

**Zum Einfluss des Stickstoffmonoxid (NO) Systems auf die
Hyperoxie-induzierte postnatale Lungenreifungsstörung**

Histomorphometrische Untersuchungen am Mausmodell der
bronchopulmonalen Dysplasie

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von:

Martin Alexander Rühlmann

aus Duisburg

Gießen 2008

Aus der Abteilung Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie
des Zentrums für Kinderheilkunde und Jugendmedizin
(Direktor: Prof. Dr. med. Klaus-Peter Zimmer)
und
aus der Medizinischen Klinik II
des Medizinischen Zentrums für Innere Medizin
(Direktor: Prof. Dr. med. Werner Seeger)
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Gutachter:

Privatdozent Dr. med. Irwin Reiss, PhD

Gutachter:

Professor Dr. rer. nat. Norbert Weißmann

Tag der Disputation: 13. November 2008

Für meine Eltern
in Dankbarkeit

Erklärung zur Verfassung der Dissertation

Ich erkläre:

„Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Alexander Rühlmann

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Die normale Lungenentwicklung.....	1
1.2 Bronchopulmonale Dysplasie.....	4
1.2.1 Historische Entwicklung.....	4
1.2.2 Bedeutung und Definition.....	4
1.2.3 „Klassische“ Form der BPD.....	9
1.2.4 Präsentation der „neuen“ BPD.....	11
1.2.5 Aktuelles Verständnis der Pathogenese.....	14
1.2.6 Aktuelles Verständnis der Pathophysiologie.....	19
1.3 Zur Bedeutung von Stickstoffmonoxid (NO) in der Therapie.....	20
1.4 Der NO-sGC-cGMP Signaltransduktionsweg.....	22
1.5 Diethylenetetraamine-NONOate (Deta-NONOate).....	25
1.6 Sildenafil.....	25
1.7 HMR-1766.....	26
1.8 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	28
2 Material und Methoden.....	29
2.1 Versuchstiere.....	29
2.2 Verwendetes Tiermodell.....	29
2.3 Versuchsdesign.....	30
2.3.1 Versuch 1: Einfluss der chronischen neonatalen Hyperoxie.....	31
2.3.2 Versuch 2: Einfluss von NONOate auf die postnatale Lungenreifungsstörung.....	32
2.3.3 Versuch 3: Einfluss von Sildenafil (5mg/kg KG) auf die postnatale Lungenreifungsstörung.....	33
2.3.4 Versuch 4: Einfluss von Sildenafil (20mg/kg KG) auf die postnatale Lungenreifungsstörung.....	34
2.3.5 Versuch 5: Einfluss von HMR-1766 auf die postnatale Lungenreifungsstörung.....	34
2.4 Präparation, Organentnahme und Fixierung.....	36
2.5 Herstellung der Schnittpräparate für die Morphometrie.....	36
2.5.1 Gewebeatwässerung und Paraffineinbettung.....	36
2.5.2 Anfertigung der Schnittpräparate.....	37
2.5.3 Hämatoxilin-Eosin (H & E)-Färbung.....	37
2.6 Histomorphometrische Analyse.....	38
2.7 Statistische Auswertung.....	40

3 Ergebnisse.....	41
3.1 Versuch 1: Einfluss der chronischen neonatalen Hyperoxie.....	41
3.2 Versuch 2: Therapie mit NONOate.....	47
3.3 Versuche 3 und 4: Therapie mit Sildenafil.....	51
3.4 Versuch 5: Therapie mit HMR-1766.....	55
4 Diskussion.....	60
4.1 Modell der chronischen neonatalen Hyperoxie.....	60
4.2 Einfluss von NO und NO-Achsen stimulierenden Pharmaka auf die Hyperoxie- induzierte postnatale Lungenreifungsstörung.....	65
4.2.1 Rationale für den Therapieansatz.....	65
4.2.2 Zum Einfluss von inhalativem Deta-NONOate im vorliegende Modell.....	66
4.2.3 Zum Einfluss von Sildenafil im vorliegenden Modell.....	69
4.2.4 Zum Einfluss von HMR-1766 im vorliegenden Modell.....	71
4.3 Schlussfolgerung.....	72
5 Zusammenfassung.....	74
6 Summary.....	76
7 Literaturverzeichnis.....	77
8 Anhang.....	95
8.1 Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen.....	95
8.2 Curriculum Vitae.....	97
8.3 Danksagung.....	98

1 Einleitung

1.1 Die normale Lungenentwicklung

Die physiologische Lungenentwicklung des Menschen umfasst fünf chronologisch aufeinander folgende Stadien, welche den Ursprung in der Embryonalentwicklung nehmen und bis in das postnatale Leben andauern. Dabei tragen unzählige Faktoren zu einem normalen Lungenwachstum bei und durch die Störung bereits eines einzelnen Faktors können schwere Abnormitäten in der Organentwicklung auftreten.¹¹

Die fünf wesentlichen Entwicklungsstadien werden in die embryonale (1. bis 7. Gestationswoche), die pseudoglanduläre (7. bis 16. Gestationswoche), die kanalikuläre (16. bis 26.-28. Gestationswoche), die sakkuläre (26.-28. bis 32.-36. Gestationswoche) und die alveoläre Phase (32.-36. Gestationswoche bis über das 2. Lebensjahr hinaus) differenziert.⁵³ Dabei sind die Übergänge von einer Phase in die folgende fließend und die zeitlichen Abstände können interindividuell geringgradig differieren.⁴¹ Im embryonalen Stadium entwickeln sich die Atemwege bis auf das Level von bronchopulmonalen Segmenten mit einem mehrreihigen Epithel aus Spindelzellen. Durch 16-28fache dichotome Teilung werden die Atemwege bis hin zum Azinus ausdifferenziert und es erscheinen Zellen des respiratorischen Epithels sowie erste Knorpelzellen. Die angiogenetische Entwicklung der präazinären Gefäße wird im pseudoglandulären Stadium abgeschlossen. Als wesentlicher Schritt der kanalikulären Phase sind der Beginn der Differenzierung von Typ II- Pneumozyten mit folglich Aufnahme der Surfactantproduktion und die Verminderung des interstitiellen Gewebes zur Ausdünnung der entstehenden Blut-Gas-Schranke zu nennen. Zudem verwandeln sich die Zellen des distalen Atemwegsepithels zunehmend in kuboidale Zellen und setzen sich dadurch vom bronchialen Epithel ab. Die Ausbildung der distalen pulmonalen Zirkulation durch Vaskulogenese ist dabei ab etwa der 20. Gestationswoche präsent. Das sakkuläre Stadium ist durch eine deutliche Reduktion des interstitiellen Gewebes der sakkulären Wandstrukturen sowie durch die Ausbildung von sekundären Aussprossungen gekennzeichnet. Letztere sind als Vorläufer der Alveologenese zu betrachten und sind noch mit einem doppelten Kapillarnetz ausgestattet. Die weitere Ausdifferenzierung und Ausdünnung der sekundären Septen mit zunehmender azinärer Komplexität, sowie Umorganisation und Verschmelzung der beiden Kapillarnetze zu Einem, kennzeichnet das letzte und damit alveoläre Entwicklungsstadium.^{41;53} Das Ende des Alveolarisierungsprozesses im Kindesalter wird zwischen etwa dem 2. Lebensjahr⁵³ und dem 8.

Lebensjahr⁴¹ gesehen. Dabei wird davon ausgegangen, dass der Mensch mit ca. 150 Millionen etwa ein Drittel bis die Hälfte seiner adulten Alveolenzahl bereits zur Termingeburt ausgebildet hat.¹⁰⁶ Bekanntermaßen stellt das Maß der Lungenreife den wesentlichen determinierenden Faktor für die Lebensfähigkeit frühgeborener Kinder dar. Diese tritt grundlegend in der kanalikulären Phase jenseits der 24. Gestationswoche mit der Ausbildung der Blut-Gas-Schranke und der beginnenden Surfactantsynthese ein.¹¹

Für das in der vorliegenden Dissertation verwendete Tiermodell wurde die Maus gewählt, deren Lungenentwicklung in den wesentlichen Abläufen der des Menschen entspricht und dabei die gleichen fünf Entwicklungsstadien durchläuft. Das zeitliche Ausmaß in der Lungenentwicklung der Maus ist mit etwa 19 Tagen Gestationsdauer jedoch signifikant kürzer und zum Zeitpunkt der physiologischen Geburtsreife befindet sich die Mauslunge noch in der sakkulären Entwicklungsphase. Die Alveolarisierung beginnt hier im Gegensatz zur menschlichen Lungenentwicklung erst in der ersten postnatalen Lebenswoche und ist bis zur 3. Lebenswoche bereits weitestgehend abgeschlossen.⁴² Die Lungen der Versuchstiere befinden sich zum Zeitpunkt der physiologischen Geburt also in einer Entwicklungsphase, die der von sehr oder sogar extrem frühgeborenen Kindern entspricht. Abbildungen 1A und B zeigen schematisch die menschlichen Lungenentwicklungsphasen im Vergleich zur Organentwicklung der Maus.

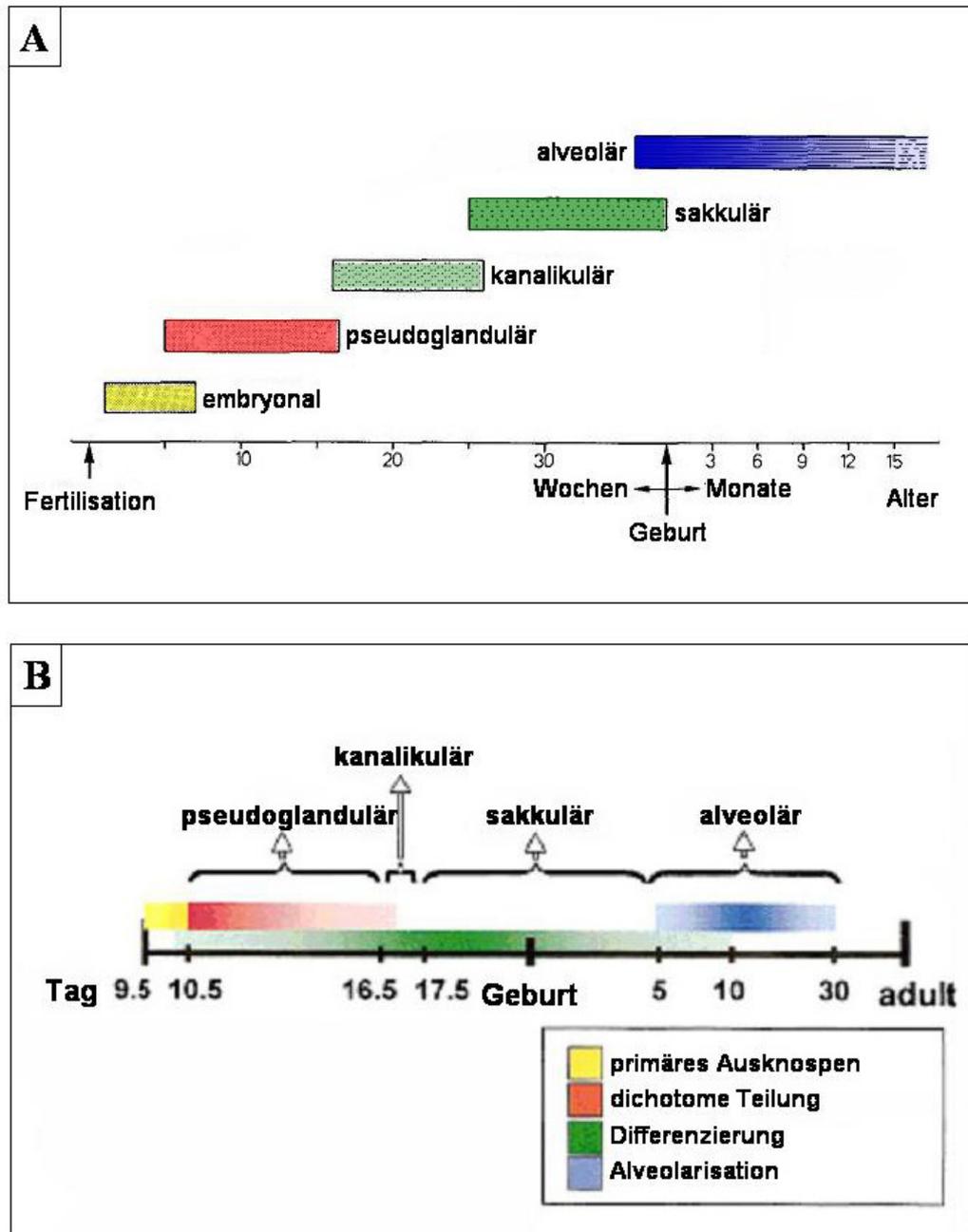


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Lungenentwicklungsphasen von Mensch **(A)** und Maus **(B)**. Die normale Gestationsdauer beträgt beim Menschen etwa 40 Wochen, bei der Maus nur etwa 19 Tage. Zum Zeitpunkt der physiologischen Geburtsreife befinden sich die Lungen der Tiere noch im sakkulären Stadium. Beim Menschen beginnt die Alveolarisation bereits im letzten Trimenon der Schwangerschaft, während sie bei der Maus einen ausschließlich postnatalen Prozess darstellt. **(A)** modifiziert aus Burri, 1984⁴¹ ; **(B)** modifiziert aus Cardoso, 2000⁴²

1.2 Bronchopulmonale Dysplasie

1.2.1 Historische Entwicklung

Der Terminus bronchopulmonale Dysplasie (BPD) wurde erstmalig im Jahr 1967 geprägt. Northway und Mitarbeiter beschrieben die BPD als ein chronisches pulmonales Syndrom, welches nach prolongierter mechanischer Beatmung und Sauerstofftherapie aufgrund eines schwergradigen hyalinen Membranensyndroms (HMD) bei Frühgeborenen beobachtet wurde.¹⁶⁷ Dabei galten als diagnostische Kriterien die Anwesenheit und das Fortbestehen von respiratorischen Zeichen und Symptomen, die Notwendigkeit einer Sauerstoffsupplementation zur Behandlung der bestehenden Hypoxämie und der Nachweis eines abnormalen Röntgenthorax im Alter von 36 Wochen post menstruationem (p.m.).^{19;167} Das post-menstruelle Alter entspricht dabei dem Gestationsalter plus dem chronologischen Alter. Diese ursprüngliche Definition des Krankheitsbildes bleibt teilweise auch heute noch relevant, ist aufgrund der enormen Fortschritte der neonatologischen Intensivmedizin heute aber bei weitem nicht mehr als ausreichend anzusehen. Vor allem die Anwendung von pränatalen Steroiden bei drohender Frühgeburtlichkeit (seit den 70er Jahren), die Einführung von neuen schonenden Beatmungskonzepten, die Entwicklung neuer nicht-invasiver Monitoring-Möglichkeiten, Fortschritte in Pflege- und Ernährungsstrategien und vor allem die Verfügbarkeit der exogenen Surfactanttherapie (seit den 90er Jahren), haben den klinischen Verlauf und das Outcome Frühgeborener mit Respiratorischem Distress-Syndrom (RDS) innerhalb der vergangen 40 Jahre erheblich verbessert.^{26;162}

Diese Faktoren haben über die Jahrzehnte zu einem Wandel des ursprünglich von Northway et al. beschriebenen Krankheitsbildes, welches primär von Volu- und Barotrauma, Inflammation, sowie der Sauerstofftoxizität bestimmt war, geführt.¹⁸ Im Besonderen seit dem großflächigen Einsatz von exogenen Surfactantpräparaten hat sich zunehmend eine chronische Lungenerkrankung (CLD) nach Frühgeburtlichkeit entwickelt, welche sich in ihrem klinischen Verlauf, sowie in der Pathologie von der klassischen Form der BPD unterscheidet.^{44;114;181}

1.2.2 Bedeutung und Definition

Die bronchopulmonale Dysplasie ist bis auf seltene Ausnahmen eine chronische, potenziell reversible Erkrankung beatmeter frühgeborener Kinder⁹⁴, die typischer Weise aufgrund eines akuten Atemnotsyndroms (ANS) künstlich mit hohen

Sauerstoffkonzentrationen prolongiert beatmet werden mussten.^{19;32;118} Häufig betrifft die BPD heute aber vor allem auch sehr unreife Neugeborene, die fehlende oder nur wenige Zeichen einer initialen Lungenerkrankung im Sinne eines „respiratory distress syndrome“ (RDS), aufweisen.¹¹⁹ Diese Kinder sprechen gut auf die exogene Surfactantgabe an und müssen vielmehr wegen nicht ausreichender Atemanstrengungen bis hin zur völligen Apnoe prolongiert beatmet werden.^{1;20;44} Seltener tritt die mit der BPD weitestgehend synonym benutzte „chronic lung disease of infancy“ (CLDI) bei reifen Neugeborenen auf, die wegen anderer schwerwiegender Erkrankungen als dem RDS einer prolongierten Beatmungstherapie unterzogen werden mussten.¹²² Zu diesen Krankheitsbildern zählen das Mekonium-Aspirations-Syndrom (MAS), Pneumonien, Sepsis, persistierende pulmonale Hypertension, pulmonale Hypoplasie, Apnoe, tracheoösophageale Fisteln, angeborene Zwerchfellhernien oder Herzfehlbildungen, sowie kongenitale neuromuskuläre Störungen.^{68;168}

Trotz der Fortschritte in der Peri- und Neonatologie bleibt die BPD neben Störungen der neurologischen Entwicklung frühgeborener Kinder, auch heute noch ein Hauptmorbidityfaktor im Rahmen der Frühgeburtlichkeit und eine der Hauptursachen für chronische Komplikationen bei den Überlebenden.⁴⁴ Short und Mitarbeiter konnten 2003 zeigen, dass sehr früh geborene Kinder, die an einer BPD litten und somit eine Sauerstoffsupplementierung benötigten, im Alter von 8 Jahren schlechtere kognitive und akademische Leistungen erbringen konnten als vergleichbare Frühgeborene, die nicht an einer BPD erkrankt waren.¹⁸⁹ Die betroffenen Kinder müssen häufig über große Zeiträume stationär behandelt werden. Damit stellt die BPD heute noch immer eine große physische und emotionale Belastung der Patienten und deren Familien dar, zusätzlich sind aber auch die erforderlichen finanziellen Therapiekosten häufig erheblich.¹⁵⁶ Viele der erkrankten Kinder können nur mit zusätzlicher Sauerstoffgabe nach Hause entlassen werden und sind für viele Monate bis hin zu Jahren –selten jedoch über Beendigung des 2. Lebensjahres hinaus– stetig darauf angewiesen.⁸⁹ Innerhalb der ersten beiden Lebensjahre müssen etwa 50% aller an BPD erkrankten Kinder erneut wegen respiratorischer Insuffizienz stationär behandelt werden.⁸⁷ Davon sind die meisten Fälle mit einer Infektion durch das respiratory syncytial virus (RSV) assoziiert. Häufig sind auch Säuglinge und Kleinkinder, die einer häuslichen Sauerstofftherapie zugeführt werden mussten, von erneuter Rehospitalisierung betroffen. Die hohe Rate an Rehospitalisierungen fällt erst im dritten Lebensjahr signifikant ab.^{88;90} Auch ein Zusammenhang zwischen BPD und dem Syndrom des plötzlichen Kindstodes (SIDS) konnte von Werthammer et al. gezeigt werden, dabei ist das Risiko an einem SIDS zu versterben bei an BPD erkrankten Säuglingen siebenfach erhöht im Vergleich zur gesunden Vergleichsgruppe.²²⁵

Es gibt ebenfalls klare Hinweise darauf, dass die BPD auch jenseits des 2. Lebensjahres vermehrt respiratorische Symptome verursacht.⁸⁷ Auch wenn das weitere Lungenwachstum und das Remodelling der Lungenarchitektur in vielen Fällen eine konsekutive Verbesserung der Lungenfunktion zur Folge hat,²³ bleiben dennoch häufig Störungen der Belüftung und des Flows fortbestehen.⁷⁵ In Studien konnte gezeigt werden, dass Jugendliche, die an einer BPD erkrankt waren, vermehrt an Atemwegsobstruktion, Überblähung und einem hyperreagiblen Bronchialsystem leiden.^{9;75;131} Viele der überlebenden Patienten werden in den nächsten Jahren das junge Erwachsenenalter erreichen und somit kann die BPD nicht mehr als rein pädiatrisches Krankheitsbild gesehen werden. Baraldi und Mitarbeiter sehen in der BPD durch ihre verminderte respiratorische Reserve ein erhöhtes Risiko für das Auftreten eines pathologischen Phänotyps bei diesen jungen Erwachsenen, welcher der bekannten adulten Form der „chronic obstructive pulmonary disease“ (COPD) ähnelt.²²

Glücklicherweise hat aufgrund der beschriebenen Verbesserungen in der medizinischen Versorgung Frühgeborener die Inzidenz der schweren klassischen Form der BPD deutlich abgenommen.¹¹⁶ Allerdings bleibt aufgrund der immer unreiferen und leichteren Frühchen, die heute erfolgreich am Leben erhalten werden können, die Gesamtinzidenz der Erkrankung nach wie vor auf einem gleich hohen Niveau und wird zum Teil sogar als leicht ansteigend gesehen.^{73;193} Vor allem die Gruppe der Frühgeborenen mit sehr oder sogar extrem niedrigem Geburtsgewicht -auch als very bzw. extremely low birth weight infants (VLBWI bzw. ELBWI) bezeichnet- ist immer seltener von der klassischen schweren Form, sondern vielmehr von der neuen milderen Form der BPD betroffen.^{14;111;153;172} Dabei ist es unbestritten, dass sich das Auftreten der BPD umgekehrt proportional zu dem Gestationsalter und Geburtsgewicht verhält.^{72;94;162;169} Die erheblichen Fortschritte in der neonatologischen Versorgung sind in erster Linie an der Tatsache abzulesen, dass die BPD bei Kindern mit einem Geburtsgewicht von über 1500g nur noch sehr selten vorkommt.¹⁴³

Aus dem Beschriebenen geht hervor, dass die BPD ein sehr komplexes Krankheitsbild mit sehr unterschiedlichem Verlauf und Schweregrad darstellt. Daher ist es schwierig, aber umso wichtiger, einheitliche Definitionen zur Klassifizierung der Erkrankung zu erarbeiten. Dies ist weniger für den täglichen klinisch praktischen Alltag von Relevanz, sondern ist vielmehr in Hinblick auf die Qualitätskontrolle und die Durchführung von aussagekräftigen klinischen Studien mit beispielsweise BPD als einem Endpunkt von grundlegender Bedeutsamkeit.²⁰ Aktuell werden zur klinischen Klassifikation der BPD zwei unterschiedliche Ansätze verwendet. Zum einen die von Jobe und Bancalari 2001 in ihrem Workshop Summary¹¹⁸ vorgestellte Einteilung in drei Schweregrade. Dabei wird der Schweregrad der BPD

in mild, moderat oder schwer in Abhängigkeit von Dauer und Höhe des Sauerstoffbedarfs gegliedert. Die einzelnen Kriterien sind in Abbildung 2 aufgeführt. An dieser Definition des National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) wird bemängelt, dass sie keine Angaben darüber enthält, welche pulsoximetrisch gemessenen Sauerstoffsättigungswerte (SpO_2) als Indikation für Sauerstoffbedarf angesehen werden.⁹⁴ Eine Umfrage des Vermont Oxford Network im Jahr 2002 ergab, dass als oberer pulsoximetrischer Schwellenwert zur Sauerstoffsupplementation Werte von weniger als 84% bis hinzu weniger als 96% bei den befragten Institutionen verwendet wurden. Insgesamt benutzten nur 41% der Antwortenden das gleiche Kriterium, nämlich SpO_2 weniger als 90%.⁶⁹ Diese Schwankungen in der praktisch klinischen Definition der Erkrankung haben verständlicherweise erheblichen Einfluss auf die sehr unterschiedlichen Angaben der Inzidenz der BPD.

