respiratory distress syndrome proteome: identification of the insulin-like growth factor (IGF)/IGF-binding protein-3 pathway in acute lung injury. *Am J Pathol*. 2006;169:86–95.
- ⁶⁸⁶ Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, Arthur MJ. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis: hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest*. 1998;102:538–549.
- ⁶⁸⁷ Phan SH. The myofibroblast in pulmonary fibrosis. *Chest*. 2002;122:286S–289S.
- ⁶⁸⁸ Burtrum D, Zhu Z, Lu D, Anderson DM, Prewett M, Pereira DS, Bassi R, Abdullah R, Hooper AT, Koo H, Jimenez X, Johnson D, Apblett R, Kussie P, Bohlen P, Witte L, Hicklin DJ, Ludwig DL. A fully human monoclonal antibody to the insulin-like growth factor I receptor blocks liganddependent signaling and inhibits human tumor growth in vivo. *Cancer Res*. 2003;63:8912–8921.
- ⁶⁸⁹ Ullman-Cullere MH, Foltz CJ. Body condition scoring: a rapid and accurate method for assessing health status in mice. *Lab Anim Sci*. 1999;49:319–323.
- ⁶⁹⁰ Hoang CD, Zhang X, Scott PD, Guillaume TJ, Maddaus MA, Yee D, Kratzke RA. Selective activation of insulin receptor substrate-1 and -2 in pleural mesothelioma cells: association with distinct malignant phenotypes. *Cancer Res*. 2004;64:7479–7485.
- ⁶⁹¹ Qiang YW, Yao L, Tosato G, Rudikoff S. Insulin-like growth factor I induces migration and invasion of human multiple myeloma cells. *Blood*. 2004;103:301–308.
- ⁶⁹² Singhal S, Mehta J. Multiple Myeloma. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2006;1:1322–1330.
- ⁶⁹³ Selman Lama M. Pulmonary fibrosis: human and experimental disease. In: Roskind M, editor. *Connective tissue in health and disease*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1990. pp. 123–188.
- ⁶⁹⁴ Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, Arthur MJ. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis: hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest*. 1998;102:538–549.
- ⁶⁹⁵ Uhal BD. Apoptosis in lung fibrosis and repair. *Chest*. 2002 Dec;122(6 Suppl):293S–298S.
- ⁶⁹⁶ Scarpa RC, Carraway RE, Cochrane DE. Insulin-like growth factor (IGF) induced proliferation of human lung fibroblasts is enhanced by neurotensin. *Peptides*. 2005;26:2201–2210.
- ⁶⁹⁷ Oldroyd SD, Miyamoto Y, Moir A, Johnson TS, El Nahas AM, Haylor JL. An IGF-I antagonist does not inhibit renal fibrosis in the rat following subtotal nephrectomy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006;290:F695–F702.
- ⁶⁹⁸ Frankel SK, Moats-Staats BM, Cool CD, Wynes MW, Stiles AD, Riches DW. Human insulin-like growth factor-1A expression in transgenic mice promotes adenomatous hyperplasia but not pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;288:L805–L812.
- ⁶⁹⁹ Allen JT, Bloor CA, Knight RA, Spiteri MA. Expression of insulin-like growth factor binding proteins in bronchoalveolar lavage fluid of patients with pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998;19:250–258.
- ⁷⁰⁰ Harrison NK, Cambrey AD, Myers AR, Southcott AM, Black CM, du Bois RM, Laurent GJ, McAnulty RJ. Insulin-like growth factor-I is partially responsible for fibroblast proliferation induced by bronchoalveolar lavage fluid from patients with systemic sclerosis. *Clin Sci (Lond)*. 1994;86:141–148.

- ⁷⁰¹ Mutsaers SE, Harrison NK, McAnulty RJ, Liao JY, Laurent GJ, Musk AW. Fibroblast mitogens in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid from asbestos-exposed subjects with and without clinical evidence of asbestosis: no evidence for the role of PDGF, TNF- α , IGF-1, or IL-1 β . *J Pathol.* 1998;185:199–203.
- ⁷⁰² Qiang YW, Kopantzev E, Rudikoff S. Insulinlike growth factor-I signaling in multiple myeloma: downstream elements, functional correlates, and pathway cross-talk. *Blood.* 2002;99:4138–4146.
- ⁷⁰³ Selman Lama M. Pulmonary fibrosis: human and experimental disease. In: Roskind M, editor. *Connective tissue in health and disease.* Boca Raton FL: CRC Press; 1990. pp. 123–188.
- ⁷⁰⁴ Andre F, Rigot V, Thimonier J, Montixi C, Parat F, Pommier G, Marvaldi J, Luis J. Integrins and E-cadherin cooperate with IGF-I to induce migration of epithelial colonic cells. *Int J Cancer.* 1999;83:497–505.
- ⁷⁰⁵ Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Geloën A, Even PC, Cervera P, Le Bouc Y. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature.* 2003;421:182–187.
- ⁷⁰⁶ McCormick MC. The contribution of low birth weight to infant mortality and childhood morbidity. *N Engl J Med.* 1985;312:82.
- ⁷⁰⁷ De Onis M, Blossner M, Villar J. Levels and patterns of intrauterine growth retardation in developing countries. *Eur J Clin Nutr.* 1998;52(Suppl 1):S5.
- ⁷⁰⁸ Skarsgard ED, Amii LA, Dimmitt RA, Sakamoto G, Brindle ME, Moss RL. Fetal therapy with rhIGF-1 in a rabbit model of intrauterine growth retardation. *J Surg Res.* 2001 Jul;99(1):142-6.
- ⁷⁰⁹ Giudice LC, de Zegher F, Gargosky SE, Dsupin BA, de las Fuentes L, Crystal RA, Hintz RL, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factors and their binding proteins in the term and preterm human fetus and neonate with normal and extremes of intrauterine growth. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995 May;80(5):1548-55.
- ⁷¹⁰ Lassarre C, Hardouin S, Daffos F, Forestier F, Frankenne F, Binoux M. Serum insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in the human fetus: Relationships with growth in normal subjects and in subjects with intrauterine growth retardation. *Pediatr Res.* 1991 Mar;29(3):219-25.
- ⁷¹¹ Buchmiller TL, Kim CS, Chopourian HL, Fonkalsrud EW. Transamniotic fetal feeding: Enhancement of growth in a rabbit model of intrauterine growth retardation. *Surgery.* 1994 Jul;116(1):36-41.
- ⁷¹² Galbraith RS, Karchmar EJ, Piercy WN, Low JA. The clinical prediction of intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol.* 1979 Feb 1;133(3):281-6.
- ⁷¹³ Woods KA, Camacho-Hübner C, Savage MO, Clark AJ. Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor 1 gene. *N Engl J Med.* 1996 Oct 31;335(18):1363-7.
- ⁷¹⁴ Schoknecht PA, Ebner S, Skottner A, Burrin DG, Davis TA, Ellis K, Pond WG. Exogenous insulin-like growth factor-1 increases weight gain in intrauterine growth-retarded neonatal pigs. *Pediatr Res.* 1997 Aug;42(2):201-7.
- ⁷¹⁵ Thakur A, Sase M, Lee JJ, Thakur V, Buchmiller TL. Ontogeny of insulin-like growth factor 1 in a rabbit model of growth retardation. *J Surg Res.* 2000 Jun 15;91(2):135-40.
- ⁷¹⁶ Xu R, Wang T. Gastrointestinal absorption of insulin-like growth factor-1 in neonatal pigs. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1996;23:430.
- ⁷¹⁷ Sorem KA, Siler-Khodr TM. Placental IGF-1 in severe intrauterine growth retardation. *J Matern Fetal Med.* 1998 Jan-Feb;7(1):1-7.
- ⁷¹⁸ Chard T. Insulin-like growth factors and their binding proteins in normal and abnormal human fetal growth. *Growth Regul.* 1994;4:91–100.
- ⁷¹⁹ Giudice LC, de Zegher F, Gargosky SE, Dsupin BA, de las Fuentes L, Crystal RA, Hintz RL, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factors and their binding proteins in the term and pre-term human fetus and neonate with normal and extremes of intrauterine growth. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80:1548–1555.
- ⁷²⁰ Jones J, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev.* 1995;16:3–34.
- ⁷²¹ Oh YM, Nagalla SR, Yamanaka Y, Kim HS, Wilson E, Rosenfeld RG. Synthesis and characterization of insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-7: recombinant human mac25 protein specifically binds IGF-I and II. *J Biol Chem.* 1996;271:30322–30325.
- ⁷²² Tarantyl AF, Hunter MK, Gargosky SE. Direct administration of insulin-like growth factor to fetal rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Endocrinology.* 1997 Aug;138(8):3349-58.
- ⁷²³ Luke B. Nutritional influences on fetal growth. *Clin Obstet Gynecol.* 1994;37:538–549.
- ⁷²⁴ Owens JA. Endocrine and substrate control of fetal growth. Placental and maternal influences and insulin-like growth factors. *Reprod Fertil Dev.* 1991;3:501–517.
- ⁷²⁵ Clemmons DR, Thissen JP, Maes M, Ketelslegers JM, Underwood LE. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) infusion into hypophysectomized or protein deprived rats induces specific IGF-binding proteins in serum. *Endocrinology.* 1989;125:2967–2972.

- ⁷²⁶ Clemmons DR, Smith-Banks A, Underwood LE. Reversal of diet-induced catabolism by infusion of recombinant human insulin-like growth factor-I in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992;75:234–238.
- ⁷²⁷ Clemmons DR, Underwood LE. Role of insulin-like growth factors and growth hormone in reversing catabolic states. *Horm Res [Suppl 2].* 1992;38:37–40.
- ⁷²⁸ Tarantal AF, Gargosky SE. Characterization of the insulin-like growth factor (IGF) axis in the serum of maternal and fetal macaques (*Macaca mulatta* and *Macaca fascicularis*): a cross-sectional study. *Growth Regul.* 1995;5:190–198.
- ⁷²⁹ Tanimura T, Tanioka Y. Comparison of embryonic and foetal development in man and rhesus monkey. *Lab Animal Handb.* 1975;6:205–233.
- ⁷³⁰ Tarantal AF. Hematologic reference values for the fetal long-tailed macaque (*Macaca fascicularis*). *Am J Primatol.* 1993;29:209–219.
- ⁷³¹ Tarantal AF, Hendrickx AG. Prenatal growth in the cynomolgus and rhesus macaque (*Macaca fascicularis* and *Macaca mulatta*): a comparison by ultrasonography. *Am J Primatol.* 1988;15:309–323.
- ⁷³² Christensen RD. Hematopoiesis in the fetus and neonate. *Pediatr Res.* 1989;26:531–535.
- ⁷³³ Forestier F, Daffos F, Galacteros F, Bardakjian J, Rainaut M, Beuzard Y. Hematological values of 163 normal fetuses between 18 and 30 weeks of gestation. *Pediatr Res.* 1986;20:342–346.
- ⁷³⁴ Lok F, Owens JA, Mundy L, Robinson JS, Owens PC. Insulin-like growth factor I promotes growth selectively in fetal sheep in late gestation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 1996;270:R1148–R1155.
- ⁷³⁵ Gargosky SE, Wilson KF, Fielder PJ, Vaccarello MA, Guevara-Aguirre J, Diamond FB, Baxter RC, Rosenbloom AL, Rosenfeld RG. The composition and distribution of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins (IGFBPs) in the serum of growth hormone receptor-deficient patients: effects of IGF-I therapy on IGFBP-3. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;77:1683–1689.
- ⁷³⁶ Aron DC. Insulin-like growth factor I and erythropoiesis. *BioFactors.* 1992;3:211–216.
- ⁷³⁷ Kelley KW, Arkins S, Minshall C, Liu Q, Dantzer R. Growth hormone, growth factors, and hematopoiesis. *Horm Res.* 1996;45:38–45.
- ⁷³⁸ Kooijman R, Hooghe-Peters EL, Hooghe R. Prolactin, growth hormone, and insulin-like growth factor-I in the immune system. *Adv Immunol.* 1996;63:377–454.
- ⁷³⁹ Auernhammer CJ, Strasburger CJ. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on the immune system. *Eur J Endocrinol.* 1995;133:635–645.
- ⁷⁴⁰ Muta K, Krantz SB, Bondurant MC, Wickrema A. Distinct roles of erythropoietin, insulin-like growth factor I, and stem cell factor in the development of erythroid progenitor cells. *J Clin Invest.* 1994;94:34–43.
- ⁷⁴¹ Stuart CA, Meehan RT, Neale LS, Clintron NM, Furlanetto RW. Insulinlike growth factor-I binds selectively to human peripheral blood monocytes and B-lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991;72:1117–1122.
- ⁷⁴² Clark R, Strasser J, McCabe S, Robbins K, Jardieu P. Insulin-like growth factor-1 stimulation of lymphopoiesis. *J Clin Invest.* 1993;92:540–548.
- ⁷⁴³ Zadik Z, Estrov Z, Karov Y, Hahn T, Barak Y. The effect of growth hormone and IGF-I on clonogenic growth of hematopoietic cells in leukemic patients during active disease and during remission: a preliminary report. *J Pediatr Endocrinol.* 1993;6:79–83.
- ⁷⁴⁴ Frost RA, Nachman SA, Lang CH, Gelato MC. Proteolysis of insulin-like growth factor-binding protein-3 in human immunodeficiency virus-positive children who fail to thrive. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81:2957–2961.
- ⁷⁴⁵ Tarantal AF, Marthas ML, Gargosky SE, Otsyula M, McChesney MB, Miller CJ, Hendrickx AG. Effects of viral virulence on intrauterine growth in SIV-infected fetal rhesus macaques. *J AIDS.* 1995;10:129–138.
- ⁷⁴⁶ Eremia SC, de Boo HA, Bloomfield FH, Oliver MH, Harding JE. Fetal and amniotic insulin-like growth factor-I supplements improve growth rate in intrauterine growth restriction fetal sheep. *Endocrinology.* 148(6):2963–2972.
- ⁷⁴⁷ Albertsson-Wikland K, Boguszewski M, Karlberg J. Children born small-for-gestational age: postnatal growth and hormonal status. *Horm Res.* 1998;7–13.
- ⁷⁴⁸ Paz I, Gale R, Laor A, Danon YL, Stevenson DK, Seidman DS. The cognitive outcome of full-term small for gestational age infants at late adolescence. *Obstet Gynecol.* 1995;85:452–456.
- ⁷⁴⁹ Barker DJ. Fetal growth and adult disease. *Br J Obstet Gynaecol.* 1992;99:275–276.
- ⁷⁵⁰ Charlton V, Johengen M. Fetal intravenous nutritional supplementation ameliorates the development of embolization-induced growth retardation in sheep. *Pediatr Res.* 1987;22:55–61.
- ⁷⁵¹ Gluckman PD. Endocrine and nutritional regulation of prenatal growth. *Acta Paediatr Suppl.* 1997;423:153–157; discussion 158.