	Gestationsalter	
	<32 Wochen	>32 Wochen
Zeitpunkt der Bestimmung	36 Wochen PMA oder Entlassung	>28d aber <56d PNA oder Entlassung
Sauerstoff-Supplementation	>21% für wenigstens 28d	>21% für wenigstens 28d
BPD		
Mild	Atmen von Raumluft mit 36 Wo PMA oder bei Entlassung*	Atmen von Raumluft mit 56d PNA oder bei Entlassung*
Moderat	Bedarf von <30% O_2 mit 36 Wo PMA oder Entlassung*	Bedarf von <30% O_2 bis 56d PNA oder Entlassung*
Schwer	Bedarf von >30% O_2 und/oder Beatmung/CPAP mit 36 Wo PMA oder bei Entlassung*	Bedarf von >30% O_2 und/oder Beatmung/CPAP mit 56d PNA oder bei Entlassung*

Abbildung 2: klinische Definition der BPD; *das frühere Ereignis ist entscheidend, **PMA**= postmenstruelles Alter, **PNA**= postnatales Alter, **CPAP**= continuous positive airway-pressure ventilation; modifiziert nach Jobe und Bancalari¹¹⁸

Um diese Variationen in der Diagnostik der BPD zwischen verschiedenen Kliniken zu verringern, ist im Jahr 2003 von Walsh und Mitarbeitern eine weitere Definition der BPD mit einem mehr physiologischen Ansatz veröffentlicht worden.²¹⁸ Walsh et al. legen einen pulsoximetrischen Sauerstoffsättigungswert von 88% zu Grunde. Dieser Wert wurde weniger aus physiologischer Kausalität gewählt, sondern vielmehr da dieser Wert einen hohen

praktischen Konsensus darstellt. Dabei wird durch schrittweise Reduktion der Sauerstoffzufuhr in 2% Schritten bis auf Raumluftniveau im postmenstruellen Alter von 36 Wochen überprüft, ob nach einem Beobachtungszeitraum von einer Stunde eine Sauerstoffsättigung von über 88% aufrecht erhalten werden kann. Fällt die Sättigung unter 88% wird die klinische Diagnose der BPD gestellt. Die Kriterien dieser Methode werden in Abbildung 3 demonstriert. Wie bereits erwähnt, bedeuten die uneinheitlichen diagnostischen Kriterien teilweise leider eine hohe Variabilität der Daten zur Ermittlung der Inzidenz der BPD. So konnten ebenfalls Walsh und Mitarbeiter 2004 zeigen, dass durch Annahme einer Sauerstoffsättigung >90% bei Raumluftbedingungen als Kriterium für eine notwendige Sauerstoffsupplementation die BPD-Inzidenz von 35% auf 25% künstlich gesenkt wurde.²¹⁹

Ein weiterer klinischer Ansatz zur Einschätzung und Klassifikation des Schweregrades der Erkrankung besteht in der Beurteilung von konventionellen Röntgenthoraces. Dabei wurden verschiedene Scoring-Systeme entwickelt, die zur prognostischen Einschätzung des Schweregrades hilfreich sein können.^{91;202}

Zeitpunkt der Bestimmung	36 Wochen PMA
BPD	<p>>30% O₂ und/oder Beatmung oder CPAP</p> <p>Oder</p> <p>SO₂ <88% bei Raumluft nach schrittweisem Reduktionstest und nach Beobachtungszeitraum von 1h</p>

Abbildung 3: Kriterien der physiologischen Definition der BPD, modifiziert nach Walsh et al.²¹⁸
PMA=postmenstruelles Alter, **CPAP**= continuous positive airway-pressure ventilation

Allein in den Vereinigten Staaten von Amerika werden jedes Jahr etwa 500.000 Kinder zu früh geboren. Davon sind etwa 20.000 Kinder mit einem Geburtsgewicht von unter 1000g extrem Frühgeborene (ELBWI).¹⁵⁴ Ehrenkranz und Mitarbeiter berichten, dass in dieser Gruppe von ELBWI (<1000g Geburtsgewicht und postmenstruelles Alter <32 Wochen) 77% eine BPD entwickeln.⁶⁷ Diese Zahl erscheint im Vergleich zu den Ergebnissen von Stevenson und Mitarbeitern sehr hoch. Hier wurde für die gleiche Gruppe der ELBWI eine BPD Inzidenz von 30% angesetzt.¹⁹⁶ Rojas et al. berichteten 1995 von einem Kollektiv, in dem 85% der Neonaten mit einem Geburtsgewicht zwischen 500 und 699g eine BPD entwickelten, im Gegensatz sind es lediglich 5% der über 1500g wiegenden Frühgeborenen, die davon betroffen

waren.¹⁸¹ Für Deutschland veröffentlichten Thomas und Speer 2005 Daten aus dem Geburtsjahrgang 2001. Die Ergebnisse zeigen eine BPD Inzidenz von 29% aller Neonaten, welche mit einem Gestationsalter von weniger als 32 Wochen zur Welt kamen. Bei den Frühgeborenen der 26. und 27. Schwangerschaftswoche (SSW) waren es sogar 51%.²⁰³

1.2.3 „Klassische“ Form der BPD

Die klassische oder auch als „alte“ BPD bezeichnete Form wurde von O’Brodovich und Mellins im Jahr 1985 vor allem durch das Vorhandensein von inflammatorischen Prozessen, Fibrose und der Hypertrophie der glatten Muskulatur der Atemwege charakterisiert. O’Brodovich und Mellins sahen 1985 die Ursache dieser Veränderungen ähnlich wie schon Northway et al. 1967 in erster Linie in der Kombination aus mechanischer Ventilation und Sauerstofftoxizität.¹⁶⁸ Die histologischen Charakteristika der alten Form der BPD werden vor allem durch extensive Fibroproliferation, schwere Läsionen des Flimmerepithels mit Plattenepithelmetaplasien, eine inhomogene Lungenstruktur mit dem Nebeneinander von atelektatischen und überblähten Bereichen, sowie durch eine reduzierte innere Lungenoberfläche mit geringer Alveolenanzahl beschrieben. Zusätzlich fielen bei Autopsiepräparaten von verstorbenen Patienten eine Hyperplasie der glatten Atemwegsmuskulatur und prominente hypertensive Veränderungen der Pulmonalarterien im Sinne eines „Remodelling“ auf.^{36;53} Bonikos et al. beschrieben diese pathologischen Veränderungen des Lungengewebes Mitte der 70er Jahre auch als bronchiolitische Form mit Fibrose.³⁶ Abbildung 4 zeigt exemplarisch ein histologisches Präparat mit den typischen histopathologischen Veränderungen der klassischen, chronisch proliferativen Form der BPD bei niedriger und stärkerer Vergrößerung.

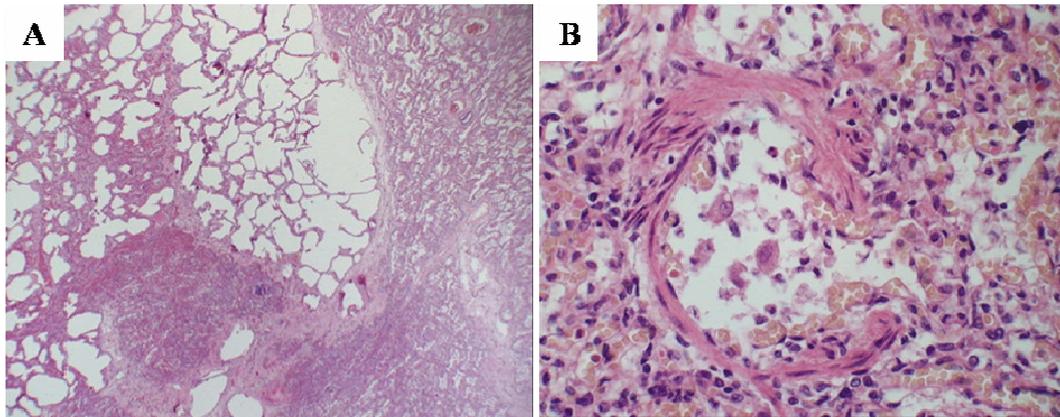


Abbildung 4: Histologische Beispiele einer klassischen BPD mit deutlich verdickten Alveolarsepten und Fibrosierung, dem Nebeneinander von atelektatischen und hyperinflatierten Arealen bei Übersicht (A) und Detailvergrößerung (B). Modifiziert nach Kinsella et al. 2006¹²²

Van Lierde und Mitarbeiter konnten später feststellen, dass neben der bronchiolitischen Form auch eine interstitielle Variante auftrat, die mehr durch einen Entwicklungsarrest der terminalen Luftwege gekennzeichnet war. Die distalen Luftwege waren gleichmässig verdickt, fibrosiert und nur wenig alveolarisiert.²¹² Es konnte also bereits ein gewisser pathologischer Progress beobachtet werden, der vor allem durch die Fortschritte in der Beatmungstherapie erklärbar ist, aber in ihrem Charakter änderte sich das pathologische Bild grundlegend erst durch die Einführung der exogenen Surfactanttherapie.⁵⁴ Die beschriebene „alte“ Form der BPD wird heute nur noch sehr selten beobachtet.

1.2.4 Präsentation der „neuen“ BPD

Diese mildere Form der BPD betrifft heute in erster Linie die ELBWI. Diese Kinder zeigen häufig initial keine oder nur milde Zeichen eines RDS.¹⁸¹ Das Ansprechen auf Surfactantgabe ist gut und die prolongierte Beatmung kann häufig mit niedrigen Drücken und Sauerstoffkonzentrationen durchgeführt werden.^{20;44;172} Es schließt sich oftmals eine Phase an, in der die Neonaten teilweise sehr wenig bis gar keine Sauerstoffsupplementation benötigen und welche daher gelegentlich auch als „honeymoon“ bezeichnet wird. Leider zeigen viele dieser Frühgeborenen mit der Zeit eine progressive Verschlechterung in der Lungenfunktion, welche sich mit steigendem Sauerstoffbedarf, Tachypnoe sowie Einziehungen manifestiert.¹⁸

Der Terminus „neue“ BPD wurde 1999 von Alan Jobe geprägt.¹¹⁹ Dabei bezieht sich der Autor auf die Beobachtungen aus histopathologischen Untersuchungen an Lungen verstorbener Kinder, die im Rahmen der neonatologischen Versorgung bereits mit exogenem Surfactant behandelt worden waren. So konnten Husain und Mitarbeiter 1998 zeigen, dass bei diesen Frühgeborenen deutlich weniger ausgeprägte Fibrosierungszeichen und Inflammation zu erkennen waren als von der klassischen BPD zuvor beschrieben wurden. Zusätzlich hatten diese Kinder auch eine geringere Alveolenanzahl mit einem größeren Durchmesser.¹¹⁴ Diese Observationen ähneln sich sehr mit den Berichten mehrerer Untersuchungen an den Lungen von ELBWI mit und ohne Vorgeschichte einer HMD, die zwar noch kurz vor Einführung der Surfactanttherapie behandelt worden waren, aber schon mit sehr schonenden Ventilationsmodi und niedrigen Sauerstoffkonzentration beatmet wurden.^{43;107;151;197} Hierbei fielen verplumpte und variabel geformte Alveolen auf, die den Charakter eines generalisierten Emphysems mit überblähter Alveolarstruktur besitzen.¹⁰⁷

Coalson analysierte die Lungenbiopsien von Frühgeborenen mit einem Gestationsalter zwischen 24 und 28 Wochen, die an einer schweren BPD litten. Dabei fiel auf, dass in allen untersuchten Proben nur ein geringer Grad an Flimmerepithelveränderungen, sowie eine deutlich simplifizierte distale azinäre Architektur mit weiten sakkulären und alveolären Strukturen zu erkennen war. Die alveoläre Komplexität war nur gering, was sich vor allem in der reduzierten sekundären Septierung widerspiegelte.³² Die selbe Autorin konnte 2003 die gleichen histopathologischen Veränderungen bei autoptischen und bioptischen Präparaten von Kindern bestätigen, die sowohl pränatale Steroide, als auch postnatale Surfactantgaben erhalten hatten. Es dominierten die ausgeweiteten distalen Luftwege mit minimaler Alveolarisierung und eine dysmorphe kapilläre Konfiguration mit variablem Grad an alveolo-septaler Fibrosierung.⁵³ In Abbildung 5 sind exemplarisch zwei Präparate mit den typischen Aspekten der „neuen“ BPD dargestellt. Die Präparate stammen aus autoptischen bzw. bioptischen Proben von

Kindern, die mit pränatalen Steroiden und postnatalen Surfactantpräparaten behandelt worden waren.

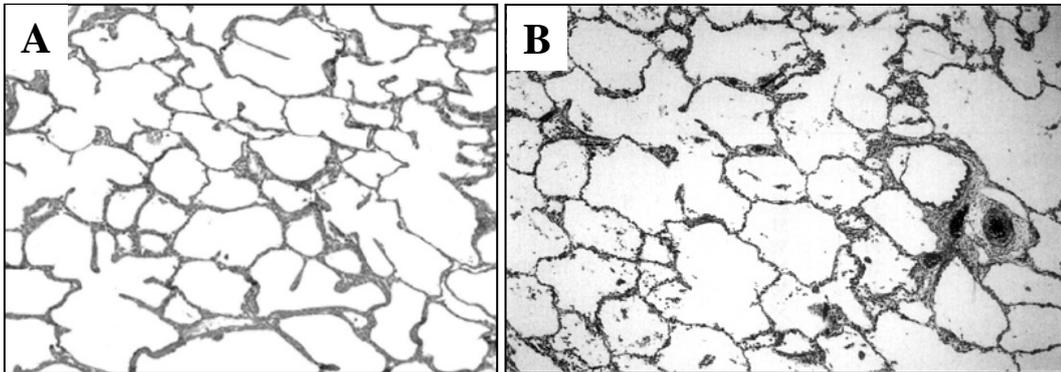


Abbildung 5: Histologische Beispiele einer „neuen“ BPD von Patienten, die mit pränatalen Steroiden und postnatalen Surfactantpräparaten behandelt worden waren. Es dominiert das Bild der großen simplifizierten distalen Luftwege mit keiner bis wenig fibrotischer septaler Verdickung.

A modifiziert aus Coalson, 2006,⁵⁴ **B** modifiziert aus Husain et al.,1998¹¹⁴

Zusammenfassend lassen sich die histopathologischen Charakteristika der neuen BPD wie folgt beschreiben: Vorliegen weniger großer Alveolen mit simplifizierter Architektur und geringer azinärer Komplexität, geringgradige regionale Heterogenität, ein schwach ausgeprägtes und dysmorphes Kapillarbett, variable aber tendenziell schwache interstitielle Fibroproliferationen und glattmuskuläre Hyperplasie, weniger ausgeprägtes vaskuläres Remodelling als bei der prä-Surfactant BPD, bei insgesamt reduzierter arterieller Vaskularisierung und zu vernachlässigenden Flimmerepithelläsionen.^{53;122} Die im Vordergrund stehende alveoläre Simplifizierung hat die Begriffe „alveoläre Hypoplasie“⁵³ oder auch „Arrest der Lungenentwicklung“¹¹⁹ geprägt. Diese Termini umschreiben gut die Tatsache, dass es sich bei der „neuen“ BPD um eine Störung der postnatalen Alveolarisierung einer anatomisch-strukturell unreifen Lunge zu handeln scheint.^{53;54;114}

Das in den 60er Jahren erstmalig nach seinen Erstbeschreibern benannte Wilson-Mikity Syndrom (WMS) wurde lange Zeit als eigenständiges Krankheitsbild gesehen, welches mit Frühgeburtlichkeit assoziiert ist und eine Differentialdiagnose zur CLD darstellt.^{109;226} Typischerweise fehlen die Zeichen eines initialen RDS, dabei wird auch eine infektiöse Genese diskutiert.¹⁰⁴ Mittlerweile mehren sich die Hinweise darauf, dass es sich beim WMS nicht um ein

eigenständiges Syndrom, sondern vielmehr um eine Variante der „neuen“ BPD handeln könnte.¹⁰⁸

1.2.5 Aktuelles Verständnis der Pathogenese

Die Entstehung der BPD ist multifaktoriell. In der Vergangenheit konnten einige Risikofaktoren und Auslöser, die zur Entwicklung einer BPD beitragen, identifiziert werden. Dabei sind die schon seit der ursprünglichen Beschreibung des Krankheitsbildes bekannten Faktoren Hyperoxie und Barotrauma immer noch von zentraler Bedeutung. Allerdings sind mittlerweile deutlich mehr Erkenntnisse über die Ätiologie gewonnen worden und es konnten zusätzliche Auslöser, die in der Pathogenese der BPD eine wichtige Rolle spielen, aufgedeckt werden. Dabei stellt, wie bereits erwähnt, die Frühgeburtlichkeit mit ihrer anatomisch-strukturellen Immaturität und biochemischen Unreife der Lunge natürlich den wichtigsten ätiologischen Faktor überhaupt dar. Abbildung 6 liefert einen schematischen Überblick über das heutige multifaktorielle pathogenetische Verständnis.

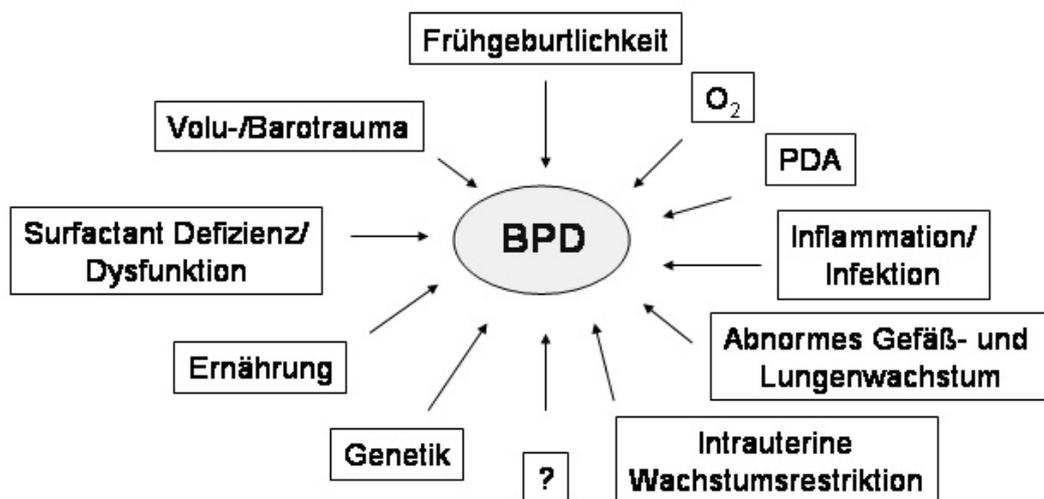


Abbildung 6: Schematische Darstellung des heutigen Verständnisses der multifaktoriellen Ätiologie der BPD, PDA= persistierender Ductus arteriosus, modifiziert nach Chess et al. 2006⁴⁶

Es konnte gezeigt werden, dass der Faktor Hyperoxie für die Entstehung der BPD nicht obligat ist, aber dennoch eine zentrale Bedeutung besitzt.^{18;44;119;181} Die gesteigerte Produktion von zytotoxischen freien Sauerstoffradikalen und die dadurch überlasteten antioxidativen Enzymsysteme der noch unreifen Lunge, werden für die hyperoxische Lungenschädigung verantwortlich gemacht.^{35;56;57} Frühgeborene verfügen über nur unzureichende antioxidative Enzymsysteme wie Superoxiddismutase (SOD), Katalase und

Glutathionperoxidase,¹⁸² sowie niedrige Spiegel an Antioxidantien wie Vitamin C und E.^{38;210} Es ist bekannt, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) durch Enzymoxidation, Proteaseinhibition, Störung der DNA-Synthese, eine verminderte Surfactantproduktion und als chemotaktischer Faktor für Entzündungszellen extensive Gewebeschäden verursachen können.^{24;50} In mehreren Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass die Exposition gegenüber Hyperoxie bei neonatalen Mäusen^{35;222} und Ratten^{45;102;180}, sowie bei frühgeborenen Pavianen⁵² Lungenveränderungen hervorruft, die sehr stark der BPD ähneln.