- ⁷⁵² Gluckman PD, Johnson-Barrett JJ, Butler JH, Edgar BW, Gunn TR. Studies of insulin-like growth factor-I and -II by specific radioligand assays in umbilical cord blood. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1983;19:405–413.
- ⁷⁵³ Lassarre C, Hardouin S, Daffos F, Forestier F, Frankenne F, Binoux M. Serum insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in the human fetus. Relationships with growth in normal subjects and in subjects with intrauterine growth retardation. *Pediatr Res*. 1991;29:219–225.
- ⁷⁵⁴ Leger J, Oury JF, Noel M, Baron S, Benali K, Blot P, Czernichow P. Growth factors and intrauterine growth retardation. I. Serum growth hormone, insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II, and IGF binding protein 3 levels in normally grown and growth-retarded human fetuses during the second half of gestation. *Pediatr Res*. 1996;40:94–100.
- ⁷⁵⁵ Woods KA, Camacho-Hubner C, Barter D, Clark AJ, Savage MO. Insulin-like growth factor I gene deletion causing intrauterine growth retardation and severe short stature. *Acta Paediatr Suppl*. 1997;423:39–45.
- ⁷⁵⁶ Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (IGF-I) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell*. 1993;75:59–72.
- ⁷⁵⁷ Oliver MH, Harding JE, Breier BH, Gluckman PD. Fetal insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-II are regulated differently by glucose or insulin in the sheep fetus. *Reprod Fertil Dev*. 1996;8:167–172.
- ⁷⁵⁸ Oliver MH, Harding JE, Breier BH, Evans PC, Gluckman PD. Glucose but not a mixed amino acid infusion regulates plasma insulin-like growth factor-I concentrations in fetal sheep. *Pediatr Res*. 1993;34:62–65.
- ⁷⁵⁹ Gluckman PD, Butler JH, Comline R, Fowden A. The effects of pancreatectomy on the plasma concentrations of insulin-like growth factors 1 and 2 in the sheep fetus. *J Dev Physiol*. 1987;9:79–88.
- ⁷⁶⁰ Gluckman PD, Harding JE. Fetal growth retardation: underlying endocrine mechanisms and postnatal consequences. *Acta Paediatr Suppl*. 1997;422:69–72.
- ⁷⁶¹ Kramer MS. Nutritional advice in pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;CD000149.
- ⁷⁶² Gitlin D, Kumate J, Morales C, Noriega L, Arevalo N. The turnover of amniotic fluid protein in the human conceptus. *Am J Obstet Gynecol*. 1972;113:632–645.
- ⁷⁶³ Phillips JD, Fonkalsrud EW, Mirzayan A, Kim CS, Kieu A, Zeng H, Diamond JM. Uptake and distribution of continuously infused intraamniotic nutrients in fetal rabbits. *J Pediatr Surg*. 1991;26:374–378.
- ⁷⁶⁴ Kimble RM, Breier BH, Gluckman PD, Harding JE. Enteral IGF-I enhances fetal growth and gastrointestinal development in oesophageal ligated fetal sheep. *J Endocrinol*. 1999;162:227–235.
- ⁷⁶⁵ Charlton V, Johengen M. Effects of intrauterine nutritional supplementation on fetal growth retardation. *Biol Neonate*. 1985;48:125–142.
- ⁷⁶⁶ Bloomfield FH, Bauer MK, van Zijl PL, Gluckman PD, Harding JE. Amniotic IGF-I supplements improve gut growth but reduce circulating IGF-I in growth-restricted fetal sheep. *Am J Physiol*. 2002;282:E259–E269.
- ⁷⁶⁷ Bloomfield FH, van Zijl PL, Bauer MK, Harding JE. A chronic low dose infusion of insulin-like growth factor I alters placental function but does not affect fetal growth. *Reprod Fertil Dev*. 2002;14:393–400.
- ⁷⁶⁸ Burrin DG, Wester TJ, Davis TA, Amick S, Heath JP. Orally administered IGF-I increases intestinal mucosal growth in formula-fed neonatal pigs. *Am J Physiol*. 1996;270:R1085–R1091.
- ⁷⁶⁹ Kim WK, Ryu YH, Seo DS, Lee CY, Ko Y. Effects of oral administration of insulin-like growth factor-I on circulating concentration of insulin-like growth factor-I and growth of internal organs in weanling mice. *Biol Neonate*. 1996;89:199–204.
- ⁷⁷⁰ Lorenzo M, Valverde AM, Teruel T, Benito M. IGF-I is a mitogen involved in differentiation-related gene expression in fetal rat brown adipocytes. *J Cell Biol*. 1993;123:1567–1575.
- ⁷⁷¹ Teruel T, Valverde AM, Alvarez A, Benito M, Lorenzo M. Differentiation of rat brown adipocytes during late foetal development: role of insulin-like growth factor I. *Biochem J*. 1995;310(Pt 3):771–776.
- ⁷⁷² Shaikh S, Bloomfield FH, Bauer MK, Phua HH, Gilmour RS, Harding JE. Amniotic IGF-I supplementation of growth-restricted fetal sheep alters IGF-I and IGF receptor type 1 mRNA and protein levels in placental and fetal tissues. *J Endocrinol*. 2005;186:145–155.
- ⁷⁷³ Bloomfield FH, Breier BH, Harding JE. Fate of (125)I-IGF-I administered into the amniotic fluid of late-gestation fetal sheep. *Pediatr Res*. 2005;51:361–369.
- ⁷⁷⁴ Kind KL, Owens JA, Lok F, Robinson JS, Quinn KJ, Mundy L, Gilmour RS, Owens PC. Intravenous infusion of insulin-like growth factor I in fetal sheep reduces hepatic IGF-I and IGF-II mRNAs. *Am J Physiol*. 1996;271:R1632–R1637.
- ⁷⁷⁵ Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999;402:656–660.
- ⁷⁷⁶ Kitamura S, Yokota I, Hosoda H, Kotani Y, Matsuda J, Naito E, Ito M, Kangawa K, Kuroda Y. Ghrelin concentration in cord and neonatal blood: relation to fetal growth and energy balance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:5473–5477.

- ⁷⁷⁷ Brubaker PL. The glucagon-like peptides: pleiotropic regulators of nutrient homeostasis. *Ann NY Acad Sci.* 2006;1070:10–26.
- ⁷⁷⁸ Gluckman PD, Morel PC, Ambler GR, Breier BH, Blair HT, McCutcheon SN. Elevating maternal insulin-like growth factor-I in mice and rats alters the pattern of fetal growth by removing maternal constraint. *J Endocrinol.* 1992;134:R1–R3.
- ⁷⁷⁹ Gallaher BW, Breier BH, Harding JE, Gluckman PD. Periconceptual undernutrition resets plasma IGFBP levels and alters the response of IGFBP-1, IGFBP-3 and IGF-I to subsequent maternal undernutrition in fetal sheep. *Prog Growth Factor Res.* 1995;6:189–195.
- ⁷⁸⁰ Clemmons DR. Insulinlike growth factor binding proteins. *Trends Endocrinol Metab.* 1990;1:412–417.
- ⁷⁸¹ Charlton VE, Reis BL. Effects of gastric nutritional supplementation on fetal umbilical uptake of nutrients. *Am J Physiol.* 1981;241:E178–E185.
- ⁷⁸² Alonso JG, Okai T, Longo LD, Gilbert RD. Cardiac function during long-term hypoxemia in fetal sheep. *Am J Physiol.* 1989;257:H581–H589.
- ⁷⁸³ Phillips JD, Fonkalsrud EW, Mirzayan A, Kim CS, Kieu A, Zeng H, Diamond JM. Uptake and distribution of continuously infused intraamniotic nutrients in fetal rabbits. *J Pediatr Surg.* 1991;26:374–378.
- ⁷⁸⁴ Phillips JD, Fonkalsrud EW, Mirzayan A, Kim CS, Kieu A, Zeng H, Diamond JM. Uptake and distribution of continuously infused intraamniotic nutrients in fetal rabbits. *J Pediatr Surg.* 1994;24:374–380.
- ⁷⁸⁵ Pitkin RM, Reynolds WA. Fetal ingestion and metabolism of amniotic fluid protein. *Am J Obstet Gynecol.* 1975;123:356–361.
- ⁷⁸⁶ Bloomfield FH, Bauer MK, Van Zijl PL, Gluckman PD, Harding JE. Amniotic IGF-I supplements improve gut growth but reduce circulating IGF-I in growthrestricted fetal sheep. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;282:259–296.
- ⁷⁸⁷ Kimura T, Murawaka Y, Ohno M, Ohtani S, Higaki K. Gastrointestinal absorption of recombinant human insulin-like growth factor-I in rats. *J Pharmacol Exp Therapeutics.* 1997;283:611–618.
- ⁷⁸⁸ Thornburg W, Matrisian L, Magun B, Koldovsky O. Gastrointestinal absorption of epidermal growth factor in suckling rats. *Am J Physiol.* 1984;246:G80–G85.
- ⁷⁸⁹ Odle J, Zijlstra RT, Donovan SM. Intestinal effects of milkborne growth factors in neonates of agricultural importance. *J Anim Sci.* 1996;74:2509–2522.
- ⁷⁹⁰ Tomoda S, Brace RA, Longo LD. Amniotic fluid volume and fetal swallowing rate in sheep. *Am J Physiol.* 1985;249:R133–R138.
- ⁷⁹¹ Rhoads RP, Greenwood PL, Bell AW, Boisclair YR. Organization and regulation of the gene encoding the sheep acid-labile subunit of the 150-kilodalton insulin-like growth factor-binding protein complex. *Endocrinology.* 2000;141:1425–1433.
- ⁷⁹² Wathen NC, Egembah S, Campbell DJ, Farkas A, Chard T. Levels of insulin-like growth factor-binding protein-I increase rapidly in amniotic fluid from 11 to 16 weeks of pregnancy. *J Endocrinol.* 1993;137:R1–R4.
- ⁷⁹³ Claussen M, Zapf J, Bräulke T. Proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-5 by pregnancy serum and amniotic fluid. *Endocrinology.* 1994;134:1964–1966.
- ⁷⁹⁴ Philipps AF, Dvorak B, King PJ, Grille JG, Koldovsky O. Presence of receptor active insulin-like growth factor-I (IGF-I) in blood after feeding in the suckling rat. *Pediatr Res.* 1999;45:A1696(abstr).
- ⁷⁹⁵ Donovan SM, Chao JC, Zijlstra RT, Odle J. Orally administered iodinated recombinant human insulin-like growth factor-I (125I-rhIGF-I) is poorly absorbed by the newborn piglet. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1997;24:174–182.
- ⁷⁹⁶ Bastian SEP, Walton PE, Ballard FJ, Belford DA. Transport of insulinlike growth factor-I across epithelial cell monolayers. *J Endocrinol.* 1999;162:361–369.
- ⁷⁹⁷ Bastian SE, Walton PE, Belford DA. Paracellular transport of insulin-like growth factor-I (IGF-I) across human umbilical vein endothelial cell monolayers. *J Cell Physiol.* 1997;170:290–298.
- ⁷⁹⁸ Trahair JF, Wing SJ, Horn JL. The effects of luminal growth factor (IGF-I) in the absence of fetal swallowing. *J Pediatr Surg.* 1995;30:1564–1570.
- ⁷⁹⁹ Weaver LT, Gonnella PA, Israel EJ, Walker WA. Uptake and transport of epidermal growth factor by the small intestinal epithelium of the fetal rat. *Gastroenterology.* 1990;98:828–837.
- ⁸⁰⁰ Kong W, Koldovsky O, Lake M, Anderson GG, Philipps AF. Organ distribution and biliary excretion of intravenously injected insulin-like growth factor-I in suckling rats. *Biol Neonate.* 1997;71:239–250.
- ⁸⁰¹ Kong W, Philipps AF, Dvorak B, Anderson GG, Lake M, Koldovsky O. Presence of insulin-like growth factor I but absence of the binding proteins in the bile of rats. *Am J Physiol.* 1995;268:R266–R271.
- ⁸⁰² Bastian SE, Walton PE, Ballard FJ, Belford DA. Transport of IGF-I across epithelial cell monolayers. *J Endocrinol.* 1999 Sep;162(3):361–9.
- ⁸⁰³ Walker WA, Cornell R, Davenport LM & Isselbacher KJ. Macromolecular absorption: mechanism of horseradish peroxidase uptake and transport in the adult and neonatal rat intestine.

Journal of Cell Biology. 1972;54:195–205.

⁸⁰⁴ Kiliaan AJ, Scholten G, Bijlsma PB, Dekker K, Gruct JA. Influence of forskolin and carbachol on intestinal absorption of horseradish peroxidase in the goldfish (*Carassius auratus*).

Cell and Tissue Research. 1996;285:51–56.

⁸⁰⁵ Thornburg W, Matrisian L, Magun B, Koldovsky O. Gastrointestinal absorption of epidermal growth factor in suckling rats. Am J Physiol. 1984;246:980–985.

⁸⁰⁶ Philipps AF, Rao R, McCracken D, Koldovsky O. Presence of insulin-like growth factor: (IGF-I) in rat milk and the absorption of IGF-I by the suckling rat. Ped Res. 1990;27:49A.

⁸⁰⁷ Corps AN, Brown KD. Stimulation of intestinal epithelial cell proliferation in culture by growth factors in human and ruminant mammary secretions. Journal of Endocrinology. 1987;113:285–290.

⁸⁰⁸ Read LC, Tomas FM, Howarth GS, Martin AA, Edson KJ, Gillespie CM, Owens PC & Ballard FJ. Insulin-like growth factor-I and its N-terminal modified analogues induce marked gut growth in dexamethasone-treated rats. Journal of Endocrinology. 1992;133:421–431.

⁸⁰⁹ Burrin DG, Wester TJ, Davis TA, Amick S, Heath JP. Orally administered IGF-I increases intestinal mucosal growth in formula-fed neonatal pigs. Am J Physiol. 1996;270:R1085–R1091.

⁸¹⁰ Vega JR, Gibson CA, Skaar TC, Hadsell DL, Baumrucker CR. Insulin-like growth factor (IGF)-I and -II and IGF binding proteins in serum and mammary secretions during the dry period and early lactation in dairy cows. Journal of Animal Science. 1991;69:2538–2547.

⁸¹¹ Olanrewaju HA, Sanzenbacher ED, Seidel ER. Insulin-like growth factor I in suckling rat gastric contents. Digestive Diseases and Sciences. 1996;41:1392–1397.

⁸¹² Baumrucker CR, Hadsell DL, Skaar TC, Campbell PG, Blum JW. Insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins in mammary secretions: origins and implications in neonatal physiology.

In: Mechanisms Regulating Lactation and Infant Nutrient Utilization, pp. 285–308.

Eds Picciano MF and Lonnerdal B. New York 1992; Wiley-Liss.

⁸¹³ Xu RJ, Wang T. Gastrointestinal absorption of insulin-like growth factor-I in neonatal pigs.

Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. 1996;23:430–437.

⁸¹⁴ LeRoith D, Werner H, Beitner Johnson D, Roberts CT Jr. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. Endocrine Reviews. 1995;16:143–163.

⁸¹⁵ Schober DA, Simmen FA, Hadsell DL, Baumrucker CR. Perinatal expression of type I IGF receptors in porcine small intestine. Endocrinology. 1990;126:1125–1132.

⁸¹⁶ Morgan CJ, Coutts AGP, McFadyen MC, King TP, Kelly D. Characterization of IGF-I receptors in the porcine small intestine during postnatal development. Journal of Nutritional Biochemistry. 1996;7:339–347.

⁸¹⁷ Heinz Erian P, Kessler U, Funk B, Gais P, Kiess W. Identification and in situ localization of the insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate (IGF-II/M6P) receptor in the rat gastrointestinal tract: comparison with the IGF-I receptor. Endocrinology. 1991;129:1769–1778.

⁸¹⁸ Pillion DJ, Haskell JF, Atchinson JA, Ganpathy V, Leibach FH. Receptors for IGF-I, but not for IGF-II, on proximal colon epithelial cell apical membranes. Am J Physiol. 1989;257: E27–E34.

⁸¹⁹ Hoeflich A, Yang Y, Kessler U, Heinz-Erian P, Kolb H, Kiess W. Human colon carcinoma cells (CaCo-2) synthesize IGF-II and express IGF-I receptors and IGF-II/M6P receptors.

Molecular and Cellular Endocrinology. 1994;101:141–150.

⁸²⁰ Jochims K, Kaup FJ, Drommer W, Pickel M. An immunoelectron microscopic investigation of colostral IgG absorption across the intestine of newborn calves. Research in Veterinary Science. 1994;57:75–80.

⁸²¹ Bendayan M, Ziv E, Gingras D, Ben-Sasson R, Bar OH, Kidron M. Biochemical and morpho-cytochemical evidence for the intestinal absorption of insulin in control and diabetic rats. Comparison between the effectiveness of duodenal and colon mucosa. Diabetologia. 1994;37:119–126.

⁸²² Vacher PY, Bestetti G, Blum JW. Insulin-like growth factor I absorption in the jejunum of neonatal calves. Biology of the Neonate. 1995;68:354–367.

⁸²³ Donovan SM, Chao JC, Zijlstra RT, Odle J. Orally administered iodinated recombinant human insulin-like growth factor-I (125I-rhIGF-I) is poorly absorbed by the newborn piglet.

Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. 1997;24:174–182.

⁸²⁴ Philipps AF, Anderson GC, Dvorak B, Williams CS, Lake M, Lebouton AV, Koldovsky O. Growth of artificially fed infant rats: effect of supplementation with insulin-like growth factor I.

American Journal of Physiology. 1997;272:R1532–R1539.

⁸²⁵ Martin JL, Baxter RC. Inhibition of human fibroblast insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) production by IGFBP-3. Endocrinology. 1992;131:1568–1570.

⁸²⁶ Simmons JG, Hoyt EC, Westwick JK, Brenner DA, Pucilowska JB, Lund PK. Insulin-like growth factor-I and epidermal growth factor interact to regulate growth and gene expression in IEC-6 intestinal epithelial cells. Molecular Endocrinology. 1995;9:1157–1165.

- ⁸²⁷ Fawcett J, Rabkin R. The processing of insulin-like growth factor-I (IGF-I) by a cultured kidney cell line is altered by IGF-binding protein-3. *Endocrinology*. 1995;136:1340–1347.
- ⁸²⁸ Hammerman MR, Rogers S. Distribution of IGF receptors in the plasma membrane of proximal tubular cells. *Am J Physiol*. 1987;253:F841–F847.
- ⁸²⁹ Bastian SEP, Walton PE, Belford DA. Paracellular transport of insulin-like growth factor-I (IGF-I) across human umbilical vein endothelial cell monolayers. *Journal of Cellular Physiology*. 1997;170:290–298.
- ⁸³⁰ Kling DE, Schnitzer JJ. Vitamin A deficiency (VAD), teratogenic and surgical models of congenital diaphragmatic hernia (CDH). *Am J Med Genet Part C, Semin Med Genet*. 2007;145C:139–157.
- ⁸³¹ Mendelsohn C, Lohnes D, Decimo D, Lufkin T, LeMeur M, Chambon P, Mark M. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development*. 1994;120:2749–2771.
- ⁸³² Mascrez B, Mark M, Dierich A, Ghyselinck NB, Kastner P, Chambon P. The RXR(alpha) ligand-dependent activation function 2 (AF-2) is important for mouse development. *Development*. 1998;125:4691–4707.
- ⁸³³ O'Byrne SM, Wongsiriroj N, Libien J, Vogel S, Goldberg IJ, Baehr W, Palczewski K, Blaner WS. Retinoid absorption and storage is impaired in mice lacking lecithin:retinol acyltransferase (LRAT). *J Biol Chem*. 2005;280:35647–35657.
- ⁸³⁴ Harrison EH. Mechanisms of digestion and absorption of dietary vitamin A. *Annu Rev Nutr*. 2005;25:87–103.
- ⁸³⁵ Mic FA, Molotkov A, Fan X, Cuenca AE, Duester G. RALDH3, a retinaldehyde dehydrogenase that generates retinoic acid, is expressed in the ventral retina, otic vesicle and olfactory pit during mouse development. *Mech Dev*. 2000;97:227–230.
- ⁸³⁶ Sapin V, Ward SJ, Bronner S, Chambon P, Dolle P. Differential expression of transcripts encoding retinoid binding proteins and retinoic acid receptors during placentation of the mouse. *Dev Dyn*. 1997;208:199–210.
- ⁸³⁷ Abu-Abed S, MacLean G, Fraulob V, Chambon P, Petkovich M, Dolle P. Differential expression of the retinoic acid-metabolizing enzymes CYP26A1 and CYP26B1 during murine organogenesis. *Mech Dev*. 2002;110:173–177.
- ⁸³⁸ Niederreither K, Subbarayan V, Dolle P, Chambon P. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse postimplantation development. *Nat Genet*. 1999;21:444–448.
- ⁸³⁹ Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*. 1995;83:841–850.
- ⁸⁴⁰ Kastner P, Mark M, Chambon P. Nonsteroid nuclear receptors: What are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell*. 1995;83:859–869.
- ⁸⁴¹ Mattei MG, Rivière M, Krust A, Ingvarsson S, Vennström B, Islam MQ, Levan G, Kautner P, Zelent A, Chambon P, Szpirer J, Szpirer C. Chromosomal assignment of retinoic acid receptor (RAR) genes in the human, mouse, and rat genomes. *Genomics*. 1991 Aug;10(4):1061–9.
- ⁸⁴² Leid M, Kastner P, Chambon P. Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends Biochem Sci*. 1992;17:427–433.
- ⁸⁴³ Mendelsohn C, Larkin S, Mark M, LeMeur M, Clifford J, Zelent A, Chambon P. RAR beta isoforms: Distinct transcriptional control by retinoic acid and specific spatial patterns of promoter activity during mouse embryonic development. *Mech Dev*. 1994;45:227–241.
- ⁸⁴⁴ Mendelsohn C, Mark M, Dolle P, Dierich A, Gaub MP, Krust A, Lampron C, Chambon P. Retinoic acid receptor beta 2 (RAR beta 2) null mutant mice appear normal. *Dev Biol*. 1994;166:246–258.
- ⁸⁴⁵ Taimi M, Helvig C, Wisniewski J, Ramshaw H, White J, Amad M, Korczak B, Petkovich M. A novel human cytochrome P450, CYP26C1, involved in metabolism of 9-cis and all-trans isomers of retinoic acid. *J Biol Chem*. 2004;279:77–85.
- ⁸⁴⁶ Warkany MD, Roth CB, Wilson JG. Multiple congenital malformations: A consideration of etiologic factors. *J Pediatrics*. 1948;1:462–471.
- ⁸⁴⁷ Wellik DM, Norback DH, DeLuca HF. Retinol is specifically required during midgestation for neonatal survival. *Am J Physiol*. 1997;272:E25–29.
- ⁸⁴⁸ Wilson JG, Roth CB, Warkany J. An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. *Am J Anat*. 1953;92:189–217.
- ⁸⁴⁹ Dowling JE, Wald G. The biological function of vitamin A acid. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1960;46:587–608.
- ⁸⁵⁰ Wellik DM, DeLuca HF. Retinol in addition to retinoic acid is required for successful gestation in vitamin A-deficient rats. *Biol Reprod*. 1995;53:1392–1397.
- ⁸⁵¹ Tzimas G, Collins MD, Nau H. Developmental stage-associated differences in the transplacental distribution of 13-cis- and alltrans-retinoic acid as well as their glucuronides in rats and mice.

Toxicol Appl Pharmacol. 1995;133:91–101.

⁸⁵² Scribner KB, Odom DP, McGrane MM. Nuclear receptor binding to the retinoic acid response elements of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in vivo: Effects of vitamin A deficiency.

J Nutr Biochem. 2007 Mar;18(3):206-14. Epub 2006 May 19.

⁸⁵³ Kimmel CA, Wilson JG, Schumacher HJ. Studies on metabolism and identification of the causative agent in aspirin teratogenesis in rats. Teratology. 1971;4:15–24.

⁸⁵⁴ Barr M Jr. The teratogenicity of cadmium chloride in two stocks of Wistar rats. Teratology. 1993;7:237–242.

⁸⁵⁵ Cappon GD, Cook JC, Hurtt ME. Relationship between cyclooxygenase 1 and 2 selective inhibitors and fetal development when administered to rats and rabbits during the sensitive periods for heart development and midline closure. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. 2003;68:47–56.

⁸⁵⁶ Tuffs A. Organic meat products contaminated with carcinogenic herbicide. BMJ. 2002;324:1416.

⁸⁵⁷ Hurt SS, Smith JM, Hayes AW. Nitrofen: A review and perspective. Toxicology. 1983;29:1–37.

⁸⁵⁸ Ortiz GG, Fera-Velasco A, Falcon-Franco MA, Bitzer-Quintero OK, Garcia JJ, Rosales SA, Ruiz-Rizo L, Reiter RJ. Different patterns in the histology and autofluorescence of the Harderian glands of the Syrian Hamster, rat, mouse, mongolian gerbil and guinea pig. Anat Histol Embryol. 2001;30:107–115.

⁸⁵⁹ Harkness JE, Ridgway MD. Chromodacryorrhea in laboratory rats (*Rattus norvegicus*): Etiologic considerations. Lab Anim Sci. 1980;30:841–844.

⁸⁶⁰ Gray LE Jr, Kavlock RJ. The effects of the herbicide 2,4-dichlorophenyl-p-nitrophenyl ether (NIT) on serum thyroid hormones in adult female mice. Toxicol Lett. 1983;15:231–235.

⁸⁶¹ Wickman D, Siebert J, Benjamin D. Nitrofen induced congenital diaphragmatic defects in CD-1 mice. Teratology. 1993;47:119–125.

⁸⁶² Kang YJ, Zolna L, Manson JM. Strain differences in response of Sprague-Dawley and Long Evans Hooded rats to the teratogen nitrofen. Teratology. 1986;34:213–223.

⁸⁶³ Gosney JR, Okoye BO, Lloyd DA, Losty PD. Pulmonary neuroendocrine cells in nitrofen-induced diaphragmatic hernia and the effect of prenatal glucocorticoids. Pediatr Surg Int. 1999;15:180–183.

⁸⁶⁴ Thebaud B, Tibboel D, Rambaud C, Mercier JC, Bourbon JR, Dinh-Xuan AT, Archer SL. Vitamin A decreases the incidence and severity of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in rats. Am J Physiol. 1999;277:423–429.

⁸⁶⁵ Yu J, Gonzalez S, Diez-Pardo JA, Tovar JA. Effects of early embryonal exposure to dexamethasone on malformations of neural-crest derivatives induced by nitrofen in rats. Pediatr Surg Int. 2002;18:606–610.

⁸⁶⁶ Yu J, Gonzalez S, Diez-Pardo JA, Tovar JA. Effects of vitamin A on malformations of neural-crest-controlled organs induced by nitrofen in rats. Pediatr Surg Int. 2002;18:600–605.