Der Zusammenhang zwischen dem beatmungsbedingten Volutrauma und der BPD wird durch Beobachtungen von Kraybill und Kollegen gestützt. Sie konnten zeigen, dass niedrige arterielle CO₂-Drücke (PaCO₂) und das Risiko eine BPD zu entwickeln, umgekehrt miteinander korrelieren.¹³³ Durch manuelle Beatmung mit Tidalvolumina von nur 8ml/kg Körpergewicht konnte in experimentellen Studien der Zusammenhang von bereits geringem kurzzeitigem Volutrauma und Lungenschädigungen gezeigt werden.^{29;30} Außerdem wurde in zahlreichen tierexperimentellen Untersuchungen demonstriert, dass eine mechanische Beatmung bei unreifen Neonaten durch Überdehnung eine Zerreißung von strukturellen Elementen mit folgender pro-inflammatorischer Antwort und Leukozyteninflux hervorruft.^{7;62;166;204;208} Bestimmte Beatmungsstrategien haben dabei aber eine größere schädigende Potenz als andere. So konnten beispielsweise Muscedere und Kollegen am Rattenmodell zeigen, dass eine Ventilation mit hohen Tidalvolumina und fehlendem positiven endexpiratorischem Druck (PEEP) eine signifikant höhere inflammatorische Antwort zu Folge hatte, als die Beatmung mit moderaten Tidalvolumina und hohem PEEP.¹⁶⁶ Letztere Variante ermöglicht eine höhere Stabilisierung der Alveolen und wird dadurch als schonender angesehen. Interessanterweise konnten Thome et al. in einer klinischen Studie keinen positiven Einfluss der Hochfrequenz-Oszillations-Beatmung (HFOV) auf die Entzündungsreaktion im Vergleich zur konventionellen intermittierend positive pressure ventilation (IPPV) zeigen.²⁰⁴ Überraschend konnte sogar für die Anwendung der als sehr schonend angesehenen Methode des continuous positive airway pressure (CPAP) im Rattenmodell eine Lungenschädigung nachgewiesen werden.²⁰⁹

Die Assoziation von systemischen bakteriellen „early onset“ Infektionen mit der Entwicklung einer BPD bei VLBWI konnte von Groneck et al. deutlich demonstriert werden.^{92;93} Zusätzlich wurden auch systemische nosokomiale Infektionen als Risikofaktor für die Entstehung der BPD identifiziert.^{55;181} Epidemiologische und experimentelle Daten zeigen weiterhin einen deutlichen Zusammenhang zwischen intrauteriner Exposition gegenüber pro-inflammatorischen Zytokinen, sowie anderen Mediatoren im Rahmen einer Chorioamnionitis

und der Entstehung einer BPD. In diesem Kontext wurde auch demonstriert, dass erhöhte pro-inflammatorische Zytokinspiegel in Fruchtwasser und fetalem Nabelschnurblut -als Indikatoren einer fetalen systemischen Entzündungsantwort- unabhängige Risikofaktoren für die BPD darstellen.^{83;185;229} Die genauen Pathomechanismen über die fetale systemische Entzündungsreaktionen zur Entstehung einer BPD beitragen, sind leider immer noch nur unvollständig verstanden. Weiterhin wird die Bedeutung einer Atemwegsbesiedlung oder sogar Infektion mit Koagulase-negativen Staphylokokken und Gram-negativen Erregern für die Pathogenese der BPD kontrovers diskutiert.⁹³ Ähnliche Uneinigkeit herrscht auch für den Einfluss von *Ureaplasma urealyticum* (Uu).²²¹ Uu ist ein Mikroorganismus, welcher als Häufigster aus dem Fruchtwasser von Frühgeborenen isoliert und als pathogener Faktor auch unmittelbar nach der Geburt im Atemwegssekret nachgewiesen werden kann.^{92;228} Es existieren auch Berichte darüber, dass der Nachweis von Uu im Respirationstrakt von Frühgeborenen – auch ohne die Anwesenheit klinischer oder laborchemischer Entzündungsparameter- mit erhöhten zellulären und molekularen Inflammationsmarkern und mit einem erhöhten BPD-Risiko assoziiert ist.^{93;129;183}

Nach dem heutigen Verständnis führen die oben genannten Faktoren Hyperoxie, Volu- und Barotrauma, Chorioamnionitis und Infektion in additiver oder synergistischer Weise zur Induktion einer pulmonalen Inflammationsreaktion. Durch das entstehende Ungleichgewicht von pro-inflammatorischen und anti-inflammatorischen Mechanismen kommt es zur Störung der alveolo-kapillären Einheit und damit zur Affektion der Gewebeintegrität mit Beeinträchtigung der normalen Alveolarisation und Gefäßentwicklung mit der möglichen Folge einer BPD.^{194;195}

Bereits 1979 konnten Brown und Mitarbeiter zeigen, dass Kinder die einen persistierenden Ductus arteriosus (PDA) aufweisen, einem höheren Risiko für die Entwicklung einer BPD unterworfen sind.³⁹ Diese Beobachtung wurde in den folgenden Jahrzehnten in zahlreichen Untersuchungen bestätigt und der PDA als Risikofaktor für die CLDI allgemein akzeptiert.^{18;153;181;207} Gonzalez et al. publizierten 1996 Daten, die zusätzlich auf eine Potenzierung dieses Risikos bei gleichzeitig vorliegender Infektion von Kindern unter 1000g Geburtsgewicht hinweisen.⁸⁴ Dabei wird der Zusammenhang zwischen beiden Faktoren vor allem in einer Flüssigkeitsüberlastung mit konsekutiver Verschlechterung der Lungenfunktion gesehen.¹²² Die Bedeutung der strengen Flüssigkeitsbilanzierung zur Verminderung des BPD-Risikos wird auch von den klinischen Studien von Oh et al., sowie von Marshall und Kollegen gestützt.^{153;171} Dennoch konnte auch in aktuellen Untersuchungen bisher kein kausaler Zusammenhang zwischen PDA und BPD demonstriert werden, weder auf tierexperimenteller

Ebene,¹⁵⁸ noch am Menschen.¹⁴¹ Auch die Resultate des „trial of indomethacin prophylaxis in preterms“ (TIPP) konnten keine Verminderung des BPD-Risikos durch eine prophylaktische Indomethacingabe bei ELBWI belegen.¹⁸⁶ Die möglichen Gründe dafür sind vielfältig und werden vor allem in den antidiuretischen und lungentoxischen Nebenwirkungen des Indometacins gesehen.^{77;187} Um diese für den klinischen Alltag wichtige Frage zu beantworten, müssen weitere randomisierte kontrollierte Studien mit Placebogruppen durchgeführt werden.³⁷

In der nahen Vergangenheit sind ebenfalls verschiedene Hinweise für das Vorliegen von genetisch determinierten pathogenetischen Faktoren beschrieben worden. So konnten vor allem Polymorphismen der für die Surfactantproteine A, B, C und D (SP-A, B, C und D) kodierenden Abschnitte, als BPD assoziierte Mutationen identifiziert werden.^{99;100;149;224} Die genetische Bedeutung für die BPD wird auch durch Zwillingsstudien gestützt. Dabei konnte die Diagnose BPD bei einem Kind als hoch signifikanter Prädiktor für das Auftreten einer BPD beim Geschwisterkind analysiert werden.²⁷

Der Einfluss der Ernährung für die CLD ist bereits seit den Untersuchungen von Ehrenkranz et al. 1979 bekannt. Die Arbeitsgruppe konnte den positiven Effekt einer Vitamin E Supplementation auf die BPD Entstehung zeigen.^{64;66} Die Vitamin E Gabe gehört heute im Rahmen der intensivmedizinischen Ernährungspläne zur Routine, auch wenn in späteren klinischen Studien der positive Effekt einer Vitamin E Gabe auf die BPD Häufigkeit bzw. Mortalität bei Kindern unter 1500g Geburtsgewicht nicht bestätigt werden konnte.^{65;223} Eindeutiger ist die Studienlage bezüglich des Vitamin A, für welches Tyson et al. sowie Darlow et al. durch Supplementationsbehandlung eine Verringerung der BPD-Inzidenz bei ELBWI demonstrieren konnten.^{60;211} Dabei wird angenommen, dass Vitamin A als Stimulator der Reepithelialisierung des Lungengewebes wirkt und Retinoide auch als Mediatoren der Alveolarisierung wichtig sind.^{12;117} Die Bedeutung des Phospholipids Inositol als möglicher Stimulator der Surfactantsekretion konnten Hallman et al. 1992 in einer doppel-blinden klinischen Studie demonstrieren.⁹⁸ Zudem scheint Inositol auch einen günstigen Einfluss auf weitere neonatale Komplikationen wie die Neugeborenenretinopathie und höhergradige intraventrikuläre Blutungen zu haben.¹¹² Aber auch der deutlich negative Effekt von kalorischer Unterernährung und Protein-Malnutrition auf die Alveolarisation wurde mehrfach publiziert.^{79;155}

Das gehäufte Auftreten der BPD bei dystrophen Neugeborenen –auch als „small for gestational age“ (SGA) bezeichnet- konnten Gortner und Mitarbeiter für Frühgeborene vor Vollendung der 32. Schwangerschaftswoche nachweisen.⁸⁶ Aber auch populationsbasierte Studien konnten den Zusammenhang von SGA und BPD bestätigen.^{138;178} In

tierexperimentellen Untersuchungen wurde außerdem gezeigt, dass die intrauterine Wachstumsrestriktion zu einer reduzierten Surfactantprotein mRNA-Expression und einer gesteigerten inflammatorischen Aktivierung führt.⁸⁵

In den letzten Jahren haben sich die Hinweise, welche die Bedeutung von abnormalen Wachstumsfaktor-Signalkaskaden für die gestörte Lungenentwicklung beleuchten, gemehrt.^{135;136} So konnten in den Luftwegen von frühgeborenen Kindern erhöhte Konzentrationen des Wachstumsfaktors TGF- β festgestellt werden.^{130;142} Es ist bekannt, dass eine Lungenschädigung und der assoziierte inflammatorische Prozess zu einer Induktion von TGF- β führt und dabei eine Schlüsselrolle in der Vermittlung von Gewebereparatur und Remodelling einnimmt.²⁵ Dennoch können exzessive Reparaturprozesse auch dazu führen, dass die physiologische Lungenentwicklung gestört wird. So konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von TGF- β zu einer ausgeprägten pulmonalen Fibrosierung führen kann.¹⁹¹ Es wird angenommen, dass das Zusammenspiel aus verminderter Expression des Gewebewachstumsfaktors CTGF –einem zweiten wichtigen Mediator in der Induktion der pulmonalen Fibrose- zum BPD typischen Arrest von Lungengewebe und Gefäßwachstum führen kann.¹⁹⁵ Auch verminderte Atemwegskonzentrationen des keratinocyte und des hepatocyte growth factors (KGF und HGF), von denen vermutet wird, dass sie an der normalen Lungenentwicklung beteiligt sind, wurden mit der BPD in Verbindung gebracht.^{58;139} Gleiches gilt auch für verschiedene Hypoxie-induzierbare Faktoren (HIFs), welche entscheidend an der Angiogenese beteiligt sind.¹⁰ Durch Tierversuche konnte auch die wichtige Bedeutung des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) und seinem Rezeptor für die Mikrovaskularisation und Alveolarisation am Modell der BPD gezeigt werden.¹⁹⁸ Im Modell der Hyperoxie-induzierten BPD bei Ratten wurde die Assoziation von vergrößerten terminalen Luftwegen, sowie der Verlust von Lungenkapillaren mit verminderter VEGF und VEGF-Rezeptor Expression demonstriert. In diesem Modell konnte durch die postnatale adenoviral vermittelte VEGF-Gentherapie die Gefäß- und Alveolarentwicklung verbessert werden.²⁰¹ In wenigen Untersuchungen am Menschen dieser Art konnten Bhatt et al. sowie die Arbeitsgruppe von Lassus zeigen, dass auch Frühgeborene mit RDS bzw. manifester BPD eine verminderte VEGF mRNA- und Proteinexpression sowie Expression des zugehörigen VEGF-Rezeptors (flt-1) im Lungengewebe aufweisen.^{28;140} Interessanterweise waren diese Konzentrationen bei den verstorbenen Kindern signifikant niedriger als bei den Überlebenden.¹⁴⁰ Aus der Lungenentwicklung ist bekannt, dass das vaskuläre Wachstum eng mit der Alveolarisierung synchronisiert, sowie während der gleichen zeitlichen Phase stattfindet.

Viele dieser Erkenntnisse unterstreichen die Bedeutung der vaskulären Entwicklung für die Alveolarisation und die Lungenentwicklung insgesamt, sodass die Stimmen, welche für die Pathogenese der BPD vor allem diese sogenannte vaskuläre Hypothese ursächlich sehen, immer lauter werden.³ Dennoch bleiben bis heute die wesentlichen Mechanismen, die für die Vermittlung zwischen Angiogenese und dem Wachstum der terminalen Luftwege entscheidend sind, unverstanden.

1.2.6 Aktuelles Verständnis der Pathophysiologie

Unabhängig von den exakten histopathologischen Befunden führen die krankhaften Veränderungen zu einer Beeinträchtigung des Gasaustausches mit resultierender Hypoxämie, Hyperkapnie und pulmonaler Hypertension.⁴⁸ Die typischen chronischen respiratorischen Zeichen äußern sich klinisch mit Tachypnoe und flacher Atmung, Einziehungen und paradoxem Atemungsablauf. Durch das beschriebene Atemmuster wird die Totraumventilation noch zusätzlich verstärkt.¹²² Aufgrund von Inhomogenitäten der Lungenstruktur kommt es zu einem verstärkten Ventilations-Perfusions-Missverhältnis mit konsekutivem Rechts-Links-Shunt und daraus resultierender Hypoxämie mit Sauerstoffbedarf.^{94;122}

Die Compliance der Lunge ist typischerweise vermindert und scheint gut mit den morphologischen und radiologischen Veränderungen der Lunge zu korrelieren.⁴⁰ Als Ursachen der reduzierten Compliance werden die interstitielle Fibrose, Ödembildung sowie Atelektasen angesehen. Der Atemwegswiderstand –auch als Resistance bezeichnet– ist sowohl vor Diagnosestellung der Erkrankung, als auch im fortgeschrittenen Stadium erhöht nachweisbar.^{82;227} Zu Beginn ist das funktionelle Lungenvolumen häufig durch vorhandene Atelektasen reduziert, kann sich aber im weiteren Verlauf zunehmend zu einer Hyperinflation bis hin zu in der Literatur beschriebenen extremen Ausmaßen wandeln.^{122;190}

Die vorhandenen strukturellen Veränderungen der Lungengefäße tragen durch Einengung des Gefäßdurchmessers und verminderte vaskuläre Compliance zum erhöhten pulmonalarteriellen Widerstand bei.¹⁷⁴ Die pulmonale Zirkulation bei BPD Patienten ist außerdem durch eine abnorme Vasoreaktivität gekennzeichnet, welche zusätzlich die pulmonalvaskuläre Resistance erhöht.^{5;97} Diese abnorme Vasoreaktivität ist vor allem durch eine ausgeprägte hypoxische pulmonale Vasokonstriktion bestimmt.¹⁶³ Die pulmonale Hypertension mit konsekutiver Ausbildung eines Cor pulmonale trägt signifikant zur Morbidität und Mortalität der BPD bei.^{76;220} Auch wenn die pulmonale Hypertonie in erster Linie einen Marker der schwerwiegenden BPD darstellt, so verursacht aber auch eine erhöhte pulmonale

Resistance bereits eine schlechte rechtsventrikuläre Funktion, verringertes kardiales Output, schlechte Sauerstoffdistribution, verstärkte pulmonale Ödembildung sowie möglicherweise ein erhöhtes Risiko für das SIDS.¹²²

1.3 Zur Bedeutung von Stickstoffmonoxid (NO) in der Therapie

Die potentielle Bedeutung von inhalativem Stickstoffmonoxid (iNO) für die Prävention und Therapie der BPD ist seit bereits über zehn Jahren von hohem wissenschaftlichen Interesse und somit auch Gegenstand vieler lebhafter Diskussionen gewesen und bleibt es bei unklarer klinischer und experimenteller Studienlage auch nach wie vor.

Wie den Erläuterungen in 1.2.6 zu entnehmen ist, führt ein zunehmender Schweregrad der BPD auch zu einem konsekutiven Ventilations-Perfusions-Mismatch in der Lunge mit resultierendem Rechts-Links-Shunt und somit zur Hypoxämie. Es ist bekannt, dass inhaliertes Stickstoffmonoxid (iNO) durch die selektive Vasodilatation von gut belüfteten Lungenarealen einem solchen Missverhältnis und damit bestehenden intrapulmonalen Rechts-Links-Shunts entgegen wirken und somit auch den pulmonalvaskulären Druck senken kann. Bereits in den 90er Jahren konnte in diesem Zusammenhang von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass durch die Applikation von iNO bei reifen Neugeborenen die Oxygenation verbessert werden kann.^{2,51,127} Skimming et al. demonstrierten 1997 diesen positiven Effekt von iNO auf die Oxygenation auch an Frühgeborenen mit RDS und zeigten dabei zusätzlich, dass dabei die Applikation von 5 bzw. 20 parts per million (ppm) iNO keine konzentrationsabhängigen Effekte auf die verbesserte Oxygenierung aufweist.¹⁹² Bereits 1999 konnten Banks und Mitarbeiter in ihrer klinischen Studie bestätigen, dass iNO auch bei unreifen Neugeborenen mit BPD zu einer verbesserten Oxygenierung und einer Verringerung der pulmonalvaskulären Resistance führt.²¹ Diese viel versprechenden Beobachtungen erweckten hohe klinische Erwartungen an eine präventive Therapie mit iNO bei frühgeborenen Kindern, in der Hoffnung durch eine geringere notwendige Sauerstoffsupplementation und damit potentiell weniger invasiver Beatmung und kürzerer Beatmungsdauer eine Reduktion in der BPD Häufigkeit zu erreichen.

In mehreren späteren randomisierten klinischen Studien wurde iNO bei verschiedenen Schweregraden und zu unterschiedlichen Zeitpunkten der neonatalen respiratorischen Insuffizienz eingesetzt. So wurde iNO sowohl bei Frühgeborenen mit schwerem

respiratorischem Versagen,^{128;159;213} bei frühgeborenen Kindern mit moderatem RDS,¹⁸⁸ bei Kindern nach dem 10. Lebenstag mit einer folglich frühen Form der BPD,⁴⁹ sowie bei Patienten welche bereits an einer manifesten BPD erkrankt waren,²¹ angewendet. In der 2005 publizierten sehr großen Studie von Van Meurs und Mitarbeitern konnte kein signifikanter Effekt von iNO auf die kombinierte Endgröße Tod oder BPD bei erkrankten Frühgeborenen mit einem Gewicht von unter 1500g im Vergleich zur Plazebokontrolle konstatiert werden. Allerdings wurde hierbei bei retrospektiver Aufgliederung des Untersuchungskollektives in der Untergruppe der Kinder mit einem Gewicht von über 1000g, eine geringe Verbesserung im Outcome beobachtet.²¹³ Auch die Arbeitsgruppe von Kinsella stellte 1999 bei einem erkennbaren positiven Trend keinen signifikanten Einfluss auf die BPD-Inzidenz fest.¹²⁸ Diese Resultate stehen im Gegensatz zu den Daten aus der von Schreiber et al. 2003 publizierten Studie, in welcher durch die iNO-Behandlung Frühgeborener mit moderatem RDS eine signifikante Reduktion der Kombinationsendpunkte Tod oder BPD erreicht werden konnte. Dabei schienen vor allem solche Patienten zu profitieren, die an einer weniger schweren Form der Lungenerkrankung litten.¹⁸⁸ Auch weitere Studien von Hascoet et al.,¹⁰³ Dani et al.⁵⁹ und die multizentrische randomisierte INNOVO Studie von Field und Mitarbeitern⁷⁴ zeigten keinen signifikanten Effekt von iNO auf die Mortalität und Morbidität Frühgeborener und konnten damit auch keine ausreichende Datenlage zur Etablierung einer allgemeinen Empfehlung für iNO bei frühgeborenen Kindern mit respiratorischer Insuffizienz schaffen.