⁸⁶⁷ Yu J, Gonzalez S, Rodriguez JI, Diez-Pardo JA, Tovar JA. Neural crest-derived defects in experimental congenital diaphragmatic hernia. Pediatr Surg Int. 2001;17:294–298

⁸⁶⁸ Costlow RD, Hirsekorn JM, Stiratelli RG, O'Hara GP, Black DL, Kane WW, Burke SS, Smith JM, Hayes AW. The effects on rat pups when nitrofen (4-(2,4-dichlorophenoxy) nitrobenzene) was applied dermally to the dam during organogenesis. Toxicology. 1983;28:37–50.

⁸⁶⁹ Montedonico S, Nakazawa N, Puri P. Retinoic acid rescues lung hypoplasia in nitrofen-induced hypoplastic foetal rat lung explants. Pediatr Surg Int. 2006;22:2–8.

⁸⁷⁰ Nakazawa N, Montedonico S, Takayasu H, Paradisi F, Puri P. Disturbance of retinol transportation causes nitrofen-induced hypoplastic lung. J Pediatr Surg. 2007;42:345–349.

⁸⁷¹ Nakazawa N, Takayasu H, Montedonico S, Puri P. Altered regulation of retinoic acid synthesis in nitrofen-induced hypoplastic lung. Pediatr Surg Int. 2007 May;23(5):391-6.

⁸⁷² Francis BM, Metcalf RL, Lewis PA, Chernoff N. Maternal and developmental toxicity of halogenated 4'-nitrodiphenyl ethers in mice. Teratology. 1999;59:69–80.

⁸⁷³ Lohnes D, Kastner P, Dierich A, Mark M, LeMour M, Chambon P. Function of retinoic acid receptor gamma in the mouse. Cell. 1993;73:643–658.

⁸⁷⁴ Ruttenstock E, Doi T, Dingemann J, Puri P. Downregulation of insulin-like growth factor binding protein 3 and 5 in nitrofen-induced pulmonary hypoplasia. Pediatr Surg Int. 2010 Jan;26(1):59-63.

⁸⁷⁵ Smith SM, Dickman ED, Power SC, Lancman J. Retinoids and their receptors in vertebrate embryogenesis.

J Nutr. 1998 Feb;128(2 Suppl):467S-470S.

⁸⁷⁶ Zile M. Function of vitamin A in vertebrate embryonic development. J Nutr. 2001;128:455S–485S.

⁸⁷⁷ Zile M. Vitamin A and embryonic development: an overview. J Nutr. 1998;128:455S–458S.

⁸⁷⁸ Price WA, Stiles AD. The insulin-like growth factor system and lung. In: Mendelson CR (ed) Endocrinology of the lung. Humana Press Inc, Totowa, pp. 201–208. 2002.

⁸⁷⁹ Ricort J-M. Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) signaling. Growth Horm IGF Res. 2004;14:277–286.

- ⁸⁸⁰ Retsch-Bogart GZ, Moats-Staats BM, Howard K, D'Ercole AJ, Stiles AD. Cellular localization of messenger RNAs for insulin-like growth factors (IGFs), their receptors and binding proteins during fetal rat lung development. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1996;14:61–69.
- ⁸⁸¹ Pavelic J, Matijevic T, Knezevic J. Biological and physiological aspects of action of insulin-like growth factor peptide family. *Indian J Med Res.* 2007;125:511–522.
- ⁸⁸² Schedlich LJ, Young TF, Firth SM, Baxter RC. Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-3 and IGFBP-5 share a common nuclear transport pathway in T47D human breast carcinoma cells. *J Biol Chem.* 1998;273:18347–18352.
- ⁸⁸³ Zachman RD. Role of vitamin A in lung development. *J Nutr.* 1995;125:1634S–1638S.
- ⁸⁸⁴ Chen MH, MacGowan A, Ward S, Bavik C, Greer JJ. The activation of the retinoic acid response element is inhibited in an animal model of congenital diaphragmatic hernia. *Biol Neonate.* 2003;83:157–161.
- ⁸⁸⁵ Nakazawa N, Montedonico S, Takayasu H, Paradisi F, Puri P. Disturbance of retinol transportation causes nitrofen induced hypoplastic lung. *J Pediatr Surg.* 2007;42:345–349.
- ⁸⁸⁶ Liu B, Lee HY, Weinzimer SA, Powell DR, Clifford JL, Kurie JM, Cohen P. Direct functional interaction between insulin like growth factor binding protein-3 and retinoid X receptor alpha regulate transcriptional signaling and apoptosis. *J Biol Chem.* 2000 Oct 27;275(43):33607-13.
- ⁸⁸⁷ Kimura Y, Suzuki T, Kaneko C, Darnel AD, Moriya T, Suzuki S, Handa M, Ebina M, Nukiwa T, Sasano H. Retinoid receptors in the developing human lung. *Clin Sci (Lond).* 2002 Dec;103(6):613-21.
- ⁸⁸⁸ Hiden U, Glitzner E, Hartmann M, Desoye G. Insulin and the IGF system in the human placenta of normal and diabetic pregnancies. *J Anat.* 2009 Jul;215(1):60-8. Epub 2009 May 7.
- ⁸⁸⁹ Warburton D, Schwarz M, Tefft D, FloresDelgado G, Anderson KD, Cardoso WV. The molecular basis of lung morphogenesis. *Mech Dev.* 2000;92:55–81.
- ⁸⁹⁰ Pichel JG, Fernandez-Moreno C, Vicarino-Abejon C, Testillano PS, Patterson PH, De Pablo F. Developmental cooperation of leukemia inhibitory factor and insulin-like growth factor I in mice is tissue-specific and essential for lung maturation involving the transcription factors Sp3 and TTF1. *Mech Dev.* 2003;120:349–361.
- ⁸⁹¹ Moreno-Barriuso N, López-Malpartida AV, de Pablo F, Pichel JG. Alterations in alveolar epithelium differentiation and vasculogenesis in lungs of LIF/IGF-I double deficient embryos. *Dev Dyn.* 2006;235:2040–2050.
- ⁸⁹² Silva D, Venihaki M, Guo WH, Lopez MF. Igf II deficiency results in delayed lung development at the end of gestation. *Endocrinology.* 2007;147:5584–5591.
- ⁸⁹³ Han RN, Post M, Tanswell AK, Lye SJ. Insulin-like growth factor-I receptor-mediated vasculogenesis/angiogenesis in human lung development. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;28:159–169.
- ⁸⁹⁴ Wang ZQ, Fung MR, Barlow DP, Wanger EF. Regulation of embryonic growth and lysosomal targeting by the imprinted *Igf2/Mpr* gene. *Nature.* 1994;372:464–467.
- ⁸⁹⁵ Frasca F, Pandini G, Scalia P, Sciacca L, Mineo R, Costantino A, Goldfine ID, Belfiore A, Vigneri R. Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol Cell Biol.* 1999 May;19(5):3278-88.
- ⁸⁹⁶ Pandini G, Frasca F, Mineo R, Sciacca L, Vigneri R, Belfiore A. Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *J Biol Chem.* 2002 Oct 18;277(42):39684-95. Epub 2002 Jul 22.
- ⁸⁹⁷ Hwa V, OH Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev.* 1999;20:761–787.
- ⁸⁹⁸ Allan GJ, Flint DJ, Patel K. Insulin-like growth factor axis during embryonic development. *Reproduction.* 2001;122,31–39.
- ⁸⁹⁹ Denley A, Cosgrove LJ, Booker GW, Wallace JC, Forbes BE. Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16,421–439.
- ⁹⁰⁰ Clemmons DR. Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions. *Mol Cell Endocrinol.* 1998;140,19–24.
- ⁹⁰¹ Forbes K, Westwood M. The IGF axis and placental function. A mini review. *Horm Res.* 2008;69,129–137.
- ⁹⁰² Deal C. Possible decidual origin of human IGFBP-3 protease activity during pregnancy. *Proceedings of the 74th Annual Meeting of The Endocrine Society, 1992.*
- ⁹⁰³ Giudice LC, Farrell EM, Pham H, Lamson G, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factor binding proteins in maternal serum throughout gestation and in the puerperium: effects of apregnancy-associated serum protease activity. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990;71,806–816.

- ⁹⁰⁴ Westwood M, Gibson JM, Davies AJ, Young RJ, White A. The phosphorylation pattern of insulin-like growth factorbinding protein-1 in normal plasma is different from that in amniotic fluid and changes during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;79:1735–1741.
- ⁹⁰⁵ Coppock HA, White A, Aplin JD, Westwood M. Matrix metalloprotease-3 and -9 proteolyze insulin-like growth factorbinding protein-1. *Biol Reprod.* 2004;71:438–443.
- ⁹⁰⁶ Nelson SM, Freeman DJ, Sattar N, Lindsay RS. Role of adiponectin in matching of fetal and placental weight in mothers with type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2008;31:1123–1125.
- ⁹⁰⁷ Ong CY, Lao TT, Spencer K, Nicolaidis KH. Maternal serum level of placental growth factor in diabetic pregnancies. *J Reprod Med.* 2004;49:477–480.
- ⁹⁰⁸ Masumoto K, de Rooij JR, Suita S, Rottier R, Tibboel D, de Krijger RR. The distribution of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the lungs of congenital diaphragmatic hernia patients and age-matched controls. *Histopathology.* 2006;48:588–595.
- ⁹⁰⁹ Zhou L, Lim L, Costa RH, Whitsett JA. Thyroid transcription factor-1, hepatocyte nuclear factor-3b, surfactant protein B,C, and Clara cell secretory protein in developing mouse lung. *J Histochem Cytochem.* 1996;44:1183–1193.
- ⁹¹⁰ Esumi G, Masumoto K, Teshiba R, Nagata K, Kinoshita Y, Yamaza H, Nonaka K, Taguchi T. Effect of insulin-like growth factors on lung development in a nitrofen-induced CDH rat model. *Pediatr Surg Int.* 2011 Feb;27(2):187-92.
- ⁹¹¹ Rutenstock E, Doi T, Dingemann J, Puri P. Insulin-like growth factor receptor type 1 and type 2 are downregulated in the nitrofen-induced hypoplastic lung. *J Pediatr Surg.* 2010;45:1349–1353. doi:10.1016/j.jpedsurg.2010.02.111
- ⁹¹² Williams MC. Alveolar type I cells: molecular phenotype and development. *Annu Rev Physiol.* 2003;65:669–695. doi:10.1146/annurev.physiol.65.092101.142446
- ⁹¹³ Stewart CEH, Rotwein P. Growth, differentiation and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol Rev.* 1996;76:1005–1026.
- ⁹¹⁴ Rutenstock E, Doi T, Dingemann J, Puri P. Insulin receptor is downregulated in the nitrofen-induced hypoplastic lung. *J Pediatr Surg.* 2010 May;45(5):948-52.
- ⁹¹⁵ Felts J. Biochemistry of the lung. *Health Phys* 1964;10:973-9.
- ⁹¹⁶ Snyder JG, Miakotina O. Insulin and lung development. In: Mendelson CR, editor. *Endocrinology of the lung development and surfactant synthesis.* Totowa (NJ): Human Press Inc; 2000. p. 181-200.
- ⁹¹⁷ Gewolb IH, O'Brien J, Palese TA, Phillip M. High glucose and insulin decrease fetal lung insulin receptor mRNA and tyrosine kinase activity in vitro. *Biochem Biophys Res Comm.* 1994;202:694-700.
- ⁹¹⁸ Zmora E, Gewolb IH, Shapiro DL. Effects of insulin and glucose on pulmonary insulin receptors in late gestation fetal rats. *Exp Lung Res.* 1992;18:247-58.
- ⁹¹⁹ Ulane RE, Graeber JE, Hansen JW, Liccini L, Cornblath M. Insulin receptors in developing fetal lung. *Life Sci.* 1982;31:3017-22.
- ⁹²⁰ Mendelson CR, Boggaram V. Regulation of pulmonary surfactant protein synthesis in fetal lung: a major role of glucocorticoids and cyclic AMP. *Trends Endocrinol Metab.* 1989;1:20-5.
- ⁹²¹ Roberts CT, Owens JA, Sferruzzi-Perri AN. Distinct actions of insulin-like growth factors (IGFs) on placental development and fetal growth: lessons from mice and guinea pigs. *Placenta.* 2008 Mar;29 Suppl A:S42-7. Epub 2008 Jan 11.
- ⁹²² Lopez MF, Dikkes P, Zurakowski D, Villakomaroff L. Insulin-like growth factor II affects the appearance and glycogen content of glycogen cells in the murine placenta. *Endocrinology.* 1996;137:2100-8.
- ⁹²³ Kanai-Azuma M, Kanai Y, Kurohmaru M, Sakai S, Hayashi Y. Insulinlike growth factor (IGF)-I stimulates proliferation and migration of mouse ectoplacental cone cells, while IGF-II transforms them into trophoblastic giant cells in vitro. *Biol Reprod.* 1993;48:252-61.
- ⁹²⁴ Pringle KG, Roberts CT. New light on early post-implantation pregnancy in the mouse: roles for insulin-like growth factor-II (IGF-II)? *Placenta.* 2007;28:286-97.
- ⁹²⁵ Han VK, Carter AM. Spatial and temporal patterns of expression of messenger RNA for insulin-like growth factors and their binding proteins in the placenta of man and laboratory animals. *Placenta.* 2000;21:289-305.
- ⁹²⁶ Sohlström A, Katsman A, Kind KL, Roberts CT, Owens PC, Robinson JS, Owens JA. Food restriction alters pregnancy-associated changes in IGF and IGFBP in the guinea pig. *Am J Physiol.* 1998;274:E410-6.
- ⁹²⁷ Roberts CT, Sohlstrom A, Kind KL, Grant PA, Earl RA, Robinson JS, Khong TY, Owens PC, Owens JA. Altered placental structure induced by maternal food restriction in guinea pigs: a role for circulating IGF-II and IGFBP-2 in the mother? *Placenta.* 2001 Apr;22 Suppl A:S77-82.
- ⁹²⁸ Olausson H, Sohlstrom A. Effects of food restriction and pregnancy on the expression of insulin-like growth factors-I and -II in tissues from guinea pigs. *J Endocrinol.* 2003;179:437-45.