Die potentiellen Nebenwirkungen des iNO, die vor allem durch die bekannte Verlängerung der Blutungszeit^{80;110} und eine Inhibition der Thrombozytenaggregation^{47;80} in einem erhöhten Risiko für das Auftreten von intraventrikulären Hämorrhagien (IVH) befürchtet wurden, konnte in mehreren der bereits genannten Studien nicht bestätigt werden.^{2;128;188} In einer der sehr wenigen vorliegenden Untersuchungen zu den Langzeiteffekten einer iNO-Behandlung konnten Mestan et al. sogar eine Verbesserung des neurologischen Outcomes bei zweijährigen ehemaligen Frühgeborenen, die mit iNO behandelt worden waren, im Vergleich zur Plazebogruppe demonstrieren.¹⁶¹ Erst vor sehr kurzer Zeit wurden die Ergebnisse der beiden bisher größten durchgeführten multizentrischen klinischen Studien der zwei Arbeitsgruppen um Kinsella und Ballard veröffentlicht. Kinsella et al. konnten einen positiven Effekt von iNO auf die BPD-Inzidenz nur für Kinder mit einem Geburtsgewicht von mehr als 1000g belegen, dabei konnte jedoch ein insgesamt vermindertes Risiko für das Auftreten von IVH, periventrikulärer Leukomalazie oder Ventrikulomegalie festgestellt werden.¹²¹ Positiver waren die Resultate von Ballard et al., die eine Verringerung der BPD-Häufigkeit durch iNO im Vergleich zur Plazebogruppe zeigen konnten, wenn die Therapie

zwischen dem 7. und 21. Lebensjahr begonnen wurde. Kurzfristige Nebenwirkungen wurden in dieser Studie ebenfalls nicht beobachtet.¹⁷ Aussagekräftige Langzeitergebnisse werden aus diesen Studien erst in etwa 2 Jahren zu erwarten sein. Aus dem Beschriebenen geht jedoch hervor, dass die klinische Studienlage nach wie vor uneindeutig bleibt und somit, auch unter Berücksichtigung der enorm hohen Therapiekosten von iNO, aktuell keine Empfehlung für den routinemäßigen Einsatz außerhalb von kontrollierten Studien gegeben werden kann.

Die Erwartungen an die iNO-Therapie bleiben trotz der unbefriedigenden klinischen Studienlage hoch. Dies ist vor allem dadurch begründet, dass sich gerade aus der experimentellen Forschung zusätzlich die Hinweis darauf mehrten, dass Stickstoffmonoxid auch im Rahmen der strukturellen Lungenentwicklung, wie der dichotomen Aufzweigung²³⁰ und der Alveolarisation¹⁵ eine entscheidende Bedeutung einnimmt. Es existieren zahlreiche Erkenntnisse, die einen günstigen Einfluss von iNO auf den frühen pulmonalen Influx von Neutrophilen¹²⁶ und eine mögliche Potenz zur Reduktion des oxidativen Stresses,^{96;115} vermuteten lassen. Vor allem die Akkumulation von Neutrophilen nimmt eine wichtige Position in der zur CLD beitragenden inflammatorischen Kaskade ein und somit erscheint eine antiinflammatorische Potenz von iNO wahrscheinlich.^{170;233} In verschiedenen Tiermodellen der BPD konnte durch iNO eine signifikante Verbesserung der pathologischen Lungenentwicklung nachgewiesen werden.^{157;199} Weitere experimentelle Untersuchungen weisen darauf hin, dass NO auch eine wichtige Rolle in der Angiogenese und dabei vor allem in den durch VEGF und HGF vermittelten angiogenetischen Prozessen, zu spielen scheint.^{231;232} Dennoch bleiben diese Beobachtungen weitestgehend unverstanden und es liegen bis heute nur sehr vage Informationen über die molekularen Mechanismen, die zellulären Zusammenhänge und die Bedeutung des Stickstoffmonoxidsystems für die physiologische Lungenentwicklung und dessen Rolle in der Entstehung der BPD vor. Daher bleibt die Hoffnung, über eine Beeinflussung des NO-Systems möglicherweise die Entstehung einer CLD kausal verhindern zu können, von treibender Kraft in der BPD-Forschung.

1.4 Der NO-sGC-cGMP Signaltransduktionsweg

Bei Stickstoffmonoxid (NO) handelt es sich um ein einfaches, gasförmiges freies Radikal. Im Rahmen der endogenen NO-Synthese sind verschiedene komplex aufgebaute große Enzymkomplexe, die NO-Synthasen (NOS), von zentraler Funktion. Es werden im

Wesentlichen drei Isoformen (NOS-1, -2 und -3), welche zwar alle die gleiche Reaktion katalysieren, aber sich vor allem in ihrer Lokalisation und Expression voneinander abgrenzen, unterschieden. Das Substrat, welches alle NOS in NADPH-Abhängigkeit zur Synthese von NO heranziehen, ist die Aminosäure L-Arginin.¹⁵²

Endogenes und exogen zugeführtes NO kann sowohl in Abhängigkeit eines intrazellulären second messenger Signalmoleküls, dem zyklischen Guanosin-3'-5'-monophosphat (cGMP), oder unabhängig davon zelluläre Effekte bewirken. Als Beispiele für diese cGMP unabhängigen NO-Effekte sind vor allem Interaktionen mit Metallkomplexen, Hyperoxiden und Sauerstoff zu nennen. Die cGMP abhängigen NO-Effekte werden über Guanylatzyklasen (GC) vermittelt, die daher auch als NO-Rezeptor bezeichnet werden. Dabei existieren zwei Gruppen der GC, die beide cGMP aus intrazellulärem Guanosintriphosphat (GTP) generieren: die membrangebundenen GC und die zytosolisch gelösten GC (sGC). Als NO-Rezeptor scheinen in erster Linie die sGC wesentlich zu sein. Die sGC können über die Generierung aus GTP und damit dem zytosolischen Konzentrationsanstieg von cGMP, verschiedene cGMP-abhängige Effektorsysteme wie Ionenkanäle, Phosphodiesterasen und Proteinkinasen regulieren.¹³⁴ Diese Effektorsysteme wiederum bewirken vielfältige und nur zum kleinen Teil verstandene physiologische Prozesse. Zu den am meisten untersuchten cGMP-vermittelten zellulären Effekten, zählen unter anderem die Relaxation von glatten Muskelzellen und somit vasodilatative und antihypertensive Elemente, sowie thrombozytenaggregationshemmende, Zellwachstum und Differenzierung beeinflussende, antiinflammatorische und angiogenetische Prozesse.^{70;165} Die Spaltung von cGMP zu Guanosinmonophosphat (GMP) und damit die Limitation der beschriebenen zellulären Effekte, geschieht durch eine weitere Enzymfamilie, den cGMP-spezifischen Phosphodiesterasen (PDE). Es sind zahlreiche unterschiedliche Isoformen der cGMP-spezifischen Phosphodiesterasen bekannt, darunter ist die PDE5 mit ihrer sehr hohen Spezifität für cGMP und starken Expression im Lungengewebe in ihrer Bedeutung hervorzuheben.¹⁴⁶

Für die Enzymgruppe der Phosphodiesterasen ist mittlerweile eine Reihe an pharmakologischen Inhibitoren entwickelt worden, die zum Teil mit großem klinischem Erfolg unter anderem in der Therapie der erektilen Dysfunktion sowie der pulmonalen Hypertonie eingesetzt werden. Auch für die sGC existieren bereits mehrere Substanzen, die NO-unabhängig eine Stimulation bzw. Aktivierung dieses Enzymkomplexes bewirken und damit eine Verstärkung der cGMP-vermittelten Prozesse erreichen können. Abbildung 7 gibt einen vereinfachten schematischen Überblick über das aktuelle Verständnis des NO-cGMP

Signaltransduktionsweges und dessen pharmakologische Angriffspunkte, welche auch in den Versuchen der vorliegenden Dissertation als therapeutische Ansätze verwendet wurden.

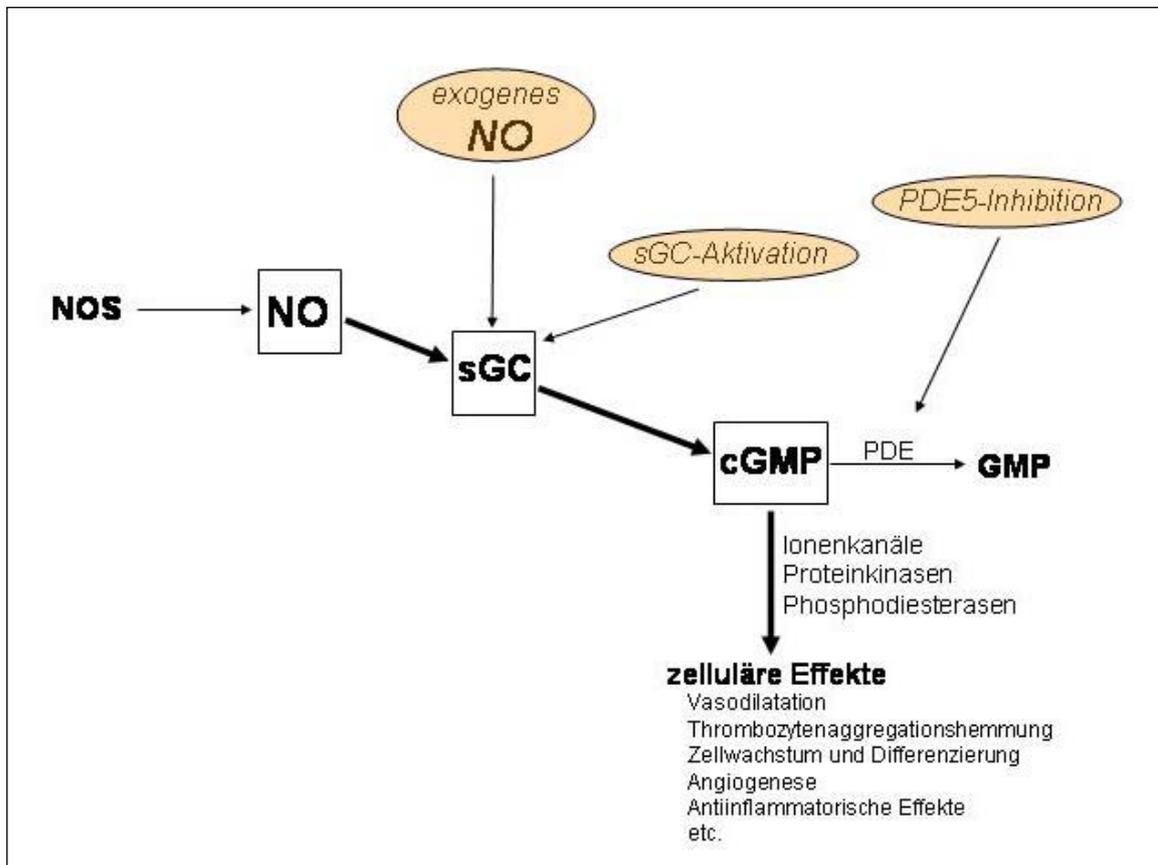


Abbildung 7: Schematische Darstellung des NO-sGC-cGMP Signaltransduktionsweges mit einigen auch für diese Arbeit entscheidenden zellulären Effekten und therapeutischen Interventionsmöglichkeiten. Die NO-Synthasen (NOS) bilden mit dem Substrat L-Arginin in NADPH-Abhängigkeit Stickstoffmonoxid, welches durch Bindung an seinen Rezeptor, die lösliche Guanylatzyklase (sGC), aus intrazellulärem Guanosintriphosphat (GTP) das second messenger Signalmolekül zyklisches Guanosin-3'-5'-monophosphat (cGMP) generiert. Über verschiedene cGMP-abhängige Effektorsysteme (Ionenkanäle, Proteinkinasen, Phosphodiesterasen) werden die zellulären und physiologischen Effekte vermittelt. Der zytosolische cGMP-Spiegel wird durch die Spaltung von cGMP durch Phosphodiesterasen (PDE) zum Guanosinmonophosphat (GMP) gesenkt. Mögliche pharmakologische Targets sind neben der exogenen NO-Substitution, eine Aktivierung der sGC, sowie die Inhibition der Phosphodiesterasen (PDE).

1.5 Diethylenetetraamine-NONOate (Deta-NONOate)

Bei Diethylenetetraamine-NONOate (Deta-NONOate) handelt es sich um einen NO-Donator aus der Substanzklasse der NONOates. Die Gruppe der NONOates sind synthetisch hergestellte Addukte aus Stickstoffmonoxid und einem nukleophilen Rückgrat, welche spontan und ohne enzymatisch vermittelte Prozesse eine abschätzbare Menge an NO nach Kinetik erster Ordnung freisetzen.¹⁰⁵ Mittlerweile ist eine große Zahl an unterschiedlichen Substanzen kommerziell erhältlich, die vor allem durch ihre verschiedenen Halbwertszeiten und die daraus resultierende NO-Freisetzungsrates charakterisiert sind. Dabei hängen die Eigenschaften der NO-Liberation der unterschiedlichen Verbindungen von der Struktur des nukleophilen Rückgrats, dem pH-Wert und der Temperatur ab. Pro Mol der NONOate-Substanz werden theoretisch etwa zwei Mol NO freigesetzt, unter physiologischen pH-Verhältnissen wird eine etwas geringere Rate angenommen.⁷¹

Für die Versuche in der vorliegenden Dissertation wurde die Substanz Deta-NONOate gewählt, da sie von allen kommerziell erhältlichen NONOates die längste Halbwertszeit besitzt. Diese liegt bei 22°C und 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) im Bereich von 56h, bei physiologischen Bedingungen von 37°C verkürzt sich diese auf etwa 20h.¹¹³ Abbildung 8 zeigt die chemische Strukturformel von Diethylenetetraamine-NONOate (Deta-NONOate).

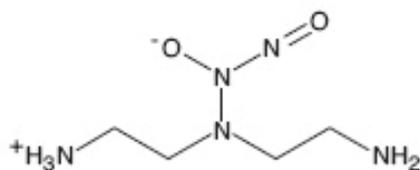


Abbildung 8: Chemische Strukturformel von Diethylenetetraamine-NONOate (Deta-NONOate)

1.6 Sildenafil

Bei Sildenafil (Viagra[®]) handelt es sich um einen cGMP-spezifischen PDE5-Inhibitor. Das ursprünglich als Therapeutikum für kardiovaskuläre Erkrankungen, vor allem der Angina pectoris im Rahmen der koronaren Herzkrankheit entwickelte Sildenafil, wurde aber aufgrund seiner relativ kurzen Halbwertszeit für diese Indikation zu Beginn der 90er Jahre weitestgehend

verworfen. Seit Ende der 90er Jahre findet die Substanz mit großem Erfolg weitreichenden Einsatz in der Therapie der erektilen Dysfunktion. Dabei ist die Wirkung durch die Verstärkung der NO-sGC-cGMP vermittelten Relaxation der glatten Muskelzellen der Corpora cavernosa und dem damit verbesserten Bluteinstrom begründet. Seit wenigen Jahren wird Sildenafil außerdem erfolgreich in der Therapie der pulmonalen Hypertension eingesetzt. Aufgrund der starken Expression der PDE5 im Lungengewebe steht mit Sildenafil ein hoch potentes Pharmakon in der Behandlung pulmonalvaskulärer Erkrankungen zu Verfügung.⁸¹ Für weiterführende Informationen zu Sildenafil sei hiermit auf die hier zitierte hervorragende Übersichtsarbeit von Ghofrani et al. verwiesen. In Abbildung 9 ist die chemische Strukturformel von Sildenafil abgebildet.

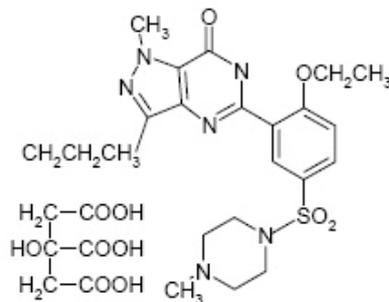


Abbildung 9: Chemische Strukturformel des PDE5-Inhibitors Sildenafil (Viagra®)

1.7 HMR-1766

Bei der Substanz HMR-1766 handelt es sich um einen NO-unabhängigen Aktivator der löslichen Guanylatzyklase (sGC) aus der Obergruppe der NO-unabhängigen Stimulatoren und Aktivatoren der sGC. Die sGC weist eine Häm-Bindungsdomäne auf, welche in Kombination mit ihrem Häm-Gerüst mit Eisen als Zentralatom als NO-Rezeptor fungiert. Dieser NO-Sensor wird für die NO-abhängige Aktivierung des Enzyms verantwortlich gemacht. Die noch sehr neue Gruppe der Häm-unabhängigen Aktivatoren der sGC ist in der Lage das Enzym auf einem neuen und bisher nicht vollständig verstandenen Weg zu aktivieren, als über den zuvor beschriebenen NO-Sensor. In ihrer Grundlagenarbeit konnten Schindler et al. zeigen, dass HMR-1766 eine Substanz mit diesen Charakteristika darstellt. Dabei scheint HMR-1766 in der Lage zu sein, sowohl die Häm-oxidierte sGC, als auch die Häm-defiziente Enzymform aktivieren zu können.¹⁸⁴

Für tiefere Informationen zu dieser Substanz und zur Klasse der NO-unabhängigen sGC Aktivatoren und Stimulatoren sei auch auf die hervorragende Übersichtsarbeit von Evgenov et al. verwiesen.⁷⁰ Abbildung 10 zeigt die chemische Strukturformel von HMR-1766.

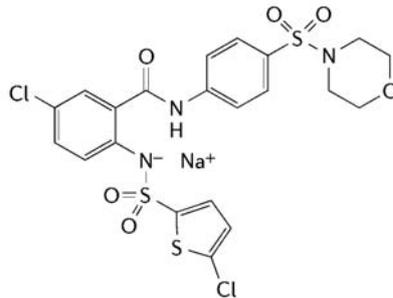


Abbildung 10: Chemische Strukturformel des NO- und Häm-unabhängigen Aktivators der löslichen Guanylatzyklase (sGC) HMR-1766, modifiziert aus Schindler et al. 2006¹⁸⁴

1.8 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte der Einfluss von NO und von sGC-cGMP-Achsen stimulierenden Pharmaka auf verschiedene Parameter der durch chronische Hyperoxie induzierten postnatalen Lungenschädigung an der neonatalen Maus evaluiert werden. Das Ziel war es hierdurch mögliche neue Erkenntnisse über die nach wie vor unklare Bedeutung der NO-Achse für die Entstehung der bronchopulmonalen Dysplasie (BPD) zu gewinnen und mögliche therapeutische Ansätze auf Ihre Wirksamkeit hin zu überprüfen.

In einem ersten Schritt wurde dazu ein stabiles Modell der Hyperoxie-induzierten postnatalen Lungenreifungsstörung etabliert und der Einfluss der prolongierten neonatalen Hyperoxie auf das körperliche Gedeihen und die Sterblichkeit hin überprüft, sowie die histopathologischen pulmonalen Veränderungen durch histomorphometrische Analyse des Fibrosierungs- und Alveolarisierungsgrades quantifiziert.

In weiteren Schritten wurde zusätzlich der Einfluss des NO-Donors *Diethylenetraamine-NONOate (Delta-NONOate)*, des Häm-unabhängigen Aktivators der löslichen Guanylatzyklase (sGC) *HMR-1766* und des Inhibitors der Phosphodiesterase 5 (PDE5) *Sildenafil* auf die oben genannten Parameter untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Alle durchgeführten Versuche wurden von der zuständigen Tierschutzkommission beim Regierungspräsidium Hessen in Gießen genehmigt (Az: GI 20/10 Nr. 41/2003).

Für die in dieser Dissertation beschriebenen Versuche wurden adulte, zeitlich angepaarte sowie neonatale Mäuse vom Typ C57Bl6/N verwendet. Die adulten trächtigen Tiere wurden von der Firma Charles River Laboratories GmbH (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Alle graviden Muttertiere wurden im embryonalen Stadium E15, entsprechend dem 15. Tag post conceptionem, geliefert und unter kontrollierten Standardbedingungen bei 27°C Raumtemperatur, 55% Luftfeuchtigkeit und einem künstlichen Tag-/Nachtrhythmus (12:12 h) in Makrolon-Käfigen Typ 3 gehalten. Pro Versuchsreihe wurden 4 trächtige Mäuse (n=4) eingesetzt. Die Tiere wurden über den gesamten Versuchszeitraum mit der Standarddiät Altromin 1324 (Altromin, Deutschland) und Wasser ad libitum versorgt. Den internationalen Richtlinien für den Umgang mit Versuchstieren wurde durchweg Folge geleistet.¹⁷⁷

Die in dieser Arbeit beschriebenen Euthanasierungen der Versuchstiere, die Präparationen und Organentnahmen, sowie die Verabreichungen der eingesetzten Medikamente wurden von Tierärztin Frau Silke Köbrich im Rahmen der Zusammenarbeit in der klinischen Forschergruppe 118 (Teilprojekt III, DFG) durchgeführt.

2.2 Verwendetes Tiermodell

Im embryonalen Stadium E17 erfolgte die Separation der Muttertiere in Einzelkäfige in Erwartung der spontanen Geburten unter ansonsten gleichen Bedingungen wie in 2.1. beschrieben. Die Geburten der einzelnen Würfe konnten regelhaft im embryonalen Stadium E19 innerhalb einer Zeitspanne von maximal zwölf Stunden zwischen frühestem und spätestem Ereignis beobachtet werden. Unmittelbar nach der zeitlich zuletzt stattgefundenen Geburt erfolgten zur Angleichung der maternalen und neonatalen Bedingungen das Pooling und die Randomisierung aller Neonaten in quantitativ balancierte Gruppen. Diese wurden jeweils einem der Muttertiere in Einzelkäfigen zugeordnet. Pro Versuchsreihe wurde eine Hälfte der Würfe mit den Muttertieren unter normoxischen Raumlufbedingungen (21% O₂)

und die andere Hälfte bei hyperoxischen Verhältnissen (85% O₂) gehalten. Zur Kontrollierbarkeit und Aufrechterhaltung der norm- sowie hyperoxischen Konditionen wurden die Tiere in ihren Käfigen in zwei 90 x 42 x 38cm messenden luftdicht versiegelten Plexiglas-kammern mit einem kontinuierlichen Frischgasfluss von 3,5l/min positioniert. Wie von Alexandre-Alcazar et al. 2006 bereits publiziert,⁸ wurden die Sauerstoffkonzentrationen (21% bzw. 85% O₂) innerhalb der Kammern, mit Hilfe eines Minimox II Systems (Catalyst Research, Owing Mills, MD) reguliert. Die Kumulation von CO₂ wurde durch den Einsatz von Absorptionskalk (Dräger Medizintechnik, Lübeck) verhindert und zusätzlich die Luftfeuchtigkeit mit einer Kondensationseinheit kontrolliert. Wie zuvor von Warner et al. 1998 beschrieben,²²² wurden die Muttertiere zur Elimination der maternalen Effekte zwischen den Würfen, in 24h Abständen zwischen den neonatalen Gruppen sowie zwischen normoxischen bzw. hyperoxischen Verhältnissen randomisiert. Zu diesem Zweck und zur eventuellen Applikation von Medikamenten, wurden die Kammern täglich für 15min geöffnet.¹⁵⁰ Durch die tägliche Randomisierung der Mütter konnte für alle Säuger ein gleiches Ernährungsangebot geschaffen werden. Zusätzlich ließ sich so zur Minimierung des toxischen Einflusses der Hyperoxie auf die adulten Tiere ein jeweils 24-stündiges „freies“ Intervall bei Raumluftbedingungen gewährleisten. Das Überleben wurde täglich protokolliert.

2.3 Versuchsdesign

In der ersten Versuchsreihe (Versuch 1) wurde der erwartete pathologische Effekt der neonatalen Hyperoxie (85% O₂) auf die postnatale Lungenreifung und das körperliche Gedeihen der Versuchstiere im Vergleich zur physiologischen Entwicklung unter Raumluftbedingungen untersucht. In den weiteren hier beschriebenen Untersuchungen wurde überprüft, ob eine medikamentöse Behandlung der unter hyperoxischen Bedingungen aufwachsenden Neonaten mit den im Folgenden genannten Substanzen einen messbaren Effekt auf die Hyperoxie-induzierte Lungenschädigung bewirkt. Hierzu wurden der NO-Donor *Diethylenetetraamine-NONOate* (Versuch 2), der selektive PDE5-Inhibitor *Sildenafil* (Versuche 3 und 4) sowie der Häm-unabhängige Aktivator der löslichen Guanylatzyklase (sGC) *HMR-1766* (Versuch 5) eingesetzt.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Entnahmen der Neonaten zur Organpräparation erfolgten in den postnatalen Stadien P7, P14, P21 und P28, sodass die Versuchstiere ein

Lebensalter zwischen minimal einer und maximal vier Wochen erreichten. Das Körpergewicht wurde bei allen Versuchsreihen jeweils an P7, P14, P21 und P28 bestimmt. Die Tötung von Versuchstieren zur Organentnahme geschah in Abhängigkeit von der jeweiligen Untersuchung entweder an P7, P14, P21 und P28 (Versuch 1) oder ausschließlich an P28 (Versuche 2, 3, 4 und 5). Die Zielvariablen der lungenhistomorphometrischen Auswertung waren die mittlere interalveoläre Distanz (L_m [μm]), die mittlere Septendicke (S_t [μm]) und der mittlere prozentuale Luftanteil (A_{pc} [%]).

2.3.1. Versuch 1: *Einfluss der chronischen neonatalen Hyperoxie (85% O_2) auf die postnatale Lungenreifung und das körperliche Gedeihen*

Für diese grundlegende Fragestellung wurde das Tiermodell wie in 2.2 beschrieben verwendet. Die Neonaten wurden binnen 12h postnatal in zwei Gruppen randomisiert: Gruppe A (Normoxie; $FiO_2=0,21$; $n=27$) und Gruppe B (Hyperoxie; $FiO_2=0,85$; $n=24$).

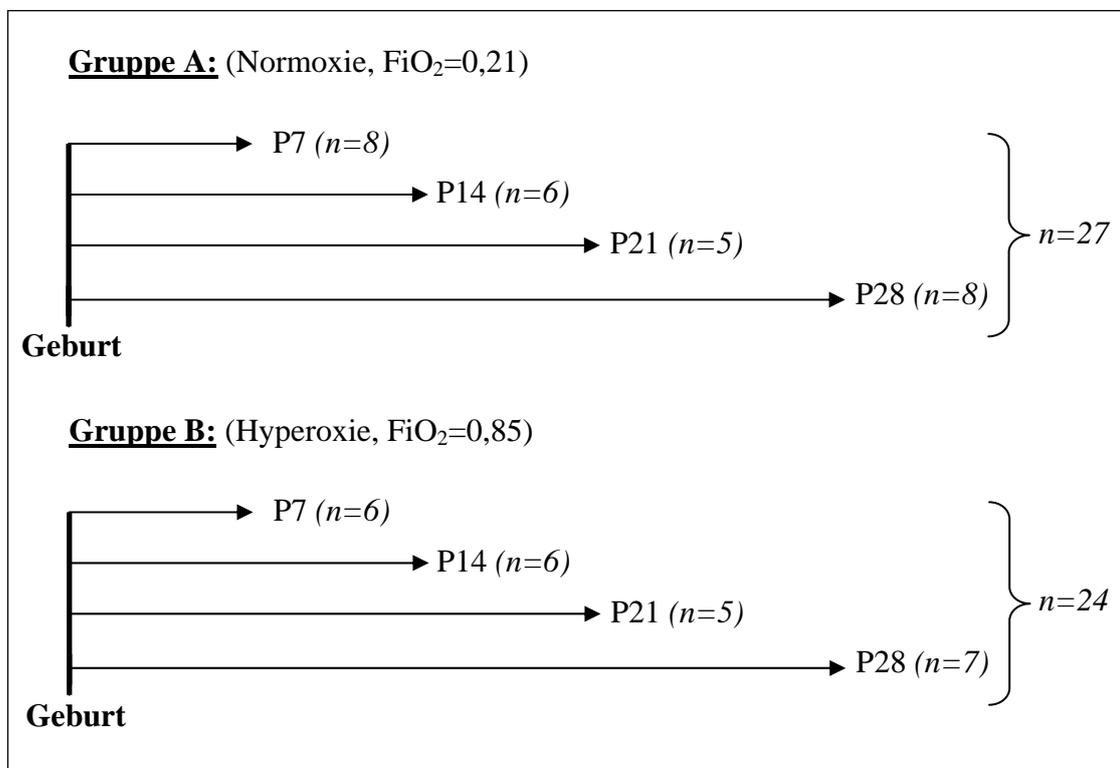


Abbildung 2.1: Schematische Übersicht des Ablaufs von Versuch 1, oben im Bild Darstellung der Organentnahmen von Gruppe A (Normoxie, $FiO_2=0,21$, $n=27$) und unten im Bild von Gruppe B (Hyperoxie, $FiO_2=0,85$; $n=24$)

2.3.2 Versuch 2: Einfluss des NO-Donors Diethylenetetraamine-NONOate (Deta-NONOate) auf die Hyperoxie-induzierte postnatale Lungenreifungsstörung und das beeinträchtigte körperliche Gedeihen

Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurde auf Basis des Versuchsablaufs von Versuch 1 angeknüpft. Nach der postnatalen Randomisierung der Neonaten wurde eine Gruppe von unter hyperoxischen Bedingungen aufwachsenden Jungtieren gebildet, die zusätzlich einer 28-tägigen Behandlung mit Deta-NONOate zugeführt wurde: Gruppe C (Hyperoxie + Deta-NONOate; $FiO_2=0,85$; $n=6$). Als Kontrollgruppe dienten in diesem Fall die unbehandelten Jungtiere im Stadium P28 der hyperoxischen Gruppe B. Das Körpergewicht wurde wöchentlich erhoben, Organentnahmen für die Histologie und Bestimmung der morphometrischen Zielvariablen erfolgten an P28.

Die Behandlung wurde täglich via Ultraschallverneblung von 20mg Deta-NONOate (Cayman Chemical, Michigan, USA) gelöst in 2ml Phosphatpuffer (PBS; 0,1 M; pH 8,5) durchgeführt. Zur Verneblung diente ein Areoneb[®] Professional Nebulizer System (Nektar Therapeutics, USA), mit dessen Hilfe die Testsubstanz von oben in einen angewärmten Erlmeyerglaskolben mit einem Volumen von 1L vernebelt wurde. Der Vernebelungsvorgang der 2ml an Testsubstanz beanspruchte 5min, danach wurden die Versuchstiere für weitere 10min im Erlmeyerkolben belassen.

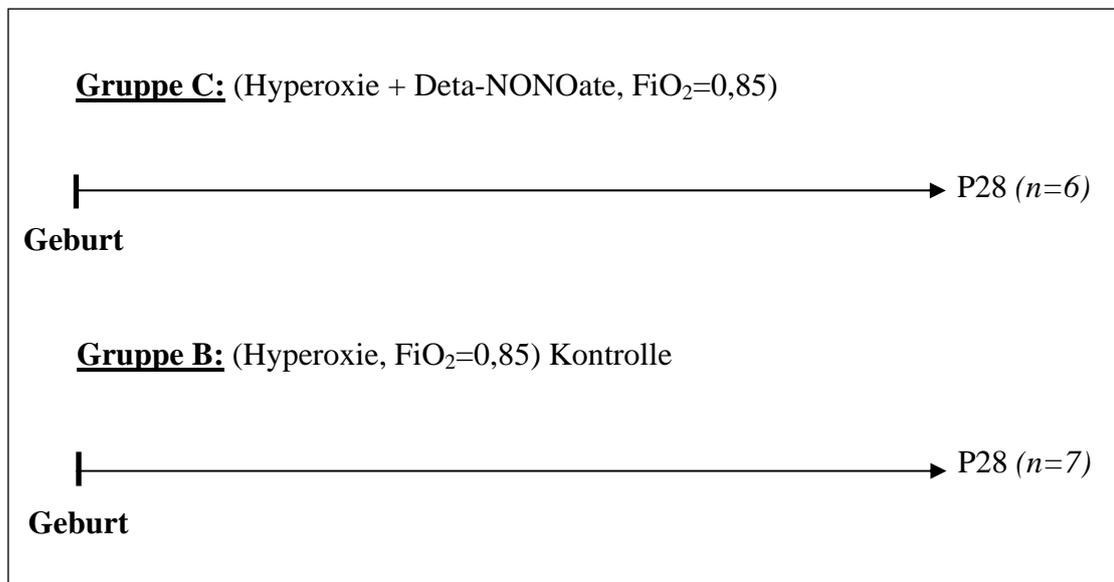


Abbildung 2.2: Schematische Übersicht des Ablaufs von Versuch 2, oben im Bild Darstellung der Organentnahmen von Gruppe C (Hyperoxie + Deta-NONOate, $FiO_2=0,85$, $n=6$) und unten von Kontrollgruppe B (Hyperoxie, $FiO_2=0,85$; $n=7$)

2.3.3 Versuch 3: Einfluss von niedrig dosiertem Sildenafil (5mg/kg KG) auf die Hyperoxie-induzierte postnatale Lungenreifungsstörung und das beeinträchtigte körperliche Gedeihen

Der Ablauf dieses Versuches war wie bei Versuch 2, nur dass eine randomisierte Gruppe unter hyperoxischen Bedingungen nicht mit Deta-NONOate sondern mit 5mg/kg KG Sildenafil (Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe) für 28 Tage behandelt wurde: Gruppe D (Hyperoxie + Sildenafil (5mg/kg KG; $FiO_2=0,85$, $n=5$)). Als Kontrollgruppe dienten die unbehandelten Jungtiere im Stadium P28 der hyperoxischen Gruppe B. Das Körpergewicht wurde wöchentlich erhoben, Organentnahmen für die Histologie und Bestimmung der morphometrischen Zielvariablen erfolgten an P28. Die Applikation der Testsubstanz erfolgte täglich durch subkutane Injektion der gewichtsadaptierten Menge gelöst in NaCl 0,9%. Zur Errechnung der erforderlichen Dosis wurde täglich vor der Injektion das Körpergewicht der jeweiligen Versuchstiere ermittelt.

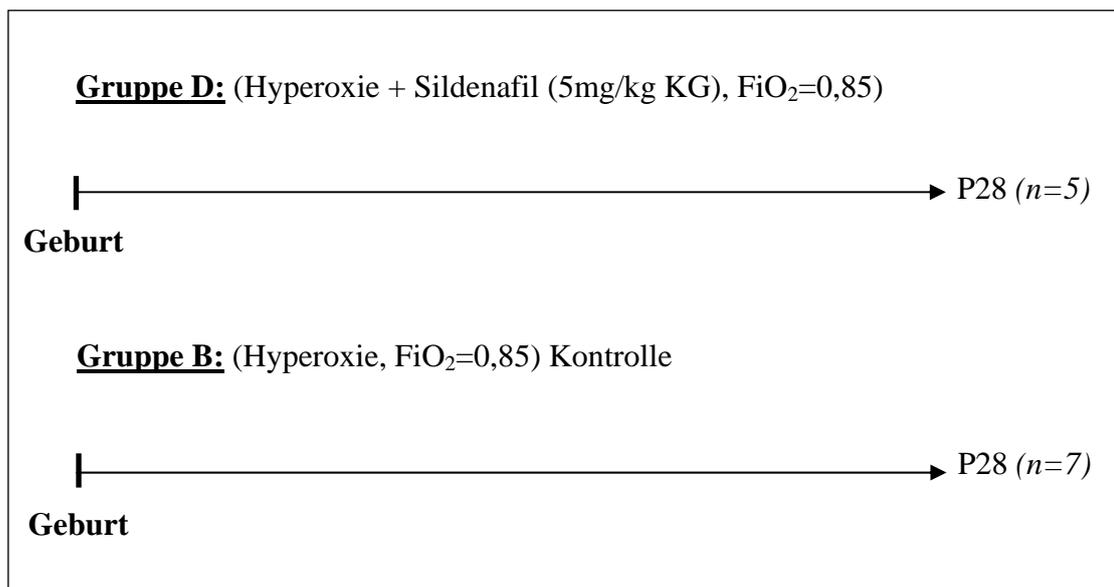


Abbildung 2.3: Schematische Übersicht des Ablaufs von Versuch 3, oben im Bild Darstellung der Organentnahmen von Gruppe D (Hyperoxie + Sildenafil (5mg/kg KG), $FiO_2=0,85$, $n=5$) und unten von Kontrollgruppe B (Hyperoxie, $FiO_2=0,85$; $n=7$)

2.3.4 Versuch 4: *Einfluss von hoch dosiertem Sildenafil (20mg/kg KG) auf die Hyperoxie-induzierte postnatale Lungenreifungsstörung und das beeinträchtigte körperliche Gedeihen*

Der Ablauf war identisch mit Versuch 3, der zu untersuchenden Gruppe wurde jedoch Sildenafil in einer Dosierung von 20mg/kg KG verabreicht: Gruppe E (Hyperoxie + Sildenafil (20mg/kg KG; $FiO_2=0,85$, $n=5$). Als Kontrollgruppe diente ebenfalls die unbehandelte hyperoxische Gruppe B.

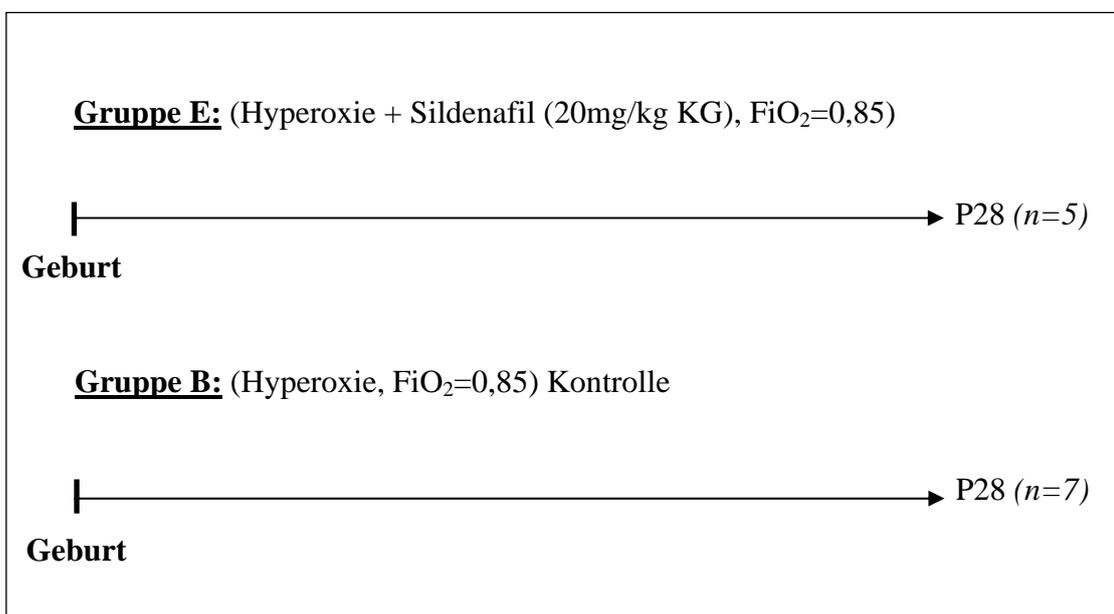


Abbildung 2.4: Schematische Übersicht des Ablaufs von Versuch 4, oben im Bild Darstellung der Organentnahmen von Gruppe E (Hyperoxie + Sildenafil (20mg/kg KG), $FiO_2=0,85$, $n=5$) und unten von Kontrollgruppe B (Hyperoxie, $FiO_2=0,85$; $n=7$)

2.3.5 Versuch 5: *Einfluss des sGC-Aktivatoren HMR-1766 auf die Hyperoxie-induzierte postnatale Lungenreifungsstörung und das beeinträchtigte körperliche Gedeihen*

Der Versuchsablauf wurde wie bei den Versuchen 3 und 4 durchgeführt, der zu untersuchenden Gruppe wurde jedoch täglich 30mg/kg KG des Häm-unabhängigen sGC-Aktivatoren HMR-1766 (Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt) über 28 Tage verabreicht: Gruppe F (Hyperoxie + HMR-1766, $FiO_2=0,85$, $n=4$). Die Applikation der Testsubstanz erfolgte täglich durch subkutane Injektion der gewichtsadaptierten Menge gelöst

in Polyethylenglykol (PEG). Zur Errechnung der erforderlichen Dosis wurde täglich vor der Injektion das Körpergewicht der einzelnen Jungtiere ermittelt. Als Kontrolle diente eine zusätzliche randomisierte Gruppe unter hyperoxischen Bedingungen, der täglich die gleiche Menge des benutzten Lösungsmittels für die Testsubstanz HMR-1766 (30mg/kg KG) wie bei Gruppe F verabreicht wurde: Gruppe G (Hyperoxie + PEG, $FiO_2=0,85$, $n=3$).

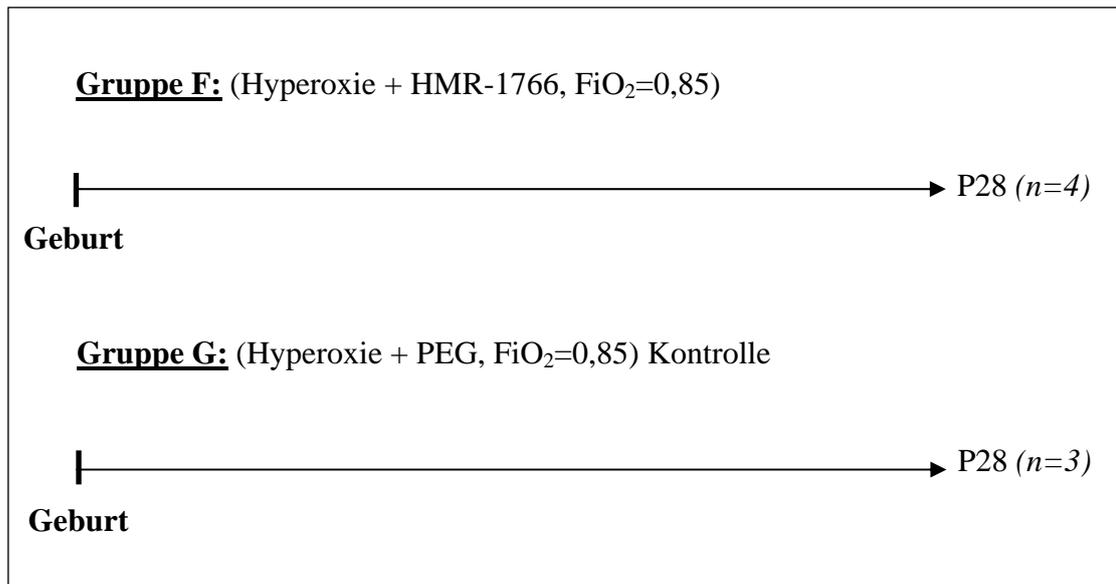


Abbildung 2.5: Schematische Übersicht des Ablaufs von Versuch 5, oben im Bild Darstellung der Organentnahmen von Gruppe F (Hyperoxie + HMR-1766, $FiO_2=0,85$, $n=4$) und unten von Kontrollgruppe G (Hyperoxie + Polyethylenglykol [PEG], $FiO_2=0,85$; $n=3$).

2.4 Präparation, Organentnahme und Fixierung

Zur Präparation und Organentnahme wurden die Tiere durch die intraperitoneale Injektion von 50mg Pentobarbital-Natrium (Narcofen®, Merial, Deutschland) pro kg Körpergewicht getötet. Nach vorsichtiger medianer Sternotomie mit medianer Laparotomie, erfolgte die Transektion der Aorta thoracalis und damit die Exsanguination der Versuchstiere. Nach Präparation der Trachea wurde eine mediane Tracheotomie zur anschließenden Intubation mit einem 24-Gauge Teflon-Katheter (B. Braun AG, Melsungen, Deutschland) durchgeführt. Zur Fixierung des Gewebes wurden die Lungen in situ durch den platzierten Katheter mit 4%iger Phosphat-gepufferter Paraformaldehydlösung (PBS; 20mM Tris-Cl, 137mM NaCl, pH 7,4) bei 20cm Wassersäule, gemessen ab der Trachealbifurkation, für 5min transtracheal gebläht. Durch vorsichtiges Absetzen der Vv. cavae sup. et. inf. und nach Durchtrennung der Trachea im kranialen Abschnitt wurde das Herz-und Lungenpräparat freipräpariert und anschließend entnommen. Nach der en bloc Resektion des Herz-Lungen-Konvolutes wurde das Präparat für weitere 24h in 4%iger Paraformaldehydlösung (pH 7,4) nachfixiert.