- ⁹²⁹ Sferruzzi-Perri AN, Owens JA, Pringle KG, Robinson JS, Roberts CT. Maternal insulin-like growth factors-I and -II act via different pathways to promote fetal growth. *Endocrinology*. 2006;147:3344-55.
- ⁹³⁰ Sohlstrom A, Fernberg P, Owens JA, Owens PC. Maternal nutrition affects the ability of treatment with IGF-I and IGF-II to increase growth of the placenta and fetus, in guinea pigs. *Growth Horm IGF Res*. 2001;11:392-8.
- ⁹³¹ Sferruzzi-Perri AN, Owens JA, Standen P, Taylor RL, Robinson JS, Roberts CT. Early pregnancy maternal endocrine insulin-like growth factor I programs the placenta for increased functional capacity throughout gestation. *Endocrinology*. 2007;148:4362-70.
- ⁹³² Sferruzzi-Perri AN, Owens JA, Standen P, Taylor RL, Heinemann GK, Robinson JS, Roberts CT. Early treatment of the pregnant guinea pig with IGFs promotes placental transport and nutrient partitioning near term. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;292:E668-76.
- ⁹³³ Gargosky SE, Owens JA, Walton PE, Owens PC, Wallace JC, Ballard FJ. Insulin-like growth factor-I, but not growth hormone, increases maternal weight gain in late pregnancy without affecting fetal or placental growth. *J Endocrinol*. 1991;130:395-400.
- ⁹³⁴ Gluckman PD, Morel PCH, Ambler BH, Breier HT, McCutcheon SN. Elevating maternal insulin-like growth factor-I in mice and rats alters the pattern of fetal growth by removing maternal constraint. *J Endocrinol*. 1992;134:R1-3.
- ⁹³⁵ Ong K, Kratzsch J, Kiess W, Costello M, Scott C, Dunger D. Size at birth and cord blood levels of insulin, insulin-like growth factor I (IGF-I), IGFII, IGF-binding protein-1 (IGFBP-1), IGFBP-3, and the soluble IGF-II/ mannose-6-phosphate receptor in term human infants. The ALSPAC Study Team. *Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood. J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:4266-9.
- ⁹³⁶ Morrione A, Valentinis B, Xu SQ, Yumet G, Louvi A, Efstratiadis A, Baserga R. Insulin-like growth factor II stimulates cell proliferation through the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:3777-82.
- ⁹³⁷ Louvi A, Accili D, Efstratiadis A. Growth-promoting interaction of IGFII with the insulin receptor during mouse embryonic development. *Dev Biol*. 1997;189:33-48.
- ⁹³⁸ Denley A, Bonython ER, Booker GW, Cosgrove LJ, Forbes BE, Ward CW, Wallace JC. Structural determinants for high-affinity binding of insulin-like growth factor II to insulin receptor (IR)-A, the exon 11 minus isoform of the IR. *Mol Endocrinol*. 2004;18:2502-12.
- ⁹³⁹ Desoye G, Hartmann M, Jones CJ, Wolf HJ, Kohlen G, Kosanke G, Kaufmann P. Location of insulin receptors in the placenta and its progenitor tissues. *Microsc Res Tech*. 1997;38:63-75.
- ⁹⁴⁰ Lau MM, Stewart CE, Liu Z, Bhatt H, Rotwein P, Stewart CL. Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. *Genes Dev*. 1994;8:2953-63.
- ⁹⁴¹ Ludwig T, Eggenschwiler J, Fisher P, D'Ercole AJ, Davenport ML, Efstratiadis A. Mouse mutants lacking the type 2 IGF receptor (IGF2R) are rescued from perinatal lethality in *Igf2* and *Igf1r* null backgrounds. *Dev Biol*. 1996;177:517-35.
- ⁹⁴² Carter AM, Kingston MJ, Han KK, Mazza DM, Nygard K, Han VK. Altered expression of IGFs and IGF-binding proteins during intrauterine growth restriction in guinea pigs. *J Endocrinol*. 2005;184:179-89.
- ⁹⁴³ Bohé J, Ding H, Qing DP, Yoon K, Hirschberg R, Wolfgang GH, Kopple JD. IGF-I binding proteins, IGF-I binding protein mRNA and IGF-I receptor mRNA in rats with acute renal failure given IGF-I. *Kidney Int*. 1998 Oct;54(4):1070-82.
- ⁹⁴⁴ Jones JJ, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: Biological actions. *Endocr Rev*. 1995;16:3-34.
- ⁹⁴⁵ Hirschberg R, Kopple JD. Evidence that insulin-like growth factor I increases renal plasma flow and glomerular filtration rate in fasted rats. *J Clin Invest*. 1989;83:326-330.
- ⁹⁴⁶ Hirschberg R. Bioactivity of glomerular ultrafiltrate during heavy proteinuria may contribute to renal tubulo-interstitial lesions. Evidence for a role for insulin-like growth factor I. *J Clin Invest*. 1996;98:116-124.
- ⁹⁴⁷ Andersson G, Jennische E. IGF-I immunoreactivity is expressed by regenerating renal tubular cells after ischaemic injury in the rat. *Acta Physiol Scand*. 1988;132:453-457.
- ⁹⁴⁸ Matejka GL, Jennische E. IGF-I binding and IGF-I mRNA expression in the post-ischemic regenerating rat kidney. *Kidney Int*. 1992;42:1113-1123.

- ⁹⁴⁹ Friedlander M, Popovotzer MM, Weiss O, Nefesh I, Koplovic J, RAZ I. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) enhances recovery from HgCl₂-induced acute renal failure: The effects on renal IGF-1, IGF-1 receptor, and IGF-binding protein-1 mRNA. *J Am Soc Nephrol.* 1995;5:1782–1791.
- ⁹⁵⁰ Tsao T, Wang J, Ferevenza FC, Vuth Jin IH, Hoffman AR, Rabkin R. Renal growth hormone—Insulin-like growth factor-I system in acute renal failure. *Kidney Int.* 1995;47:1658–1668.
- ⁹⁵¹ Hise MK, Li L, Mantzouris N, Rohan RM. Differential mRNA expression of insulin-like growth factor system during renal injury and hypertrophy. *Am J Physiol.* 1995;269:F817–F824.
- ⁹⁵² Ding H, Kopple JD, Cohen A, Hirschberg R. Recombinant human insulin-like growth factor-I accelerates recovery and reduces catabolism in rats with ischemic acute renal failure. *J Clin Invest.* 1993;91:2281–2287.
- ⁹⁵³ Clark R, Mortensen D, Rabkin R. Recovery from acute ischemic renal failure is accelerated by des-(1–3)-insulin-like growth factor-1. *Clin Sci.* 1994;86:709–714.
- ⁹⁵⁴ Miller SB, Martin DR, Kissane J, Hammerman MR. Insulin-like growth factor I accelerates recovery from ischemic acute tubular necrosis in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89:11876–11880.
- ⁹⁵⁵ Miller SB, Martin DR, Kissane J, Hammerman MR. Rat models for clinical use of insulin-like growth factor I in acute renal failure. *Am J Physiol.* 1994;266:F949–F956.
- ⁹⁵⁶ Zapf J, Kiefer M, Merryweather J, Musiarz F, Bauer D, Born W, Fischer JA, Froesch ER. Isolation from adult human serum of four insulin-like growth factor (IGF) binding proteins and molecular cloning of one of them that is increased by IGF-I administration and in extrapancreatic tumor hypoglycemia. *J Biol Chem.* 1990;265:14892–14898.
- ⁹⁵⁷ Böni-Schnetzler M, Schmid C, Mary JL, Zimmerli B, Meier PJ, Zapf J, Schwander J, Froesch ER. Insulin regulates the expression of the insulin-like growth factor binding protein 2 mRNA in rat hepatocytes. *Mol Endocrinol.* 1990;4:1320–1326.
- ⁹⁵⁸ Jacob R, Barrett E, Plewe G, Fagin KD, Sherwin RS. Acute effects of insulin-like growth factor I on glucose and amino acid metabolism in the awake fasted rat. Comparison with insulin. *J Clin Invest.* 1989;83:1717–1723.
- ⁹⁵⁹ Guler HP, Schmid C, Zapf J, Froesch ER. Effects of recombinant insulin-like growth factor I on insulin secretion and renal function in normal human subjects. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:2868–2872.
- ⁹⁶⁰ Boulware SD, Tamborlane WV, Matthews LS, Sherwin RS. Diverse effects of insulin-like growth factor I on glucose, lipid and amino acid metabolism. *Am J Physiol.* 1992;262:E130–E133.
- ⁹⁶¹ Young SC, Underwood LE, Celniker A, Clemmons DR. Effects of recombinant insulin-like growth factor I (IGF-I) and growth hormone on serum IGF binding proteins in calorically restricted adults. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992;75:603–608.
- ⁹⁶² Clemmons DR, Thissen JP, Maes M, Ketelslegers JM, Underwood LE. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) infusion into hypophysectomized or protein-deprived rats induces specific IGF-binding proteins in serum. *Endocrinology.* 1989;125:2967–2972.
- ⁹⁶³ Kupfer SR, Underwood LE, Baxter RC, Clemmons DR. Enhancement of the metabolic effects of growth hormone and insulinlike growth factor I by use of both agents simultaneously. *J Clin Invest.* 1993;91:391–396.
- ⁹⁶⁴ Baxter RC, Martin JL. Structure of the Mr 140,000 growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein complex: Determination by reconstitution and affinity-labeling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:6898–6902.
- ⁹⁶⁵ Kokot V. The endocrine system in patients with acute renal failure. *Proc Eur Dial Transplant.* 1981;18:617–629.
- ⁹⁶⁶ Massry SG, Smogorzinsky M. Metabolic and endocrine abnormalities in acute renal failure. In: *Textbook of Nephrology (vol 2)*, edited by Massry SG, Smogorzinsky M, Baltimore, Williams and Wilkins, 1995, pp. 1004–1013.
- ⁹⁶⁷ Nagata K, Masumoto K, Uesugi T, Yamamoto S, Yoshizaki K, Fukumoto S, Nonaka K, Taguchi T. Effect of insulin-like-growth factor and its receptors regarding lung development in fetal mice. *Pediatr Surg Int.* 2007 Oct;23(10):953-9.
- ⁹⁶⁸ Mülhardt C. *Der Experimentator. Molekularbiologie/Genomics*; 5. Auflage, Verlag: Elsevier.
- ⁹⁶⁹ Seyffert W. *Lehrbuch der Genetik*. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin 2003.
- ⁹⁷⁰ Schild TA. Einführung in die Real-Time TaqMan® PCR-Technologie. "7700 SDS Workshop"; Vers. 2.1. Applied Biosystems GmbH. Verfügbar unter: <http://www.core-facility.unifreiburg.de/lc480/lc480obj/sdsman> [Internet]. Abgerufen am 09.10.2011.
- ⁹⁷¹ Eisenberg E, Levanon EY. Human housekeeping genes are compact. *Trends Genet.* 2003 Jul;19(7):362-5.
- ⁹⁷² U.S. National Library of Medicine®. Verfügbar unter: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/HPRT1> [Internet]. Abgerufen am 22.07.2011.

- ⁹⁷³ The Board of Trustees of the University of South Carolina. Verfügbar unter: <http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm> [Internet]. Letzte Änderung: 01.07.2010; abgerufen am 28.08.2011.
- ⁹⁷⁴ Millipore®. Verfügbar unter: <http://www.millipore.com/immunodetection/id3/immunostainingprotocols#top> [Internet]. Abgerufen am 28.07.2011.
- ⁹⁷⁵ Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000;182, Nr. 3, S. 311–22.
- ⁹⁷⁶ Ghosh P, Dahms NM, Kornfeld S. Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(3):202–12.
- ⁹⁷⁷ Oida S, Iimura T, Maruoka Y, Takeda K, Sasaki S. Cloning and sequence of bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) from a human placental cDNA library. *DNA-Seq.* 1995;5(5):273–5.
- ⁹⁷⁸ Teramoto H, Yoneda A, Puri P. Gene expression of fibroblast growth factors 10 and 7 is downregulated in the lung of nitrofen-induced diaphragmatic hernia in rats. *J Pediatr Surg.* 2003;38:1021–1024.
- ⁹⁷⁹ Baker J, Liu J-P, Robertson EJ, and Efstratiadis A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell.* 1993;75:73–82.
- ⁹⁸⁰ Sell C, Dumenil G, Deveaud C, Miura M, Coppola D, DeAngelis T, Rubin R, Efstratiadis A, Baserga R. Effect of null mutation of the insulin-like growth factor I receptor on growth and transformation of mouse embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 1994;14:3604–3612.
- ⁹⁸¹ Liu J-P, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type I IGF receptor (Igf1r). *Cell.* 1993;75:59–72.
- ⁹⁸² Oshima A, Nolan CM, Kyle JW, Grubb JH, Sly WS. The human cation-independent mannose 6-phosphate receptor. Cloning and sequence of the full-length cDNA and expression of functional receptor in COS cells. *J Biol Chem.* 1988;263(5):2553–62.
- ⁹⁸³ Christophe D. The control of thyroid-specific gene expression: what exactly have we learned as yet? In: *Mol Cell Endocrinol.* 2004 Aug 31;223(1-2):1-4.
- ⁹⁸⁴ Guazzi S, Price M, De Felice M, Damante G, Mattei MG, Di Lauro R. Thyroid nuclear factor 1 (TTF-1) contains a homeodomain and displays a novel DNA binding specificity. *Embo J.* 1990;9(11):3631–9.
- ⁹⁸⁵ Kimura S, Hara Y, Pineau T, Fernandez-Salguero P, Fox CH, Ward JM, Gonzalez FJ. The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes Dev.* 1996; 10(1): 60-9.
- ⁹⁸⁶ Breiteneder-Geleff S, Matsui K, Soleiman A, Meraner P, Poczewski H, Kalt R, Schaffner G, Kerjaschki D. Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am J Pathol.* 1997;151(4): p. 1141-52.
- ⁹⁸⁷ Baluk P, McDonald DM. Markers for microscopic imaging of lymphangiogenesis and angiogenesis. *Ann NY Acad Sci.* 2008;1131,S. 1–12.
- ⁹⁸⁸ Ramirez MI, Millien G, Hinds A, Cao Y, Seldin DC, Williams MC. T1alpha, a lung type I cell differentiation gene, is required for normal lung cell proliferation and alveolus formation at birth. *Dev Biol.* 2003 Apr 1;256(1):61-72.
- ⁹⁸⁹ Schacht V, Ramirez MI, Hong YK, Hirakawa S, Feng D, Harvey N, Williams M, Dvorak AM, Dvorak HF, Oliver G, Detmar M. T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymph-edema. *Embo J.* 2003;22(14): p. 3546-56.
- ⁹⁹⁰ Ruf J, Carayon P. Structural and functional aspects of thyroid peroxidase. *Arch. Biochem Biophys.* 2006;445(2):269–77.
- ⁹⁹¹ Ueyama H, Bruns G, Kanda N. Assignment of the vascular smooth muscle actin gene ACTSA to human chromosome 10. *Jinrui Idengaku Zasshi.* 1990;35(2):145–50.
- ⁹⁹² <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=59> [Internet]. Abgerufen am 03.10.2011.
- ⁹⁹³ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=2321> [Internet]. Abgerufen am 03.10.2011.
- ⁹⁹⁴ Takashi M, Rosenberg RD, Aird WC. Transforming Growth Factor- β 1-mediated Inhibition of the flk-1/KDR Gene Is Mediated by a 5'-Untranslated Region Palindromic GATA Site. *J Biol Chem.* 2001;Vol. 276, No. 7, p. 5395–5402.
- ⁹⁹⁵ Yla-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol.* 2007 Mar 13;49(10):1015–26.
- ⁹⁹⁶ Cébe Suarez S, Pieren M, Cariolato L, Arn S, Hoffmann U, Bogucki A, Manlius C, Wood J,