2.5 Herstellung der Schnittpräparate für die Morphometrie

2.5.1 Gewebeentwässerung und Paraffineinbettung

Nach Blähung der Lungen und 24-stündiger Nachfixierung des Gewebes durch Vollständiges druckfreies Untertauchen in 4%ige Paraformaldehydlösung (pH 7,4), wurden die Präparate in Phosphatpuffer (PBS, pH 7,4) überführt und mit Hilfe eines Automaten (Leica-ASP200S, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Deutschland) durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und paraffiniert. Zum Einbetten in Blöcke stand ein Paraffineinbettgerät (Leica-EG1140H) mit Kühlplatte (Leica-EG 1150C, beide Leica Microsystems Nussloch GmbH) zur Verfügung. Bei der Fixierung des Lungengewebes wurde bewusst die en bloc Variante gewählt. Aufgrund der extrem geringen Größe der neonatalen Organe wäre durch die notwendige schwierige Präparation der sehr kleinen Organe bei einer Fixierung der Lungenlappen im Einzelnen, die Traumatisierung des Gewebes kaum vermeidbar gewesen. Da für die Vergleichbarkeit der in der Morphometrie erhobenen Daten ein möglichst

optimaler Erhalt der Organe angestrebt werden muss, entschieden wir uns für die Fixierung der gesamten Organe in toto.

2.5.2 Anfertigung der Schnittpräparate

Die Herz-Lungen-Konvolute wurden in derartiger Weise in die Paraffinblöcke eingegossen, dass bei der Anfertigung der Schnittpräparate am Mikrotom transversale Schnitte auf Höhe des kaudalen Lungendrittels angefertigt werden konnten. So wurden regelhaft großflächige Anschnitte beider Unterlappen und des Herzlappens im gesamten Querschnitt erreicht. Das Herstellen der Schnittpräparate erfolgte am Rotationsmikrotom Leica-RM 2165 (Leica Microsystems Nussloch GmbH, Deutschland) in einer Stärke von 3µm. Mit Hilfe des Wasserbades Leica HI-1210 und der Wärmeplatte Leica HI-1220 (beide Leica Microsystems Nussloch GmbH) wurden die Paraffinschnitte auf Objektträger (SuperFrost®Plus, Gerhard Menzel, Braunschweig) aufgezogen.

2.5.3 Hämatoxilin-Eosin (H&E)-Färbung

Die Entparaffinierung der Präparate erfolgte durch Inkubation mit einer Rotihistol-Reihe für 3 x 5min (Roti®-Histol, Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe), danach wurde eine absteigende Alkoholreihe (100%, 99,6%, 96%, 70%) mit jeweils 5-minütiger Verweildauer der Präparate angeschlossen. Nach gründlichem Spülen in Aqua dest. wurden die Schnitte 20min mit frischem sauren Hämalaun nach Mayer (Waldeck GmbH & Co. KG, Münster) inkubiert, danach 5-minütiges Spülen mit fließendem Wasser. Nun Inkubation mit frischem alkoholischem Eosin Y (Thermo Shandon, PA, USA) für 4min und im Anschluss erneutes Spülen mit Aqua dest. und Dehydratation der Präparate mit einer ansteigenden Alkoholreihe (96%, 96%, 99,6%, 99,8%) für 3min pro Lösung. Das Eindecken der Präparate erfolgte nach Vorbereitung durch 5-minütige Bäder in Roti®-Histol und Xylol (Merck KG, Darmstadt), mit dem Medium Pertex® (medite GmbH, Burgdorf) und üblichen Deckgläsern (Gerhard Menzel, Braunschweig).

2.6 Histomorphometrische Analyse

Die histomorphometrische Analyse der Präparate diente der Objektivierung und Quantifizierung der histologisch zu beobachtenden Lungenveränderungen. Die Messungen wurden mit einer semi-automatischen, computer-assistierten Methode durchgeführt. Zu diesem Zweck stand ein Labormikroskop Leica DM LA (Leica Microsystems GmbH, Bensheim) mit Trockenobjektiven in 5-, 10-, 20- und 40-facher Vergrößerung sowie einem Ölimmersionsobjektiv in 100-facher Vergrößerung zur Verfügung. An das Mikroskop war eine hochauflösende LEICA DC 300f Color Video Kameraeinrichtung (Leica Microsystems GmbH, Bensheim) angeschlossen und verfügte zusätzlich über einen Präzisions-Motortisch, der volle manuelle als auch Software-gesteuerte Kontrolle über die Position des Präparates ermöglichte. Das System wurde an einem Personal Computer installiert, sodass Aufnahmen mit folgender Software erzeugt und morphometrisch analysiert werden konnten: Leica QWin (Leica Microsystems GmbH, Bensheim). Die Kalibration des Systems erfolgte durch die Firma Leica, sodass für jedes Objektiv eine definierte Anzahl an Pixel einem μm entsprach. Mit Hilfe dieses Systems war es möglich beliebige Strecken und Flächen von Strukturen in Gewebeproben exakt zu vermessen.



Abbildung 2.6: Morphometrie-Arbeitsplatz mit automatisiertem Labormikroskop DM LA (mit freundlicher Genehmigung von Leica Microsystems GmbH Wetzlar, Deutschland)

Die Zielvariablen der Analyse waren die mittlere interalveoläre Distanz (mean linear intercept, L_m [μm]), die mittlere Septendicke (mean septal thickness, S_t [μm]) und der mittlere prozentuale Luftanteil (mean air-percentage A_{pc} [%]). Erhöhte mittlere interalveoläre Distanzen wurden als Hinweis für eine alveoläre Simplifizierung gewertet²¹⁴, dabei korreliert der L_m umgekehrt proportional mit der inneren Lungenoberfläche.^{132;206} Alle Präparate wurden codiert und in geblindeter Weise vom Untersucher analysiert. Zuerst erfolgte das vollständige Abscannen des Schnittes mit dem 5-fach Objektiv mit anschließender Zufallsauswahl von $870 \times 690\mu\text{m}$ messenden, sich nicht überlappenden Analysefeldern durch die Software, die meanderförmig angesteuert und mit dem 10-fach Objektiv für die Analyse abfotografiert wurden. Die Anzahl der Analysefelder pro Präparat variierte aufgrund der erheblichen altersbedingten Organgrößendifferenzen und der Zufallsauswahl zwischen minimal 19 und 37 (Median=29) im Stadium P7 und maximal 41 und 49 (Median=45) an P28. Pro Versuchstier wurde ein transversaler Lungenschnitt analysiert. Abbildung 2.7 zeigt eine exemplarische Darstellung eines Präparates mit den beschriebenen Analysefeldern.

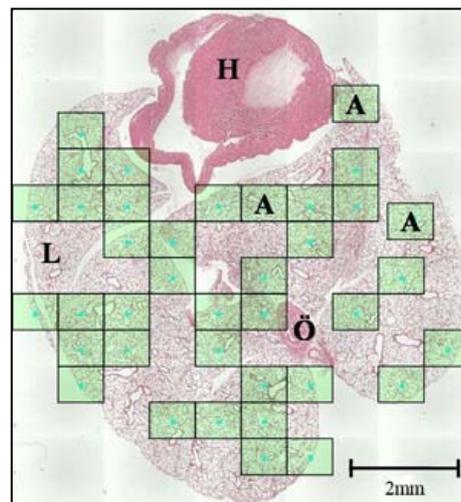


Abbildung 2.7: Exemplarische Darstellung eines transversalen Schnittpräparates mit in grün eingezeichneten sich nicht überlappenden Analysefeldern ($870 \times 690\mu\text{m}$). H=Herz, L=Lunge, Ö=Ösophagus, A=Analysefelder

Zur Vermessung der einzelnen Gesichtsfelder wurde ein Binärbild zur Differenzierung von Gewebestrukturen und der „Luft“ entsprechenden Arealen erzeugt. Durch den manuellen Ausschluss aller unerwünschten Aspekte, wie angrenzende nicht pulmonale Strukturen sowie Artefakte, Gefäße und Bronchien ($>50\mu\text{m}$ im Durchmesser), erfolgte die Detektion des Analysebereichs.

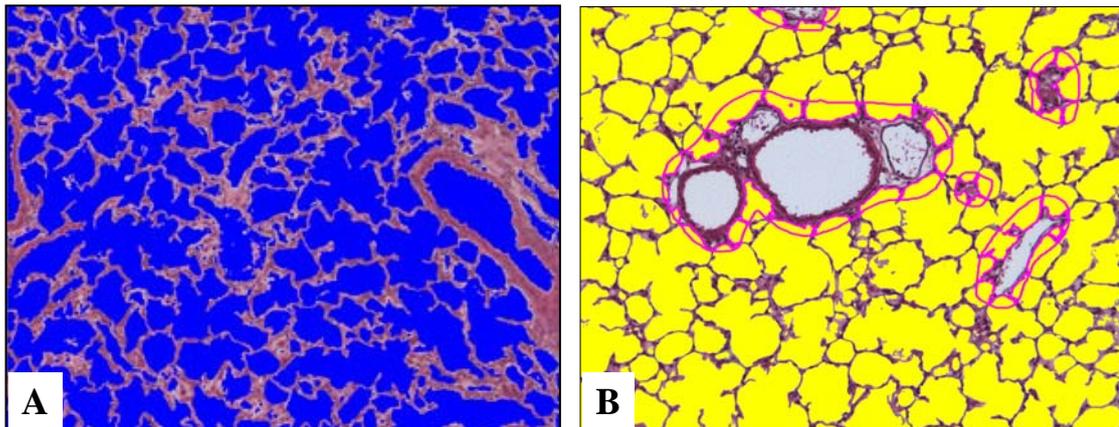


Abbildung 2.8: Exemplarische Darstellung eines Binärbildes (A), mit dem blau hinterlegten detektierten Luftanteil und ein Beispiel des manuellen Ausschlusses nicht in die Messung eingehender Strukturen (B), dabei geht nur die gelb hinterlegte Fläche in die Analyse mit ein.

Die erhobenen Messdaten der einzelnen Analysefelder wurden nach Excel[®] (Microsoft, USA) exportiert und von den Daten aller Felder pro Versuchstier der Mittelwert bestimmt. Bei allen durchgeführten Messungen lag der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) konstant unter den angestrebten 2,5% des Mittelwertes.²⁰⁵ Abbildung 2.8 zeigt exemplarisch die Darstellung eines Binärbildes und den manuellen Ausschluss von nicht in die Messung eingehenden Strukturen.

2.7 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden als Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (Mittelwert \pm SEM) angegeben. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels Students t-Test für zwei unverbundene Stichproben. Das 95% Konfidenzintervall ($p < 0,05$) wurde als statistisch signifikant erachtet. Der Gruppenvergleich von mehr als zwei Gruppen erfolgte mittels Varianzanalyse (one way ANOVA). Ergab sich ein signifikanter Unterschied wurde der interindividuelle Gruppenvergleich mit dem post hoc Neuman-Keuls Test analysiert. Auch hier wurde ein $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Versuch 1: *Einfluss der chronischen neonatalen Hyperoxie (85% O₂) auf die postnatale Lungenreifung und das körperliche Gedeihen*

In diesem Versuch wurde zunächst ein stabiles Modell der prolongierten neonatalen Hyperoxie (FiO₂=0,85) etabliert. Dazu wurde, wie in „Material und Methoden“ ausführlich beschrieben, methodisch vorgegangen und die Sterblichkeit, die Gewichtsentwicklung und die Lungenhistologie untersucht, sowie die histopathologische Quantifizierung mittels Histomorphometrie durchgeführt.

In dieser Versuchsreihe konnte sowohl für Gruppe A (Normoxie; FiO₂=0,21; n=27), als auch für Gruppe B (Hyperoxie; FiO₂=0,85; n=24) keine Sterblichkeit festgestellt werden. In Bezug auf die Gewichtsentwicklung ergaben sich über den zeitlichen Beobachtungszeitraum von vier Wochen folgende Durchschnittswerte für Gruppe A (Normoxie; FiO₂=0,21): 3,6g im postnatalen Stadium P7 (n=27), 7,0g an P14 (n=19), 9,2g an P21 (n=13) und 14,4g an P28 (n=8). Im Vergleich dazu zeigten sich im gleichen Zeitraum bei den Tieren der Gruppe B (Hyperoxie; FiO₂=0,85) die Durchschnittswerte wie folgt: 3,3g im postnatalen Stadium P7 (n=24), 6,1g an P14 (n=18), 6,8g an P21 (n=12) und 11,3g an P28 (n=7). In beiden Gruppen stellte sich die Gewichtsentwicklung annähernd linear dar, wobei die Gewichtsverteilung der einzelnen Mäuse sehr homogen war. Es ergab sich somit an P7 eine mittlere Gewichts Differenz von 0,3g, für P14 von 0,9g, für P21 von 2,4g, sowie im Alter von vier Wochen von 3,1g. In der statistischen Auswertung mittels Students t-Test für zwei unverbundene Stichproben stellten sich die Unterschiede zwischen der schwereren Kontrollgruppe A und der leichteren hyperoxischen Gruppe B in allen vier untersuchten Entwicklungsstadien als signifikant dar (P7: p=0,04, P14: p<0,001, P21: p<0,001, P28: p<0,001). Die Gewichtsentwicklung der beiden Gruppen ist graphisch in Abbildung 3.1 veranschaulicht.

Die Organentnahmen zur histologischen Aufbereitung erfolgten wie in 2.5 ausführlich erläutert. Die histologischen Eindrücke der Präparate von Gruppe A und Gruppe B in den postnatalen Stadien P7, P14, P21 und P28, sind in Abbildung 3.2 dargestellt.

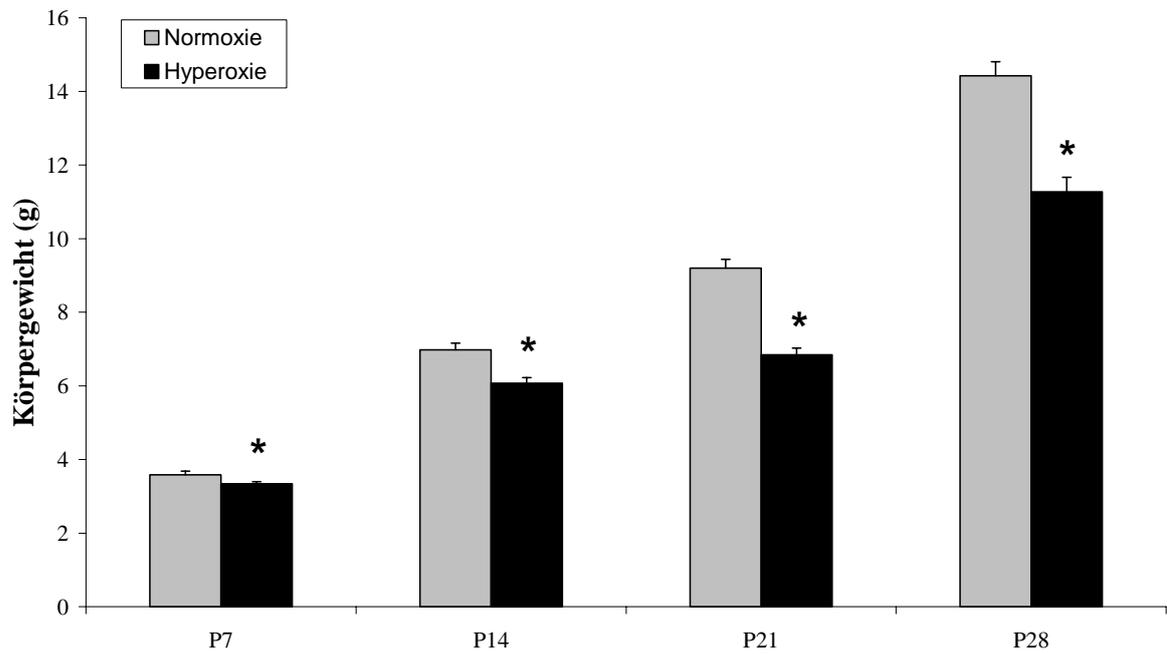


Abbildung 3.1: Gewichtsentwicklung der gesunden Tiere (Normoxie, Gruppe A) und der hyperoxischen Tiere (Hyperoxie, Gruppe B) im 28-tägigen postnatalen Beobachtungszeitraum. Dargestellt ist das mittlere Körpergewicht \pm SEM im postnatalen Alter von 7, 14, 21 und 28 Tagen (* $p < 0,05$ im Students t-Test für unverbundene Stichproben zwischen Gruppe A und Gruppe B).

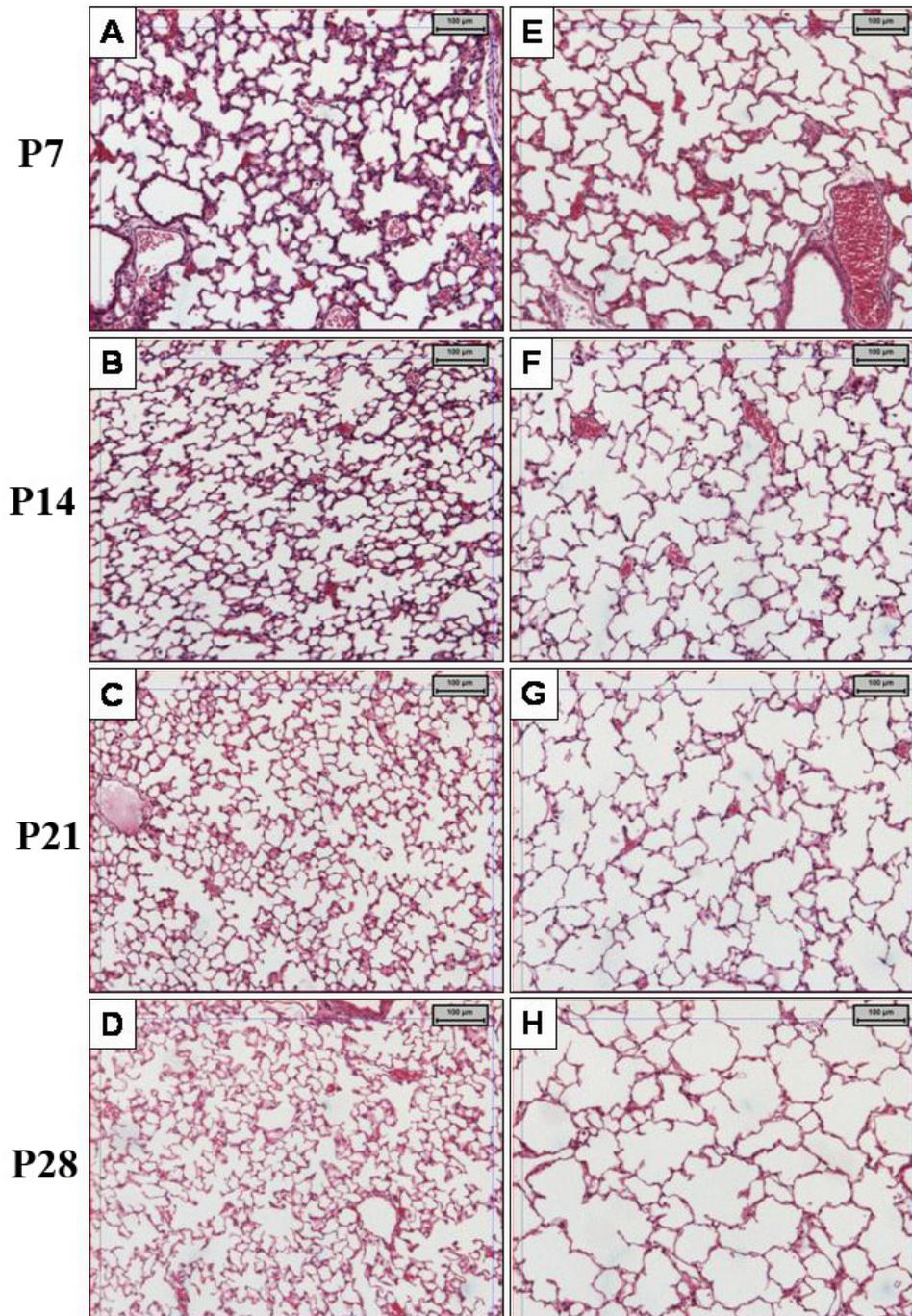


Abbildung 3.2: Dargestellt sind lungenhistologische Beispiele aus den verschiedenen Entwicklungsstadien der normoxischen Gruppe A (A-D) und der hyperoxischen Gruppe B (E-H). Dabei stammen die Präparate A und E aus dem Stadium P7, Präparate B und F aus P14, C und G aus P21 und Präparate D und H entsprechend aus dem postnatalen Stadium P28. Die Schnittstärke aller Präparate war 3µm, gefärbt wurde mit Hämatoxylin und Eosin (H&E). Der in der rechten oberen Ecke der Einzelbilder abgebildete Maßstab entspricht jeweils 100µm, alle Aufnahmen sind im Original mit dem 10-fach Trockenobjektiv angefertigt.