- Ballmer-Hofer K. A VEGF-A splice variant defective for heparan sulfate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through VEGFR-2. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2006;63:S. 2067–2077.
- ⁹⁹⁷ <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PLAT> [Internet]. Abgerufen am 15.09.2011.
- ⁹⁹⁸ Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, White GC, Lyman S, Paddock C, Muller WA. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science*. 1990;247(4947):1219–22.
- ⁹⁹⁹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=5175> [Internet]. Abgerufen am 07.10.2011.
- ¹⁰⁰⁰ Yakar S, Rosen CJ, Beamer WG, Ackert-Bicknell CL, Wu Y, Liu JL, Ooi GT, Setser J, Frystyk J, Boisclair YR, LeRoith D. Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *J Clin Invest*. 2002 Sep;110(6):771–81.
- ¹⁰⁰¹ Harris LK, Crocker IP, Baker PN, Aplin JD, Westwood M. IGF2 actions on trophoblast in human placenta are regulated by the insulin-like growth factor 2 receptor, which can function as both a signaling and clearance receptor. *Biol Reprod*. 2011 Mar;84(3):440–6. Epub 2010 Oct 27.
- ¹⁰⁰² Colorado State University. Hypertexts for Biomedical Sciences. Verfügbar unter: <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathophys/endocrine/otherendo/igfs.html> [Internet]. Abgerufen am 30.11.2011.
- ¹⁰⁰³ Jensen EC, Harding JE, Bauer MK, Gluckman PD. Metabolic effects of IGF-I in the growth retarded fetal sheep. *J Endocrinol*. 1999 Jun;161(3):485–94.
- ¹⁰⁰⁴ Birner P, Ritz M, Musahl C, Knippers R, Gerdes J, Voigtländer T, Budka H, Hainfellner JA. Immunohistochemical detection of cell growth fraction in formalin-fixed and paraffin-embedded murine tissue. *Am J Pathol*. 2001 Jun;158(6):1991–6.
- ¹⁰⁰⁵ Mayer S, Klaritsch P, Sbragia L, Toelen J, Till H, Deprest JA. Maternal administration of betamethasone inhibits proliferation induced by fetal tracheal occlusion in the nitrofen rat model for congenital diaphragmatic hernia: a placebo-controlled study. *Pediatr Surg Int*. 2008 Dec;24(12):1287–95.

Quellenverzeichnis der Fußnoten

- ⁽¹⁾ Pschyrembel. *Klinisches Wörterbuch*. De Gruyter Verlag Berlin, 1997.
- ⁽²⁾ Drews U. *Taschenatlas der Embryologie*. Georg Thieme Verlag, 2006.
- ⁽³⁾ Timpl R, Martin GR, Bruckner P, Wick G, Wiedemann H. Nature of the collagenous protein in a tumor basement membrane. *Eur J Biochem*. 1978; (84)Nr. 1, S. 43–52.
- ⁽⁴⁾ Vaheri A. Fibronectin (cold-insoluble globulin): role in defence. *Schweiz Med Wochenschr*. 1980 Oct 4;110(40):1437–40.
- ⁽⁵⁾ West SD, Mercer DW. Bombesin-Induced Gastroprotection. *Ann Surg*. 2005 February;241(2):227–231.
- ⁽⁶⁾ Ahanya SN, Lakshmanan J, Morgan BL, Ross MG. Meconium passage in utero: mechanisms, consequences, and management. *Obstet Gynecol Surv*. 2005 Jan;60(1):45–56.
- ⁽⁷⁾ Molinoff PB, Axelrod J. Biochemistry of catecholamines. *Ann Rev Biochem*. 1971;(40)Nr. 1, S. 465–500.
- ⁽⁸⁾ Bergström S, Samuelsson B. Isolation of prostaglandin E1 from human seminal plasma. *Prostaglandins and related factors*. *J Biol Chem*. 1962;(9)237:3005–6.
- ⁽¹⁰⁾ Fairbrother WJ, McDowell RS, Cunningham BC. Solution conformation of an atrial natriuretic peptide variant selective for the type A receptor. *Biochemistry*. 1994;(33)Nr. 30, S. 8897–904.
- ⁽¹¹⁾ Lemmer B, Wettengel R. *Erkrankungen der Atemwege*. In: Lemmer B, Brune K: *Pharmakotherapie – Klinische Pharmakologie*, 13. Auflage, Heidelberg 2007, S. 343–344, S. 349–350.
- ⁽¹²⁾ Bandelow P, Fox JM, Poser W, Rütger E. *Handbuch der Arzneimitteltherapie*, Bd. 1, Psychopharmaka, 2nd edition. Enke, 2004.
- ⁽¹³⁾ Pschyrembel. *Klinisches Wörterbuch*. 262. Auflage. De Gruyter Verlag Berlin, 2010.
- ⁽¹⁴⁾ Roche *Lexikon Medizin*. 3. Auflage. Urban & Schwarzenberg München, 1993.
- ⁽¹⁵⁾ Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase Isoenzymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacol Rev*. 2004 Sep;56(3):387–437.
- ⁽¹⁶⁾ Karow T, Lang R. *Pharmakologie und Toxikologie*. 17. Auflage. Verlag: Köln und Puhlheim.
- ⁽¹⁷⁾ Herder. *Lexikon der Biologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, 2003.
- ⁽¹⁸⁾ <http://omim.org/entry/101200> [Internet]. OMIM®, Johns Hopkins University. Abgerufen am 10.09.2011.
- ⁽¹⁹⁾ Vogels A, Fryns JP. Pfeiffer syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 2006 Jun 1;1:19. Review.
- ⁽²⁰⁾ Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. 2. Auflage. WILEY-VCH.
- ⁽²¹⁾ Watson W, Baker T, Bell S, Gann A, Levine M, Losick R. *Molecular Biology of the Gene*. 6. Auflage, Addison-Wesley Longman Amsterdam, 2008.

-
- (22) Freyschmidt J. Handbuch diagnostische Radiologie. Springer Verlag, 2003.
- (23) Lifton RP, Goldberg ML, Karp RW, Hogness DS. The organization of the histone genes in *Drosophila melanogaster*: functional and evolutionary implications. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1978;42:1047–1051.
- (24) <http://www.laborjournal.de/rubric/methoden/methoden/v62.lasso> [Internet]. Abgerufen am 19.05.2011.
- (25) http://lungenstiftung.de/index.php?id=35&no_cache=1&cid=14&did=80&sechash=2dec2c0 [Internet]. Abgerufen am 14.05.2011.
- (26) Herold G. Innere Medizin 2008. 1. Auflage, 2007.
- (27) DocCheck® Flexikon. DocCheck Medical Services GmbH. Verfügbar unter: http://flexikon.doccheck.com/Trapped_air [Internet]. Abgerufen am 11.10.2011.
- (28) Neuhäuser G, Steinhausen H.-C. Geistige Behinderung – Grundlagen, Klinische Syndrome, Behandlung und Rehabilitation. Stuttgart/Berlin/Köln, 1999.
- (29) Sarimski K. Entwicklungspsychologie genetischer Syndrome. 3. Auflage. Göttingen, 2003.
- (30) Schupf N, Sergievsky GH. Genetic and host factors for dementia in Down's syndrome. *The British Journal of Psychiatry.* 2002;(180) S. 405-410.
- (31) Kielty CM, Baldock C, Lee D, Rock MJ, Ashworth JL, Shuttleworth CA. Fibrillin: from microfibril assembly to biomechanical function. *Philos Trans R Soc Lond., B Biol Sci.* 2002;357(1418):207–17.
- (32) Williamson MP, Madison VS. Three-dimensional structure of porcine C5adesArg from 1H nuclear magnetic resonance data. *Biochemistry.* 1990;29(12):2895–905.
- (33) Kirk B. Der Contergan-Fall. Eine unvermeidbare Arzneimittelkatastrophe? Zur Geschichte des Arzneistoffs Thalidomid. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 1999.
- (34) Thieme Chemistry. RÖMPP Online - Version 3.6. Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, 2009.
- (35) Silbernagl S, Despopoulos A. Taschenatlas der Physiologie. 4. Auflage. Thieme-Verlag, 1991.
- (36) <http://www.sign-lang.uni-hamburg.de/glex/konzepte/17781.htm> [Internet]. Abgerufen am 14.05.2011.
- (37) Manning G. Genomic overview of protein kinases. *WormBook.* 2005 Dec 13;1-19. Review.
- (38) Todaro GJ, Green H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol.* 1963;17:299-313.
- (39) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 1992;119(3):493–501.
- (40) Jiney J, Burgess K. Benzophenoxazine-based fluorescent dyes for labeling biomolecules. *Tetrahedron.* 2006;62(48):11021.
- (41) Lehmann U. Paläontologisches Wörterbuch. 4. Auflage. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 1996.
- (42) <http://www.spp1356.de> [Internet]. Abgerufen am 15.05.2011.
- (43) http://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2004_8/Page1.htm [Internet]. Abgerufen am 15.05.2011.
- (44) <http://www.ebi.ac.uk/interpro/IEntry?ac=IPR008352> [Internet]. Abgerufen am 15.05.2011.
- (45) Thieme Chemistry. Eintrag zu Glutathion im Römpp Online. Version 3.19. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2011. Abgerufen am 5. Mai 2011.
- (46) Forth W, Henschler D, Rummel W. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 9. Auflage. Urban und Fischer München, 2001.
- (47) Kiss JZ, Muller D. Contribution of the neural cell adhesion molecule to neuronal and synaptic plasticity. *Rev Neurosci.* 2001;12:297–310.
- (48) Yamamoto M, Fujinuma M, Tanaka M, Dräger UC, McCaffery P. Sagittal band expression of COUP-TF2 gene in the developing cerebellum. 1999;84(1-2):143-6.
- (49) Knippers R. Molekulare Genetik. 9. komplett überarbeitete Auflage, Thieme Verlag, 2006.
- (50) Duncia JV, Santella JB 3rd, Higley CA, Pitts WJ, Wityak J, Fietze WE, Rankin FW, Sun JH, Earl RA, Tabaka AC, Teleha CA, Blom KF, Favata MF, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Horiuchi K, Copeland RA, Scherle PA, Trzaskos JM, Magolda RL, Trainor GL, Wexler RR, Hobbs FW, Olson RE. MEK inhibitors: The chemistry and biological activity of U0126, its analogs, and cyclization products. *Bioorg Med Chem Lett.* 1998 Oct 20;8(20):2839-44.
- (51) De Maio A. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock.* 1999;(Augusta, Ga.)11(1):1–12.
- (52) Baenziger NL, Brodie GN, Majerus PW. A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1971;68(1):240–3.
- (53) Linnenbach AJ, Seng BA, Wu S, Robbins S, Scollon M, Pycr JJ, Druck T, Huebner K. Retroposition in a family of carcinoma-associated antigen genes. *Mol Cell Biol.* 1993;13(3):1507–15.
- (54) Williams RC Jr, Shah C, Sackett D. Separation of tubulin isoforms by isoelectric focusing in immobilized pH gradient gels. *Anal Biochem.* 1999;275(2):265–7.
- (55) Brigstock DR. Regulation of angiogenesis and endothelial cell function by connective tissue growth factor (CTGF) and cysteine-rich 61 (CYR61). *Angiogenesis.* 2002;5:153-165.