Die wie in 2.6 ausführlich erläuterte histomorphometrische Analyse der gewonnenen Lungenpräparate aus Gruppe A und Gruppe B ergab im Stadium P7 einen mittleren prozentualen Luftanteil (A_{pc} [%]) von 68,0% bei der normoxischen Gruppe A (n=8) im Vergleich zu 75,0% bei Gruppe B (n=6). Der Vergleich beider Gruppen im Alter von 14 Tagen ergab einen A_{pc} von 66,8% für Gruppe A (n=6) und von 76,6% bei Gruppe B (n=6). Ähnliche Ergebnisse wurden im postnatalen Alter von drei Wochen gewonnen, hier wies Gruppe A (n=5) im Durchschnitt einen mittleren prozentualen Luftanteil von 70,3% und Gruppe B von 77,2% (n=5) auf. Im Stadium P28 waren es 69,7% für Gruppe A (n=8) im Vergleich zu 76,9% bei Gruppe B (n=7). Diese Unterschiede ergaben in der statistischen Auswertung mittels Students t-Test für unverbundene Stichproben bei allen vier postnatalen Entwicklungsstadien einen signifikant höheren mittleren prozentualen Luftanteil bei Gruppe B (P7: $p=0,004$; P14: $p=0,003$; P21: $p<0,001$; P28: $p<0,001$). Die Resultate der Bestimmung des A_{pc} [%] von Gruppe A und Gruppe B sind in Abbildung 3.3 graphisch aufgetragen.

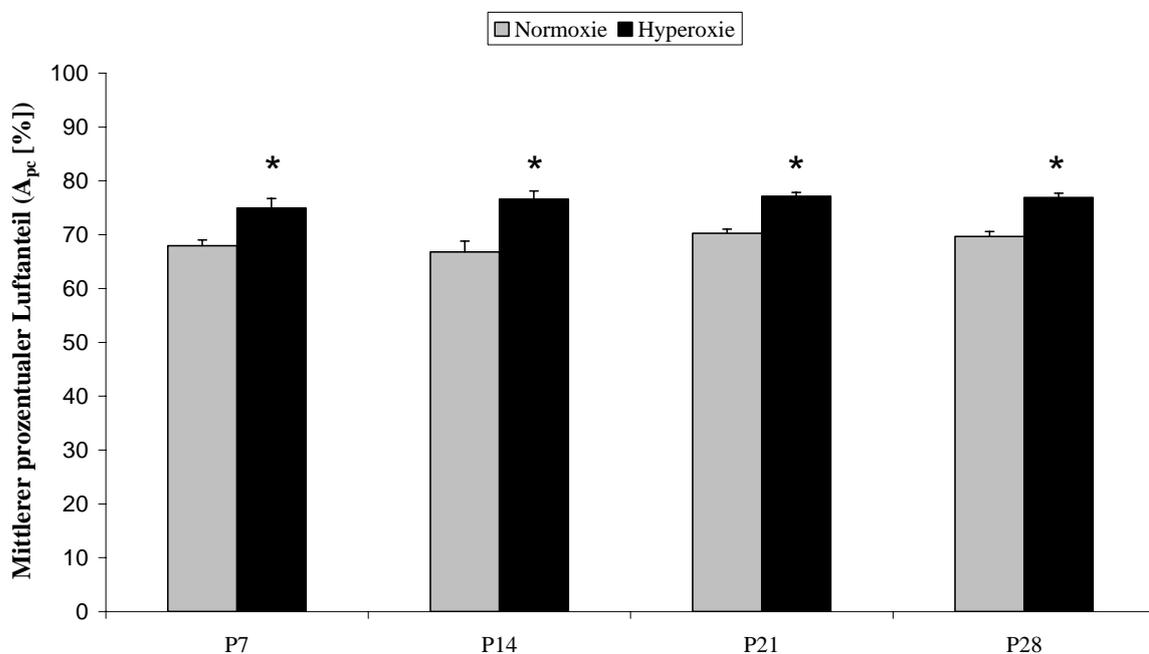


Abbildung 3.3: Mittlerer prozentualer Luftanteil (A_{pc} [%]) von Gruppe A (Normoxie) und Gruppe B (Hyperoxie) vergleichend gegenübergestellt im postnatalen Alter von 7, 14, 21 und 28 Tagen. Aufgetragen ist der A_{pc} in Prozent als Mittelwerte \pm SEM (* $p<0,05$ im Students t-Test für unverbundene Stichproben zwischen Gruppe A und Gruppe B).

Die Bestimmung der mittleren Septendicke (S_t [μm]) von Gruppe A und B ergab für die unter normoxisch gehaltene Gruppe A an P7 im Mittel $6,8\mu\text{m}$ ($n=8$), bei Gruppe B waren es $5,9\mu\text{m}$ ($n=6$). Im Stadium P14 war kein Unterschied in der Septendicke bei beiden Gruppen feststellbar (Gruppe A: $5,4\mu\text{m}$; Gruppe B: $5,4\mu\text{m}$; beide mit $n=6$). Eine Woche später (P21) wurden bei Gruppe A $4,3\mu\text{m}$ ($n=5$) im Gegensatz zu $5,3\mu\text{m}$ bei Gruppe B ($n=5$) registriert. Im postnatalen Stadium P28 zeigte sich im Mittel eine Septendicke von $4,4\mu\text{m}$ bei Gruppe A ($n=8$) im Vergleich zu $5,3\mu\text{m}$ bei Gruppe B ($n=7$). Der Unterschied zwischen beiden Gruppen an P7 erreichte mit $p=0,007$ statistischen Signifikanz, der Gruppenvergleich an P14 zeigte bei gleichen Durchschnittswerten keine statistisch signifikante Differenz ($p>0,05$). Die Unterschiede des Gruppenvergleichs an P21 ($p=0,008$) und P28 ($p<0,001$) erreichten im Students t-Test für unverbundene Stichproben jeweils ein hohes Signifikanzniveau. Die Resultate der morphometrischen Bestimmung der mittleren Septendicke von Gruppe A und B sind in Abbildung 3.4 graphisch dargestellt.

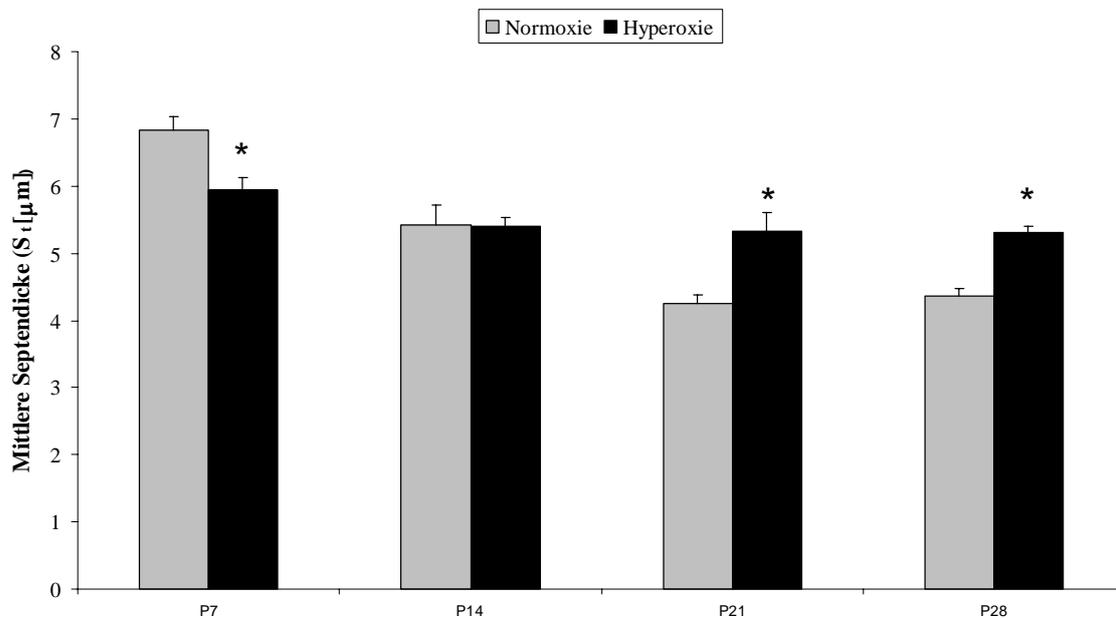


Abbildung 3.4: Mittlere Septendicke (S_t [μm]) von Gruppe A (Normoxie) und Gruppe B (Hyperoxie) vergleichend gegenübergestellt im postnatalen Alter von 7, 14, 21 und 28 Tagen. Aufgetragen ist der S_t in μm als Mittelwerte \pm SEM (* $p<0,05$ im Students t-Test für unverbundene Stichproben zwischen Gruppe A und B).

Die Messungen des mean linear intercept (L_m [μm]) im vierwöchigen postnatalen Verlauf der Gruppen A und B lieferten die folgenden Ergebnisse: Gruppe A zeigte an P7 eine mittlere interalveoläre Distanz von $28,8\mu\text{m}$ ($n=8$) im Vergleich zu $32,8\mu\text{m}$ bei Gruppe B ($n=6$). Gruppe A wies im weiteren Verlauf eine deutlich abnehmende Entwicklung des L_m auf, sodass bei der normoxischen Gruppe A an P14 noch $22,8\mu\text{m}$ gemessen wurden ($n=6$), bei Gruppe B waren es im gleichen Stadium im Durchschnitt dagegen $34,4\mu\text{m}$ ($n=6$). Noch deutlicher war der Unterschied an P21 mit $20,5\mu\text{m}$ bei Gruppe A ($n=5$) und $35,0\mu\text{m}$ bei Gruppe B ($n=5$) erkennbar. Eine Woche später (P28) kam es im Vergleich mit den Resultaten von P21 zu keinen wesentlichen Veränderungen der Messwerte mehr. Die Analyse ergab hier bei Gruppe A im Mittel $20,4\mu\text{m}$ ($n=8$) im Gegensatz zu $35,2\mu\text{m}$ bei der hyperoxischen Gruppe B ($n=7$). Die statistische Auswertung der Messwerte ergab für den Vergleich der Gruppen A und B für alle vier untersuchte Stadien (P7, P14, P21 und P28) signifikante Unterschiede (P7: $p=0,01$; P14: $p<0,001$; P21: $p<0,001$; P28: $p<0,001$). In Abbildung 3.5 sind die hier beschriebenen Resultate graphisch gegeneinander aufgetragen.

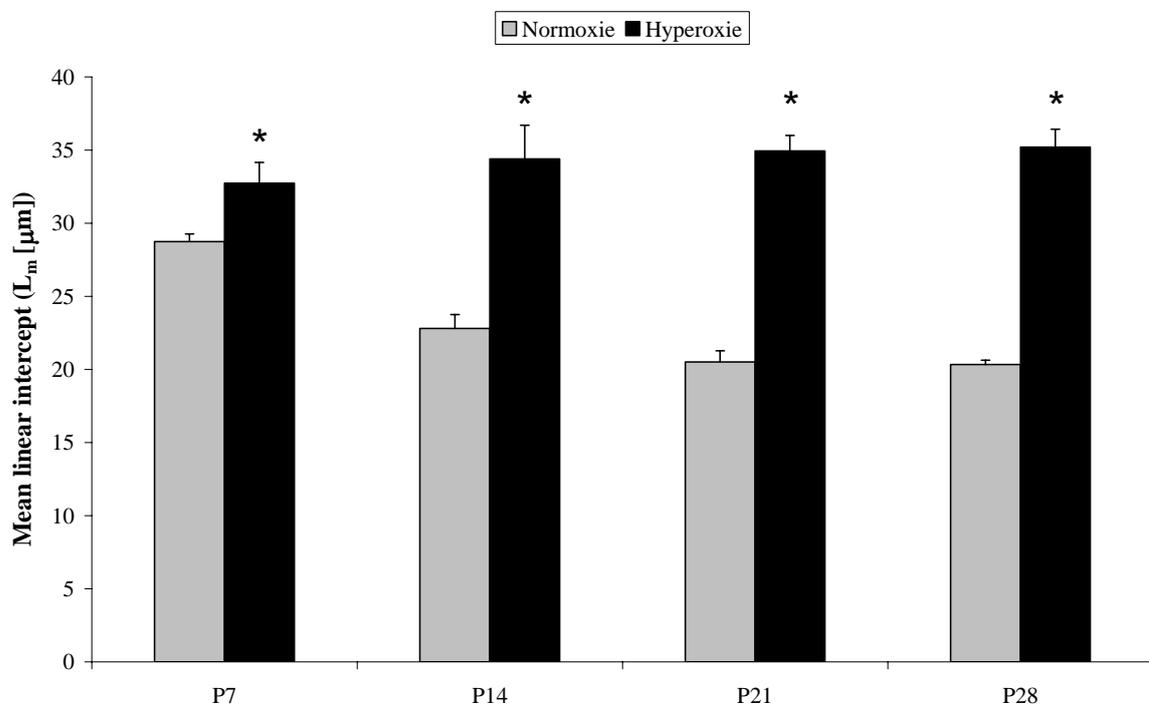


Abbildung 3.5: Mean linear intercept (L_m [μm]) von Gruppe A (Normoxie) und Gruppe B (Hyperoxie) vergleichend gegenübergestellt im postnatalen Alter von 7, 14, 21 und 28 Tagen. Aufgetragen ist der L_m in μm als Mittelwerte \pm SEM (* $p<0,05$ im Students t-Test für unverbundene Stichproben zwischen Gruppe A und B).

3.2 Versuch 2: *Einfluss des NO-Donors Diethylenetetraamine-NONOate (Deta-NONOate) auf die Hyperoxie-induzierte postnatale Lungenreifungsstörung und das beeinträchtigte körperliche Gedeihen*

In dieser zweiten Versuchsreihe wurde auf der Basis des Versuchsablaufs von Versuch 1 angeknüpft und zusätzlich wie in 2.3.2 beschrieben eine hyperoxische Gruppe über 28 Tage der täglichen Verneblung von Deta-NONOate zugeführt (Gruppe C mit $n=6$). Als Kontrollgruppe diente hier die unbehandelte hyperoxische Gruppe B ($n=7$).

In dieser Behandlungsserie konnte ebenfalls keine Sterblichkeit der in Gruppe C randomisierten Tiere festgestellt werden. In Bezug auf die Gewichtsentwicklung ergaben sich über den zeitlichen Beobachtungszeitraum von vier Wochen folgende Durchschnittswerte für Gruppe B (Hyperoxie; $FiO_2=0,85$; Kontrolle): 3,3g im postnatalen Stadium P7 ($n=24$), 6,1g an P14 ($n=18$), 6,8g an P21 ($n=12$) und 11,3g an P28 ($n=7$). Im Vergleich dazu zeigten sich im gleichen Zeitraum bei den Tieren der mit Deta-NONOate behandelten Gruppe C (Hyperoxie; $FiO_2=0,85$) die Durchschnittswerte wie folgt: 3,4g im postnatalen Stadium P7, 5,4g an P14, 6,5g an P21 und 7,8g an P28 (alle mit $n=6$). In beiden Gruppen stellte sich die Gewichtsentwicklung ebenfalls annähernd linear dar, wobei die Körpergewichte der einzelnen Mäuse sehr homogen verteilt waren. Es ergab sich somit an P7 eine mittlere Gewichts Differenz von 0,1g, für P14 von 0,7g, für P21 von 0,3g, sowie im Alter von vier Wochen von 3,5g. In der statistischen Auswertung mittels Students t-Test für zwei unverbundene Stichproben stellten sich die Unterschiede zwischen Gruppe B und C nach 14 und 28 Tagen als statistisch signifikant dar, die Unterschiede an P7 und P21 erreichten keine signifikanten Ausmaße (P7: $p=0,77$; P14: $p=0,02$; P21: $p=0,26$; P28: $p<0,001$). Die Gewichtsentwicklung der beiden Gruppen ist graphisch in Abbildung 3.6 veranschaulicht. Histologische exemplarische Schnittpräparate von Gruppe B und C sind in Abbildung 3.7 zu erkennen.

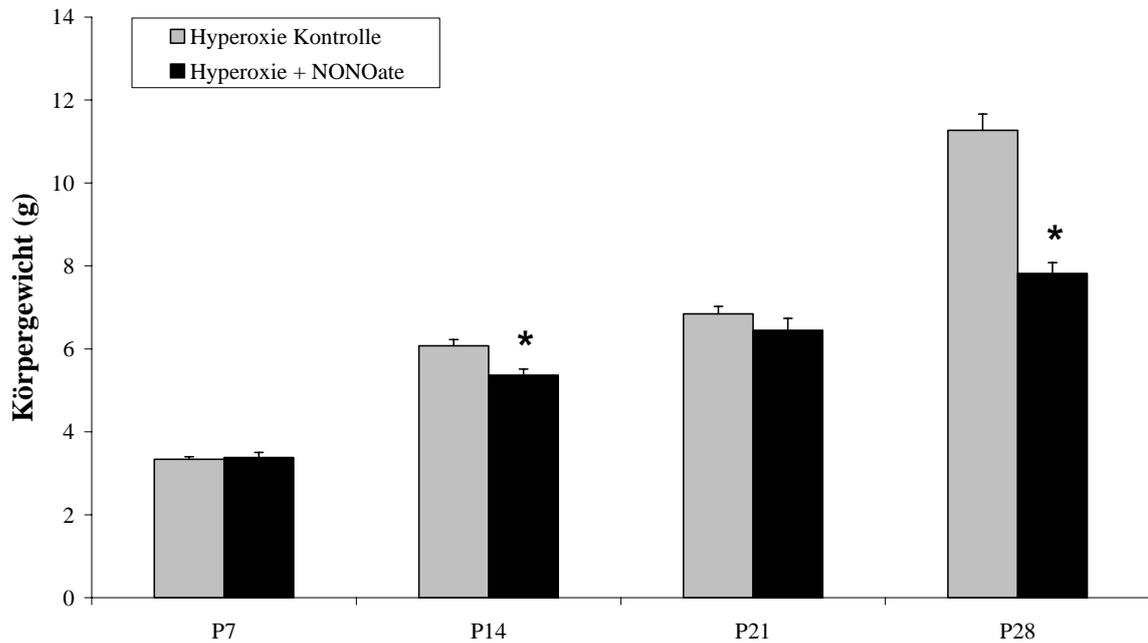


Abbildung 3.6: Gewichtsentwicklung der unbehandelten hyperoxischen Kontrollgruppe B und der mit Deta-NONOate behandelten hyperoxischen Tiere (Gruppe C) im 28-tägigen postnatalen Beobachtungszeitraum. Dargestellt ist das mittlere Körpergewicht \pm SEM im postnatalen Alter von 7, 14, 21 und 28 Tagen (* $p < 0,05$ im Students t-Test für unverbundene Stichproben zwischen Gruppe B und C).

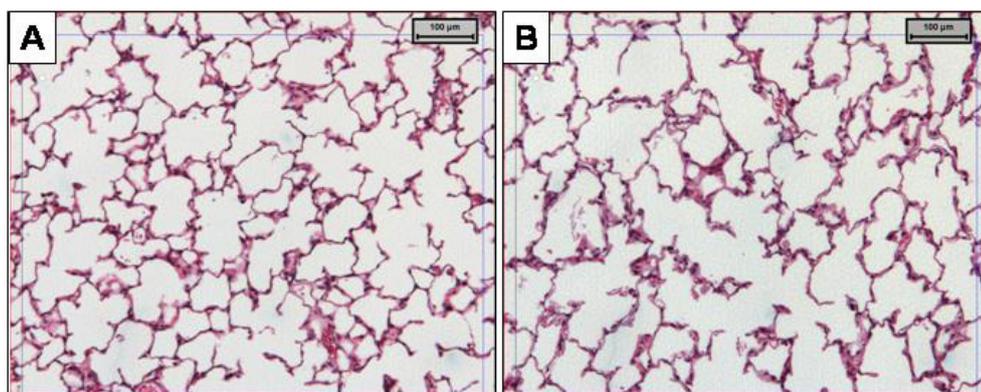


Abbildung 3.7: Dargestellt sind lungenhistologische Beispiele der hyperoxischen unbehandelten **Gruppe B (Bild A)** und der mit Deta-NONOate behandelten hyperoxischen **Gruppe C (Bild B)**. Beide Präparate A und B entsprechen dem postnatalen Stadium P28. Die Schnittdicke aller Präparate war $3\mu\text{m}$, gefärbt wurde mit Hämatoxylin und Eosin (H&E). Der in der rechten oberen Ecke der Einzelbilder abgebildete Maßstab entspricht jeweils $100\mu\text{m}$, alle Aufnahmen sind im Original mit dem 10-fach Trockenobjektiv angefertigt.

Die histomorphometrische Bestimmung des mittleren prozentualen Luftanteils (A_{pc} [%]) der unbehandelten Gruppe B und der mit Deta-NONOate behandelten Gruppe C ergab keinen nennenswerten Unterschied. Im Durchschnitt verfügten die Schnittpräparate der unbehandelten Tiere über 76,9% Luftanteil im Vergleich zu 76,2% bei der mit Deta-NONOate behandelten Gruppe C. Bei fast identischer Standardabweichung errechneten sich in der statistischen Auswertung somit logischerweise keine Signifikanz ($p=0,58$). Abbildung 3.8 gibt die beschriebenen Resultate graphisch wieder.

Auch die Analyse der mittleren Septendicke (S_t [μm]) ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Gruppe B und C. Allerdings war hier –auch wenn statistisch mit $p=0,17$ nicht signifikant– tendenziell eine geringgradige Septenverdickung der behandelten Gruppe C zu beobachten (Gruppe B: $5,3\mu\text{m}$ vs. Gruppe C: $5,6\mu\text{m}$), siehe auch Abbildung 3.9.

Bei der Ermittlung des mean linear intercept (L_m [μm]) der vier Wochen alten Versuchstiere konnte ebenso kein signifikanter Unterschied der interalveolären Distanz beider Gruppen festgestellt werden. Im Mittel waren es bei Gruppe B $35,2\mu\text{m}$ im Vergleich zu $35,0\mu\text{m}$ bei den behandelten Tieren der Gruppe C ($p=0,90$), siehe auch Abbildung 3.10.