- (56) Jay P, Berge-Lefranc JL, Marsollier C, Mejean C, Taviaux S, Berta P. The human growth factor-inducible immediate early gene, CYR61, maps to chromosome 1p. *Oncogene*. 1997;14(14):1753–7.
- (57) Lund A, Knudsen SM, Vissing H, Clark B, Tommerup N. Assignment of human elongation factor 1alpha genes: EEF1A maps to chromosome 6q14 and EEF1A2 to 20q13.3. *Genomics*. 1997;36(2):359–61.
- (58) Han SH, Jeon JH, Ju HR, Jung U, Kim KY, Yoo HS, Lee YH, Song KS, Hwang HM, Na YS, Yang Y, Lee KN, Choi I. VDUP1 upregulated by TGF-beta1 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits tumor cell growth by blocking cell-cycle progression. *Oncogene*. 2003;22(26):4035–46.
- (59) Faustino NA, Cooper TA. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev*. 2003 Feb 15;17(4):419–37.
- (60) Marin L, Dameron F, Relier JP. Changes in the cellular environment of differentiating type II pneumocytes. Quantitative study in the perinatal rat lung. *Biology of the Neonate*. 1982;41(3–4):172–182.
- (61) Skou JC. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim Biophys Acta*. 1957;(23) S. 394–401.
- (62) Melstrom LG, Bentrem DJ, Salabat MR, Kennedy TJ, Ding XZ, Strouch M, Rao SM, Witt RC, Ternent CA, Talamonti MS, Bell RH, Adrian TA. Overexpression of 5-lipoxygenase in colon polyps and cancer and the effect of 5-LOX inhibitors in vitro and in a murine model. *Clin Cancer Res*. 2008 Oct 15;14(20):6525–30.
- (63) DocCheck® Flexikon. DocCheck Medical Services GmbH. Verfügbar unter: <http://flexikon.doccheck.com/Leukotrien> [Internet]. Abgerufen am 12.06.2011.
- (64) Römpf H, Falbe J, Regitz M. Römpf Lexikon Chemie. 9. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1992.
- (65) Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev*. 2004 Sep;56(3):387–437.
- (66) Herdegen T. Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie, Thieme Verlag Stuttgart - New York, 1. Auflage, 2008.
- (67) Löffler G, Petrides PE (Hrsg.). Biochemie und Pathobiochemie. 7. Auflage, S. 871 ff. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2003.
- (68) Napoli JL. Retinoic acid biosynthesis and metabolism. *FASEB J*. 1996;(10) Nr. 9, S. 993–1001.
- (69) Garrett R, Grisham CM. Biochemistry. 4. Auflage. Cengage Learning Services, 2009.
- (70) Germain DP. Ehlers-Danlos syndrome type IV. *Orphanet J Rare Dis*. 2007 Jul 19;2:32.
- (71) Grau T. Ultraschall in der Anästhesie und Intensivmedizin. Lehrbuch der Ultraschalldiagnostik. Deutscher Ärzte-Verlag Köln, 2007.
- (72) Slutsky AS, Drazen JM. Ventilation with small tidal volumes. *N Engl J Med*. 2002;347:631.
- (73) Evans DH, Norman McDicken W. Doppler Ultrasound – Physics, Instrumental, and Clinical Applications. 2. Auflage. Wiley, 2000.
- (74) Dössel O. Bildgebende Verfahren in der Medizin. Von der Technik zur medizinischen Anwendung. Springer Verlag Berlin, 2000.
- (75) Entezami M, Albig M, Gasiorek-Wiens A, Becker R. Sonographische Fehlbildungsdiagnostik - Lehratlas der fetalen Ultraschalluntersuchung. Thieme Verlag Stuttgart, 2002.
- (76) <http://www.chirurgie-portal.de/allgemeinchirurgie/bauchschnitt-laparotomie.html> [Internet]. Abgerufen am 13.06.2011.
- (77) Rausbolb R. Fetoskopie: eine klinische Methode zur pränatalen Diagnostik. Thieme Verlag, 1980.
- (78) Franzen A. Hals-Nasen- und Ohrenheilkunde. Urban&Fischer Verlag, 2001.
- (79) Deering SH, Patel N, Spong CY, Pezzullo JC, Ghidini A. Fetal growth after preterm premature rupture of membranes: is it related to amniotic fluid volume? *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2007;20(5):397–400.
- (80) Encyclopaedia Britannica Online 2011. Verfügbar unter: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/1389562/gene-disruption> [Internet]. Abgerufen am 16.06.2011.
- (81) Herder. Lexikon der Biologie. 2. Band. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg, 2004.
- (82) Bugge G. Das Buch Der Großen Chemiker. S. 378–386, Verlag Chemie Weinheim, 1974.
- (83) Fournier M, Lewis M. Influences of IGF-I gene disruption on the cellular profile of the diaphragm. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;278:E707–E715.
- (84) Galderisi U, Jori FP, Giordano A. Cell cycle regulation and neural differentiation. *Oncogene*. 2003 Aug 11;22(33):5208–19.
- (85) Wright WE, Sassoon DA, Lin VK. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell*. 1989 Feb 24;56(4):607–17.
- (86) Braun T, Bober E, Winter B, Rosenthal N, Arnold HH. Myf-6, a new member of the human gene family of myogenic determination factors: evidence for a gene cluster on chromosome 12. *EMBO J*. 1990;9(3):821–31.
- (87) Sabourin LA, Rudnicki MA. The molecular regulation of myogenesis. *Clin. Genet*. 2000;57(1):16–25.

- ⁽⁸⁸⁾ Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994 Dec 1;372(6505):425-32. Erratum in: *Nature* 1995 Mar 30;374(6521):479.
- ⁽⁸⁹⁾ Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:787-820.
- ⁽⁹⁰⁾ Frey H-H, Althaus FR. *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. Georg Thieme Verlag, 2007. S. 489.
- ⁽⁹¹⁾ Ganten D, Ruckpaul K. *Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen*. 1. Auflage. Springer Verlag Berlin, 2006.
- ⁽⁹²⁾ Choi JE, Lee SS, Sunde DA, Huizar I, Haugk KL, Thannickal VJ, Vittal R, Plymate SR, Schnapp LM. Insulin-like growth factor-I receptor blockade improves outcome in mouse model of lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Feb 1;179(3):212-9. Epub 2008 Nov 14.
- ⁽⁹³⁾ Singhal S, Mehta J. Multiple Myeloma. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2006;1:1322-1330.
- ⁽⁹⁴⁾ <http://www.websters-online-dictionary.org/definitions/Phosphorylation> [Internet]. Abgerufen am 12.08.2011.
- ⁽⁹⁵⁾ Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Stryer Biochemie*. 6. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, 2007.
- ⁽⁹⁶⁾ Ogihara T, Isobe T, Ichimura T, Taoka M, Funaki M, Sakoda H, Onishi Y, Inukai K, Anai M, Fukushima Y, Kikuchi M, Yazaki Y, Oka Y, Asano T. 14-3-3 protein binds to insulin receptor substrate-1, one of the binding sites of which is in the phosphotyrosine binding domain. *J Biol Chem*. 1997;272(40):25267-74.
- ⁽⁹⁷⁾ Knight ZA, Gonzalez B, Feldman ME, Zunder ER, Goldenberg DD, Williams O, Loewith R, Stokoe D, Balla A, Toth B, Balla T, Weiss WA, Williams RL, Shokat KM. A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p10alpha in insulin signaling. *Cell*. 2006;125(4):733-47.
- ⁽⁹⁸⁾ Canagarajah BJ, Khokhlatchev A, Cobb MH, Goldsmith EJ. Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell*. 1997 Sep 5;90(5):859-69.
- ⁽⁹⁹⁾ Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, Arthur MJ. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis: hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest*. 1998;102:538-549.
- ⁽¹⁰⁰⁾ Scharhoff T. *Epidemiologie der Sarkoidose*. In: *Pneumologie*. Thieme Verlag Stuttgart. 1993;47:588-92.
- ⁽¹⁰¹⁾ Schmidt RF, Thews G, Lang F. *Physiologie des Menschen*. Springer Verlag, 2007. S. 957 ff.
- ⁽¹⁰²⁾ Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Helling RB. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc Natl Acad Sci*. 1973;70(11):3240-3244.
- ⁽¹⁰³⁾ Hentschel EJ, Wagner GH. *Wörterbuch der Zoologie: Tiernamen, Allgemeinbiologische, Anatomische, Physiologische, Ökologische Termini*. 8. Auflage. Springer Verlag, 2010.
- ⁽¹⁰⁴⁾ Laird DJ, von Andrian UH, Wagers AJ. Stem cell trafficking in tissue development, growth, and disease. In: *Cell*. 132, Nr. 4, Februar 2008, S. 612-30.
- ⁽¹⁰⁵⁾ Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, Figueiredo JL, Kohler RH, Chudnovskiy A, Waterman P, Aikawa E, Mempel TR, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. Identification of Splenic Reservoir Monocytes and Their Deployment to Inflammatory Sites. In: *Science*. 2009;325,S. 612-616.
- ⁽¹⁰⁶⁾ Van Heuverswyn F, Li Y, Neel C, Bailes E, Keele BF, Liu W, Loul S, Butel C, Liegeois F, Bienvenue Y, Ngolle EM, Sharp PM, Shaw GM, Delaporte E, Hahn BH, Peeters M. Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. *Nature*. 2006 Nov 9;444(7116):164.
- ⁽¹⁰⁷⁾ Raikhlina A, Baerlocher MO, Asch MR, Myers A. Imaging and transcatheter arterial embolization for traumatic splenic injuries: review of the literature. *Can J Surg*. 2008 Dec;51(6):464-72.
- ⁽¹⁰⁸⁾ Blyth J, Hofmann AW. Über das Styrol und einige seiner Zersetzungsprodukte. In: *Liebigs Annalen der Chemie*. Bd. 53 (1845), S. 289, zitiert in *Kunststoff-Handbuch Band V Polystyrol*, S. 87 (1969).
- ⁽¹⁰⁹⁾ Yildiz BO, Suchard MA, Wong ML, McCann SM, Licinio J. Alterations in the dynamics of circulating ghrelin, adiponectin, and leptin in human obesity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;(101) Nr. 28,10434-9.
- ⁽¹¹⁰⁾ Drucker DJ, Nauck MA. The Incretin System: Glucagon-like Peptide-1 Receptor Agonists and Dipeptidyl peptidase-4 Inhibitors in Type 2 Diabetes. *Lancet*. 368/2006. Lancet Publishing Group, S. 1696-1705.
- ⁽¹¹¹⁾ <http://www.websters-online-dictionary.org/definitions/Monolayer> [Internet]. Abgerufen am 10.09.2011.
- ⁽¹¹²⁾ Bastian SE, Walton PE, Ballard FJ, Belford DA. Transport of IGF-I across epithelial cell monolayers. *J Endocrinol*. 1999 Sep;162(3):361-9.
- ⁽¹¹³⁾ Holleman AF, Wiberg N. *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*. 102. Auflage. De Gruyter Verlag Berlin, 2007.
- ⁽¹¹⁴⁾ Behrends J. *Duale Reihe: Physiologie*. 1. Auflage. Thieme Verlag Stuttgart, 2009.
- ⁽¹¹⁵⁾ <http://www.websters-online-dictionary.org/definitions/Macromolecule> [Internet]. Abgerufen am 20.09.2011.

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

- (116) <http://www.websters-online-dictionary.org/definitions/horseradish+peroxidase> [Internet]. Abgerufen am 20.09.2011.
- (117) <http://www.websters-online-dictionary.org/definitions/IgG> [Internet]. Abgerufen am 20.09.2011.
- (118) Alok A, Karande AA. The role of glycodelin as an immune-modulating agent at the fetomaternal interface. In: J Reprod Immunol. 2009;83,Nr. 1-2,S. 124–7.
- (119) Plattner H, Hentschel J. Zellbiologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2002.
- (120) Lüllmann-Rauch R. Histologie. 2., komplett überarbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2003.
- (121) Fogh J, Trempe G. Human Tumor Cells In Vitro (J. Fogh, ed.). 1975;115-141.
- (122) Manning M, Colón W. Structural basis of protein kinetic stability: resistance to sodium dodecyl sulfate suggests a central role for rigidity and a bias toward beta-sheet structure. In: Biochemistry. 2004;(43), S. 11248–11254.
- (123) Hu VW, Black GE, Torres-Duarte A, Abramson FP. 3H-thymidine is a defective tool with which to measure rates of DNA synthesis. FASEB J. 2002 Sep;16(11):1456-7. Epub 2002 Jul 1.
- (124) Leitch AR, Schwarzacher T, Jackson D, Leitch IJ. In situ-Hybridisierung. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin, 1994.
- (125) Kreutzig T. Kurzlehrbuch Biochemie. Elsevier, 2006.
- (126) Voet & Voet. Biochemistry (second Edition). Verlag Wiley & Sons. S. 694–704.
- (127) <http://www.websters-online-dictionary.org/definitions/Corticosteroid> [Internet]. Abgerufen am 01.10.2011.
- (128) Maier W. Rodentia, Nagetiere. In: Westheide W, Rieger R (Hrsg.): Spezielle Zoologie. Teil 2: Wirbel- oder Schädeltiere. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg/Berlin, 2004.
- (129) Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnecki Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. Acta Biochim Pol. 2003;50(4):1129-46.
- (130) Jerónimo C, Henrique R, Oliveira J, Lobo F, Pais I, Teixeira MR, Lopes C. Aberrant cellular retinol binding protein 1 (CRBP1) gene expression and promoter methylation in prostate cancer. J Clin Pathol. 2004 August;57(8):872–876.
- (131) <http://www.websters-online-dictionary.org/definitions/Sequestration> [Internet]. Abgerufen am 01.10.2011.
- (132) http://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2007_1/Page1.htm [Internet]. Abgerufen am 01.10.2011.
- (133) http://www.uni-duesseldorf.de/MathNat/Biologie/Didaktik/Thomas/seiten/genetik/gene6_eu.html [Internet]. Heinrich Heine Universität Düsseldorf. Abgerufen am 01.10.2011.
- (134) Heinzeller T, Büsing CM. Histologie, Histopathologie und Zytologie für den Einstieg. Georg Thieme Verlag, 2001. ISBN 3-131-26831-X. S. 209.
- (135) Health Dictionary. Verfügbar unter: http://www.healthdictionary.info/Fms_Gene.htm [Internet]. Abgerufen am 01.10.2011.
- (136) Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, Cross MJ. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. Cell Signal. 2007;19(10):2003–2012.
- (137) Kinoshita T, Takahashi M, Inoue N, Miyata T, Takeda J. Expression cloning of genes for GPI-anchor biosynthesis. Braz J Med Biol Res. 1994;27(2):127–32.
- (138) Meinhart A, Cramer P. Recognition of RNA polymerase II carboxy-terminal domain by 3'-RNA-processing factors. Nature 2004;430(6996):223–6.
- (139) Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. Cell. 1998;92(6):735–45.
- (140) <http://www.charite.de/zlp/routine/referenzdb/45587.htm> [Internet]. Abgerufen am 01.10.2011.
- (141) Deutsche Gesellschaft für Angiologie - Gesellschaft für Gefäßmedizin (2005): Leitlinie Diagnostik und Therapie der Bein- und Beckenvenenthrombose und Lungenembolie. http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/065-002_S2_Diagnostik_und_Therapie_der_Venenthrombose_und_der_Lungenembolie_06-2010_06-2015.pdf [Internet]. Abgerufen am 05.10.2011.
- (142) <http://www.gefaesszentrum-norddeutschland.de/index.php/de/e-h/55-embolie> [Internet]. Abgerufen am 05.10.2011.
- (143) Hynes R. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell. 2002;110:673-87.

Anhang

Biometrische Daten der Feten

Biometrische Daten der Feten im Überblick (in mg)				
	Körpergewichte	rechte Lungen	linke Lungen	Gesamtgewichte der Lungen
Kontrolle	5707,0 ± 142,2	120,40 ± 15,63	63,40 ± 9,53	183,80 ± 17,15
Plazebo, CDH+	4447,0 ± 547,2	47,67 ± 7,20	21,00 ± 3,49	68,67 ± 9,71
IGF-1, CDH+	3831,0 ± 874,1	42,67 ± 9,98	19,27 ± 5,56	61,93 ± 15,17
Differenz (Pla. vs. IGF-1)	616,1 ± 266,3	5,0 ± 3,18	1,73 ± 1,69	6,73 ± 4,65
Pla. vs. IGF-1	<0,05	0,13	0,32	0,16

	LBWRs	LL/RL
Kontrolle	0,032 ± 0,003	0,536 ± 0,124
Plazebo, CDH+	0,016 ± 0,002	0,445 ± 0,071
IGF-1, CDH+	0,016 ± 0,003	0,448 ± 0,062
Differenz (Pla. vs. IGF-1)	-0,001 ± 0,001	-0,003 ± 0,024
Pla. vs. IGF-1	0,40	0,90

Die jeweils letzte Zeile gibt die Signifikanz-Werte (p-Werte) des unpaired t-Tests der Plazebo- und IGF-1-Gruppe an. Werte: Mean ± SD.

Verteilung und Zuordnung der Feten

	Übersicht über die Nitrofen-exponierten Feten der Behandlungsgruppe				
	am Tag 19 am Leben	am Tag 20 am Leben	am Tag 21,5 am Leben	CDH-positiv	CDH-negativ
Anzahl der Feten	83	71	63	45	18
fetale Überlebensrate	100%	85,54%	75,90%		
CDH-Quote				71,43%	28,57%
fetale Mortalität	0%	14,46%	24,10%		

Ergebnisse des Immuno-Stainings

Mittlere Anzahl der positiven Zellen im Überblick				
	Ki67	Ttf1	α -Sma	Podoplanin
Kontrolle	312,6 \pm 143,1	1869,0 \pm 353,7	429,0 \pm 96,7	53,2 \pm 49,3
Plazebo, CDH+	347,9 \pm 185,1	2830,0 \pm 562,7	546,9 \pm 223,3	277,6 \pm 164,3
IGF-1, CDH+	419,1 \pm 216,6	3103,0 \pm 644,6	538,3 \pm 279,0	311,5 \pm 151,6
Differenz (Pla. vs. IGF-1)	-71,3 \pm 73,6	272,3 \pm 220,9	8,5 \pm 92,3	-33,9 \pm 57,7
p-Wert (Pla. vs. IGF-1)	0,34	0,23	0,93	0,56
	Fgf10	Bmp4	IGF-1	
Kontrolle	647,2 \pm 128,7	787,2 \pm 154,1	6,2 \pm 6,9	
Plazebo, CDH+	694,5 \pm 233,5	1296,0 \pm 408,9	338,6 \pm 201,1	
IGF-1, CDH+	673,9 \pm 294,4	1393,0 \pm 339,3	167,3 \pm 59,3	
Differenz (Pla. vs. IGF-1)	20,6 \pm 97,0	-96,7 \pm 137,2	171,3 \pm 54,1	
p-Wert (Pla. vs. IGF-1)	0,83	0,49	<0,01	

Die jeweils letzte Zeile gibt die Signifikanz-Werte (p-Werte) des unpaired t-Tests der Plazebo- und IGF-1-Gruppe an. Werte: Mean \pm SD
 Die Anzahl positiver Zellen wurde in fünf nicht überlappenden Gesichtsfeldern ermittelt.

Resultate der Analysen der Genexpression

mRNA-Expression der verschiedenen Gruppen im Überblick (dCt-Werte)			
	<i>Ki67</i>	<i>Ttf1</i>	<i>Bmp4</i>
Kontrolle	0,419 ± 1,271	-1,479 ± 0,386	0,137 ± 6,803
Plazebo, CDH+	0,419 ± 0,898	-2,411 ± 0,251	-3,249 ± 0,453
IGF-1, CDH+	0,280 ± 0,517	-2,464 ± 0,592	-2,942 ± 0,416
Differenz (Pla. vs. IGF-1)	0,138 ± 0,267	0,054 ± 0,166	-0,307 ± 0,159
p-Wert (Pla. vs. IGF-1)	0,61	0,75	0,06
	<i>Igf-1r</i>	<i>Igf-2r</i>	<i>Kdr/Flk-1 (Vegfr-2)</i>
Kontrolle	-1,143 ± 0,140	-2,739 ± 0,319	-3,773 ± 0,179
Plazebo, CDH+	-1,930 ± 0,451	-2,252 ± 0,437	-3,881 ± 0,333
IGF-1, CDH+	-1,997 ± 0,336	-2,867 ± 0,245	-3,780 ± 0,447
Differenz (Pla. vs. IGF-1)	0,067 ± 0,145	0,345 ± 0,118	-0,101 ± 0,144
p-Wert (Pla. vs. IGF-1)	0,65	<0,01	0,49
	<i>Podoplanin</i>	<i>Fgf10</i>	<i>Plat</i>
Kontrolle	-4,475 ± 0,472	-0,298 ± 0,459	-2,284 ± 0,611
Plazebo, CDH+	-4,567 ± 0,445	-0,075 ± 0,632	-1,766 ± 0,765
IGF-1, CDH+	-4,783 ± 0,393	0,202 ± 0,625	-1,475 ± 0,536
Differenz (Pla. vs. IGF-1)	0,216 ± 0,153	-0,277 ± 0,230	-0,291 ± 0,241
p-Wert (Pla. vs. IGF-1)	0,17	0,24	0,24
	<i>Flt-1 (Vegfr-1)</i>	<i>Vegf-a</i>	<i>Pecam-1</i>
Kontrolle	-0,679 ± 0,244	-2,603 ± 0,158	-2,707 ± 0,239
Plazebo, CDH+	-0,863 ± 0,389	-2,874 ± 0,353	-2,975 ± 0,379
IGF-1, CDH+	-0,827 ± 0,297	-2,963 ± 0,467	-3,039 ± 0,877
Differenz (Pla. vs. IGF-1)	-0,036 ± 0,126	0,088 ± 0,151	0,064 ± 0,247
p-Wert (Pla. vs. IGF-1)	0,78	0,56	0,80

Die jeweils letzte Zeile gibt die Signifikanz-Werte (p-Werte) des unpaired t-Tests der Plazebo- und IGF-1-Gruppe an. Werte: Mean ± SD.

„Einfluss intraamniotischer IGF-1-Injektion auf die hypoplastische Rattenlunge“

Übersicht über die Effekte einer rhIGF-1-Applikation in einer Auswahl verschiedener Studien				
Studien, die nicht an Nagetieren durchgeführt wurden				
Studie	Dosis/Applikationsintervall	Art der Applikation	Spezies	signifikante Veränderung(en)
Skarsgard <i>et al.</i> [708]	1440 ng/d über 7 Tage	intraamniotischer Katheter	fetales Schaf	Steigerung des Plazentagewichts.
Schoberich <i>et al.</i> [714]	4 µg/h für 7 Tage	osmotische Minipumpe	fetales Schaf	Steigerung der Rate des Gewichtszuwachses; Steigerung der Protein- und Fettsäureanreicherung bei Fettsäuren mit IUGR.
Bloomfield <i>et al.</i> [767]	50 µg/d	chronische Infusion	fetales Schaf	Steigerung der Transferrinkapazität und Morphologie der Plazenta, Abfall der <i>Igf-1</i> -mRNA-Level in der Leber, der Muskulatur und der Plazenta.
Bloomfield <i>et al.</i> [766]	20 µg/d für 10 Tage	intraamniotische Infusion	fetales Schaf	Normalisierung des durch die Embolisierung reduzierten Dickdarmgewichts, der Dickdarmlänge und des gesamten Darmgewichts. Reduktion des Leber-, Milz- und Thyreusgewichts, sowie Steigerung des Brustkorbvolumens.
Kind <i>et al.</i> [774]	26 µg/h für 10 Tage	intravenöse Infusion	fetales Schaf	Reduktion der <i>Igf-1</i> - und <i>Igf-2</i> -mRNA-Expression in der Leber, aber nicht in der Skelettmuskulatur.
Ertema <i>et al.</i> [746]	50 µg/d (360 µg/Woche) 120 µg/d (360 µg/Woche)	intravenöse Infusion intraamniotische Infusion	fetales Schaf fetales Schaf	Steigerung des Brustkorbvolumens. Steigerung des Brustkorbumfangs, des Lebergewichts und des Gewichts des peritonealen Fettschleims.
Taramal <i>et al.</i> [722]	80 µg/kg, jeden 2. Tag, für 10 Tage	intrapertoneale Applikation	fetaler Rhesusaaffe	Steigerung der Anzahl der B-Lymphozyten und der roten Blutkörperchen, gesteigerte CD4/CD8-Ratio in den Lymphknoten; Längenzunahme des Dünndarms.
Burrin <i>et al.</i> [768]	3,5 mg/kg/d (im Mitternachtszeit) für 4 Tage	orale Applikation	fetales Schaf	Steigerung des Dünndarmgewichts und des DNA- und Proteingehalts des Dünndarms; Wachstumssteigerung der Dünndarmschleimhaut.
Shahb <i>et al.</i> [772]	20 µg/d für 10 Tage	intraamniotische Applikation	fetales Schaf	Steigerung der durch die IUGR reduzierten <i>Igf-1</i> -mRNA-Expression im Darm.
Jensen <i>et al.</i> [1003]	50 µg/kg/h für 4 Stunden	fetaler Venenkatheter	fetales Schaf	Abfall des Sauerstoffgehalts, des Glucosespiegels, der Harnstoffkonzentration und des Amino-Stickstoffgehalts im fetalen Blut. Steigerung der fetalen Blut-Laktatkonzentration, der uterinen Sauerstoffaufnahme, der Laktataufnahme der Plazenta und der Sauerstoff- und Glucoseaufnahme des Fetus.
Studien an Nagetieren und IGF-1-Dosen im Vergleich zu unserer Studie				
Kim <i>et al.</i> [769]	1 µg/g von Tag 0 bis Tag 13 (jeden 3. Tag), Gesamtdosis: etwa 150 µg/adulte Maus (bei durchschnittlich 30 g KG der Maus).	orale Applikation	adulte Maus	Steigerung des Dünndarmgewichts und Lebergewichts (erst nach einer mehr als dreimaligen Verabreichung des rhIGF-1).
Clark <i>et al.</i> [742]	7,5; 30 und 120 µg/d für 7/14 Tage. Gesamtdosis: zwischen 52,5 und 1680 µg/Maus (ca. 30 g KG).	s.c. mittels osmotischer Pumpe	adulte Maus	Steigerung des Körpergewichts (nur bei höchster Dosis von 4 mg/kg/d), Abnahme des Gesamtproteins, Cholesterins und Globulins des Serums. Steigerung des Leber-, Milz-, Nieren- und Thyreusgewichts und Steigerung der Lymphozytenzahl des Thyreus und der Milz.
Bohe <i>et al.</i> [943]	0,5 µg/g, 3 mal/d, insgesamt 9 Injektionen. Gesamtdosis: 900 µg/Ratte (bei ca. 200 g KG).	s.c. Injektion	adulte Ratte	Reduktion der <i>Igf1bp-2</i> , <i>Igf1bp-3</i> , <i>Igf1bp-4</i> und <i>Igf1bp-6</i> -mRNA der Niere. Steigerung der <i>Igf1bp-2</i> -mRNA-Expression der Leber. Reduktion der <i>Igf-1</i> -mRNA-Expression der Niere.
Unsere Studie	0,2 µg/d an 2 aufeinanderfolgenden Tagen (0/04 µg/g). Gesamtdosis: 0,4 µg/Fetus (ca. 5 g KG)	intraamniotische Applikation	fetale Ratte	Steigerung der <i>Igf-2</i> -mRNA-Expression und der <i>Igf-1</i> -Proteinexpression in der fetalen Rattenlunge; Reduktion des fetalen Körpergewichts.
Extrapoliert auf einen Rattenfetus von 5 g KG, hatten Kim <i>et al.</i> im Vergleich zu unserer Studie die 62,5-fache und Clark <i>et al.</i> die 21,88- bis 700-fache Dosis appliziert. Extrapoliert auf einen Rattenfetus von 5 g KG, hatten Bohe <i>et al.</i> im Vergleich zu unserer Studie die 56,25-fache Dosis appliziert.				
Studie mit Applikation von IGF in der Zellkultur				
Esami <i>et al.</i> [910]	rhIGF-1 bzw. rhIGF-2; jeweils 500 ng/ml Kulturmedium	Zellkultur von Mikroten- exponierten Lungengewebe	fetale Ratte	Steigerung der <i>TfR1</i> - und <i>TfR2</i> -mRNA-Expression nach Zusatz von rhIGF-2 zur Zellkultur (nach 48 Stunden), sowohl zwischen der rhIGF-2- und der Kontrollbehandlung, als auch zwischen der rhIGF-2- und der rhIGF-1-Behandlung.