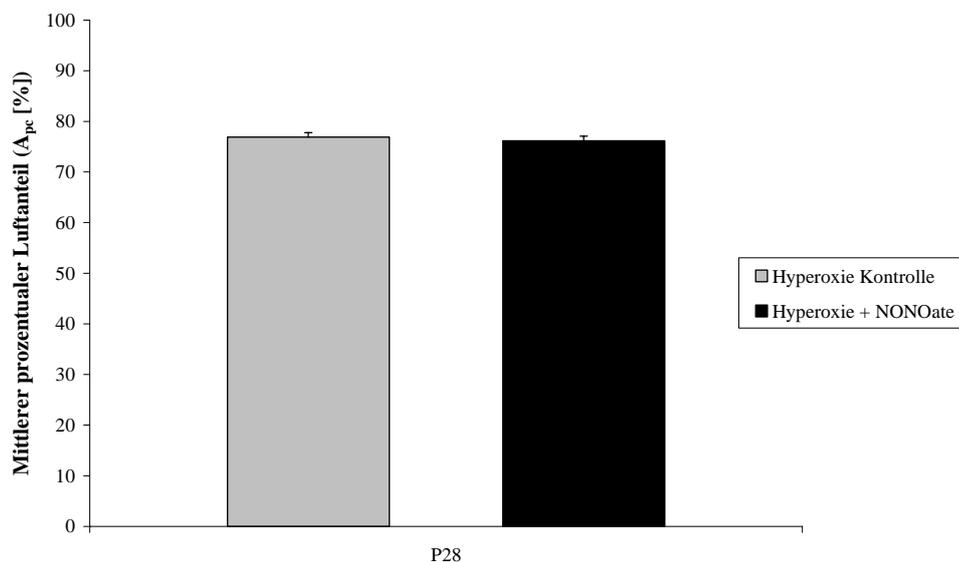


Abbildung 3.8: Mittlerer prozentualer Luftanteil (A_{pc} [%]) von Gruppe B (unbehandelte Hyperoxie Kontrolle) und Gruppe C (Deta-NONOate behandelte Gruppe) vergleichend gegenübergestellt im postnatalen Alter von 28 Tagen. Aufgetragen ist der A_{pc} in Prozent als Mittelwerte \pm SEM ($p=0,58$ im Students t-Test für unverbundene Stichproben zwischen Gruppe B und Gruppe C).

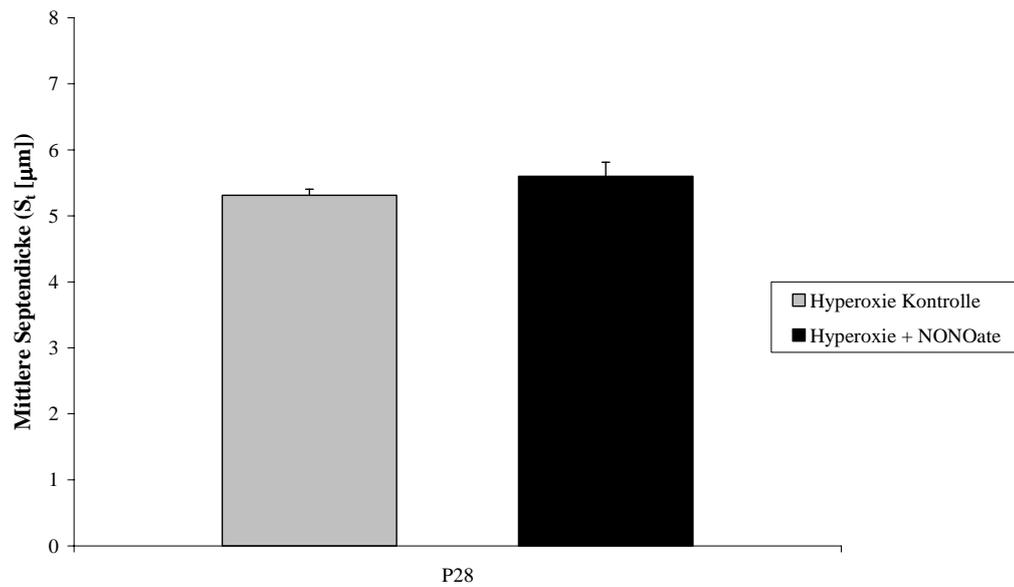


Abbildung 3.9: Mittlere Septendicke (S_t [μm]) von Gruppe B (unbehandelte Hyperoxie Kontrolle) und Gruppe C (Delta-NONOate behandelte hyperoxische Gruppe) vergleichend gegenübergestellt im postnatalen Alter von 28 Tagen. Aufgetragen ist der S_t in μm als Mittelwerte \pm SEM ($p=0,17$ im Students t-Test für unverbundene Stichproben zwischen Gruppe B und Gruppe C).

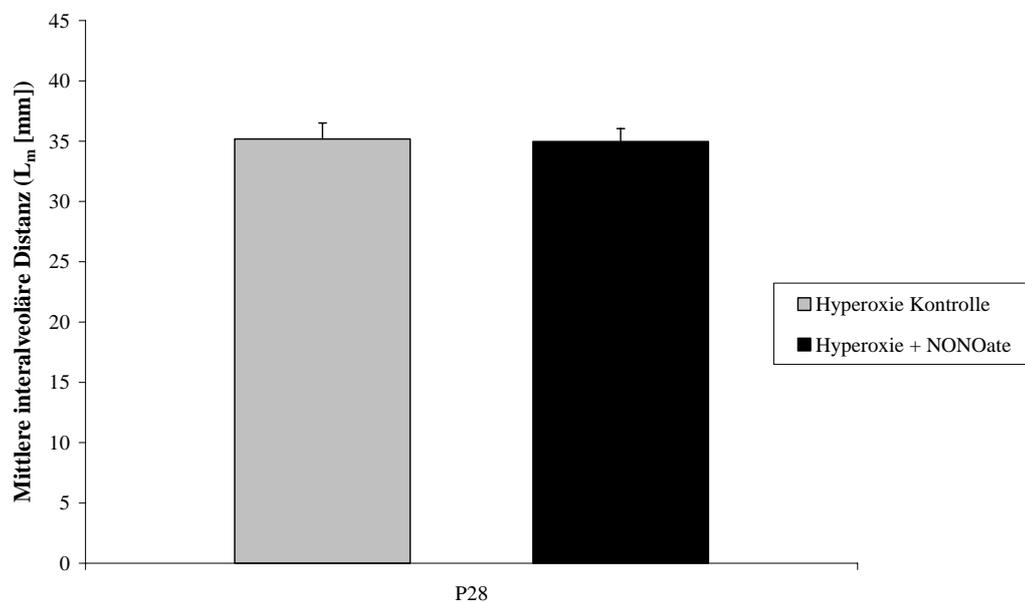


Abbildung 3.10: Mean linear intercept (L_m [μm]) von Gruppe B (Hyperoxie Kontrolle) und Gruppe C (Delta-NONOate behandelte hyperoxische Gruppe) vergleichend gegenübergestellt im postnatalen Alter von 28 Tagen. Aufgetragen ist der L_m in μm als Mittelwerte \pm SEM ($p=0,90$ im Students t-Test für unverbundene Stichproben zwischen Gruppe B und C).

3.3 Versuche 3 und 4: *Einfluss von niedrig (5mg/kg KG) und hoch (20mg/kg KG) dosiertem Sildenafil auf die Hyperoxie-induzierte postnatale Lungenreifungsstörung und das beeinträchtigte körperliche Gedeihen*

In den Versuchen 3 und 4 wurde ebenfalls auf der Basis von Versuch 1 aufbauend vorgegangen. Dazu wurden zusätzlich zwei weitere randomisierte Gruppen gebildet und wie in 2.3.3 und 2.3.4 beschrieben, über den postnatalen Zeitraum von 28 Tagen täglich mit Sildenafil behandelt.

Gruppe D (5mg/kg KG) und Gruppe E (20mg/kg KG) zeigten im vierwöchigen postnatalen Untersuchungszeitraum keine Sterblichkeit. Im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollgruppe B wurde bei beiden Sildenafil-Gruppen über die Zeit eine geringere Zunahme des Körpergewichtes festgestellt. Die Durchschnittswerte für Gruppe B (Hyperoxie; $FiO_2=0,85$; Kontrolle) sind im Kapitel 3.1 und 3.2 bereits beschrieben worden. Im Vergleich dazu zeigten sich im gleichen Zeitraum bei den Tieren der mit 5mg Sildenafil/kg KG behandelten Gruppe D (n=5) das mittlere Körpergewicht wie folgt: 3,3g im postnatalen Stadium P7, 5,8g an P14, 6,3g an P21 und 8,7g an P28. Geringgradig leichter, aber dennoch sehr ähnlich stellte sich der Gewichtsverlauf der mit 20mg Sildenafil/kg KG behandelten Gruppe E (n=5) dar: 3,2g im postnatalen Stadium P7, 5,3g an P14, 6,0g an P21 und 8,6g an P28. In beiden mit Sildenafil therapierten Gruppen stellte sich die Gewichtsentwicklung ebenfalls annähernd linear dar, wobei die Körpergewichte der einzelnen Mäuse sehr homogen verteilt waren. Die statistische Auswertung der mittleren Körpergewichte mittels one way ANOVA und dem post hoc Neuman-Keuls Test ergab signifikante Unterschiede für die postnatalen Stadien P14, P21 und P28 für Gruppe E im Vergleich zur Kontrolle (P7: $p=0,63$; P14: $p<0,05$; P21: $p<0,05$; P28: $p<0,01$). Statistische Signifikanz erreichten die Ergebnisse von Gruppe D nur im postnatalen Alter von 28 Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe E (P7: $p=0,63$; P14: $p>0,05$; P21: $p>0,05$; P28: $p<0,01$). Der Vergleich zwischen der niedrig dosierten und der hoch dosierten Sildenafil-Gruppe erreichte keine statistisch signifikanten Unterschiede. Abbildung 3.11 liefert den graphischen Überblick über die Gewichtsverläufe. Der histologische Eindruck der beiden therapierten Gruppen und der Kontrollgruppe im direkten Vergleich, kann in Abbildung 3.12 gewonnen werden.

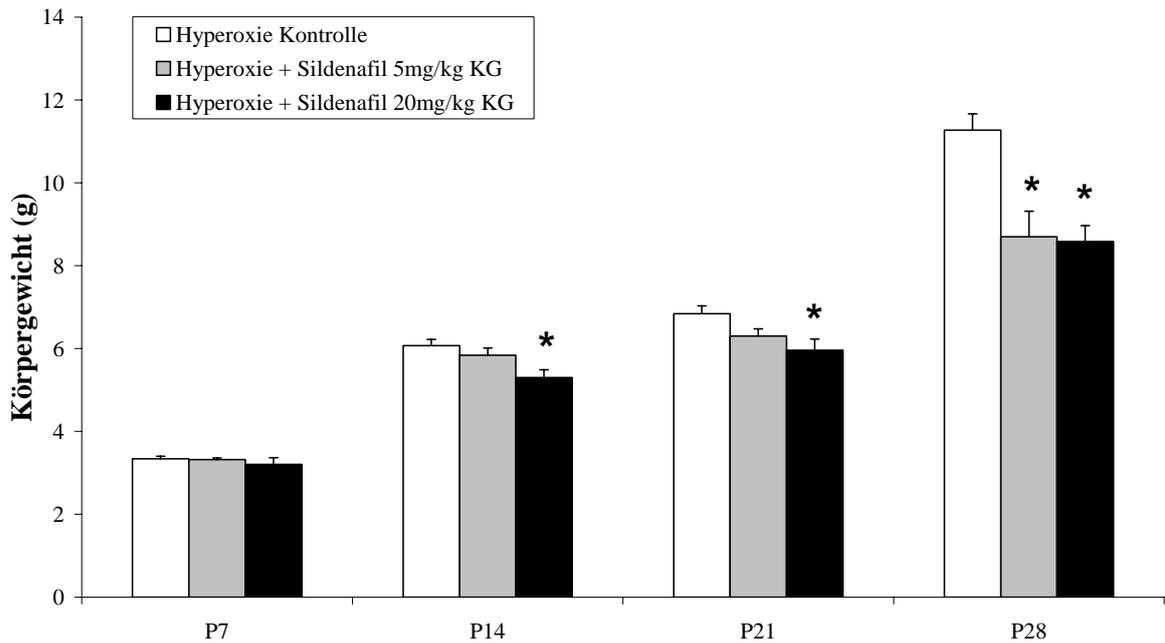


Abbildung 3.11: Gewichtsentwicklung der unbehandelten hyperoxischen Kontrollgruppe B, der mit 5mg Sildenafil/kg KG per dies behandelten Gruppe D und der mit 20mg Sildenafil/kg KG per dies behandelten Gruppe E im 28-tägigen postnatalen Beobachtungszeitraum. Dargestellt ist das mittlere Körpergewicht \pm SEM im postnatalen Alter von 7, 14, 21 und 28 Tagen (* $p < 0,05$ mittels one way ANOVA und post hoc Neuman-Keuls Test im Vergleich mit Kontrollgruppe B).

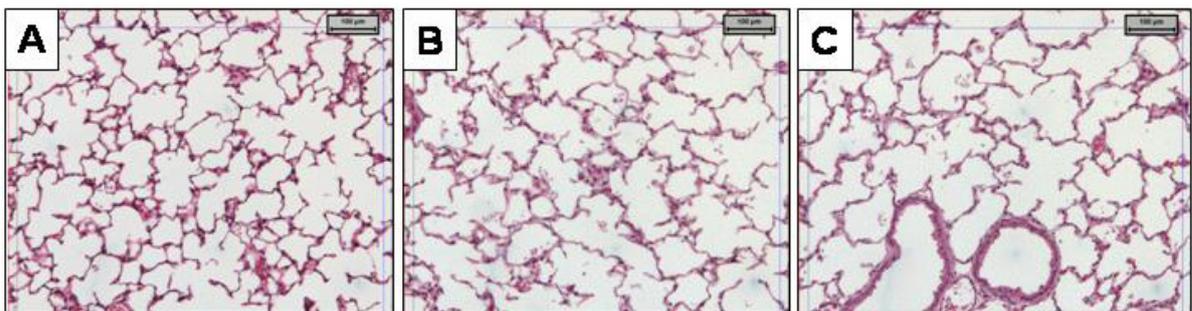


Abbildung 3.12: Dargestellt sind lungenhistologische Beispiele der hyperoxischen unbehandelten Gruppe B (A), der mit 5mg Sildenafil/kg KG behandelten hyperoxischen Gruppe D (B) und der mit 20mg Sildenafil/kg KG behandelten hyperoxischen Gruppe E (C). Alle drei Proben entsprechen dem postnatalen Stadium P28. Die Schnittdicke aller Präparate war $3\mu\text{m}$, gefärbt wurde mit Hämatoxylin und Eosin (H&E). Der in der rechten oberen Ecke der Einzelbilder abgebildete Maßstab entspricht jeweils $100\mu\text{m}$, alle Aufnahmen sind im Original mit dem 10-fach Trockenobjektiv angefertigt.

In der histomorphometrischen Analyse wurden nur marginale Unterschiede bei der Bestimmung des mittleren prozentualen Luftanteils festgestellt. So zeigten sich hierbei 75,7% bei Gruppe D im Vergleich zu 77,3% bei Gruppe E, im Kontrollkollektiv waren es wie oben bereits erwähnt 76,9%. Im one way ANOVA errechnete sich hierfür keine Signifikanz (Abbildung 3.13).

Die Messung der mittleren Septendicke ergab im Durchschnitt $6,3\mu\text{m}$ bei Gruppe D und $5,9\mu\text{m}$ bei Gruppe E im Gegensatz zu den $5,3\mu\text{m}$ der Kontrollgruppe. Diese Septenverdickung der behandelten Gruppen erreichte im Vergleich zur Kontrollgruppe B in der statistischen Auswertung ein signifikantes Niveau (Gruppe D: $p < 0,001$; Gruppe E: $p < 0,01$). Die geringe Differenz in der mittleren Septendicke zwischen der niedrig und der hoch dosierten Sildenafil-Gruppe zeigte bei leicht differierenden Standardabweichungen keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p > 0,05$). Siehe auch Abbildung 3.14.

Bei der Analyse des mean linear intercept (L_m [μm]) fand sich sowohl für Gruppe D, als auch für Gruppe E eine deutliche Erhöhung der mittleren interalveolären Distanz im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese lag bei Gruppe D mit $39,4\mu\text{m}$ und $40,1\mu\text{m}$ signifikant über dem Durchschnittswert der unbehandelten hyperoxischen Gruppe B (Gruppe D: $p < 0,05$; Gruppe E: $p < 0,05$). Die statistische Auswertung ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Werten von Gruppe D und Gruppe E. Die Ergebnisse für die Bestimmung des L_m sind in Abbildung 3.15 graphisch aufgetragen.

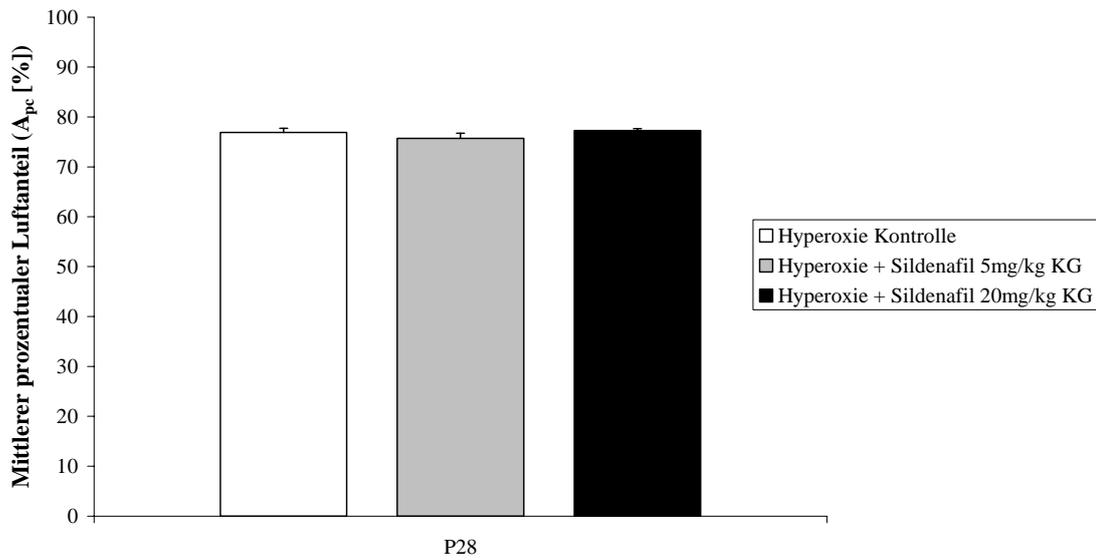


Abbildung 3.13: Mittlerer prozentualer Luftanteil (A_{pc} [%]) von Gruppe B (unbehandelte Hyperoxie Kontrolle), Gruppe D (Sildenafil 5mg/kg KG) und Gruppe E (Sildenafil 20mg/kg KG) vergleichend gegenübergestellt im postnatalen Alter von 28 Tagen. Aufgetragen ist der A_{pc} in Prozent als Mittelwerte \pm SEM ($p=0,43$ mittels one way ANOVA für die Gruppe B [n=7], D [n=5] und E [n=5]).

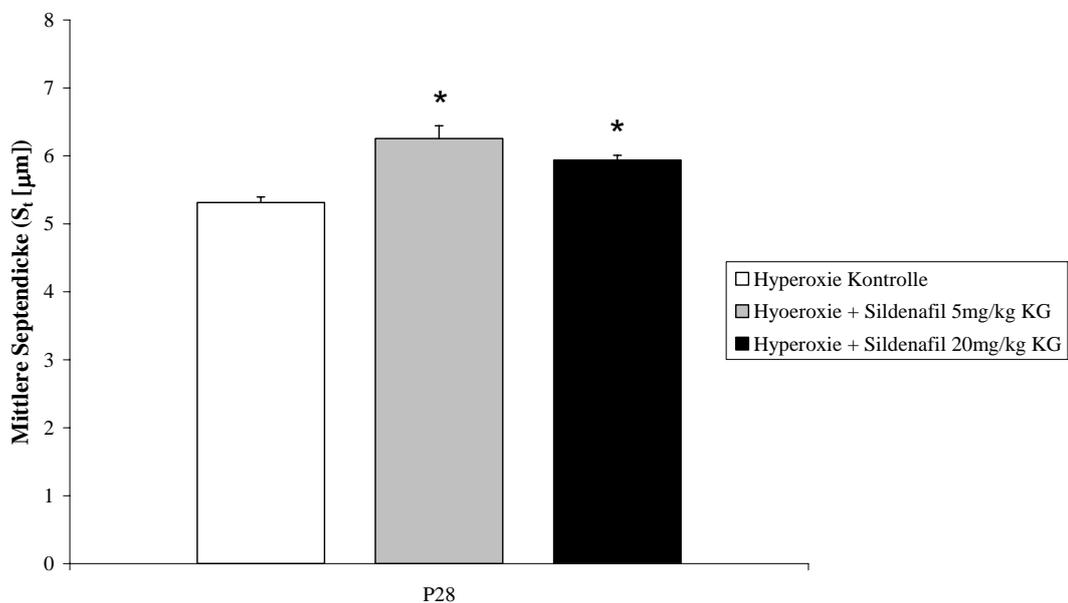


Abbildung 3.14: Mittlere Septendicke (S_t [μm]) von Gruppe B (unbehandelte Hyperoxie Kontrolle), Gruppe D (Sildenafil 5mg/kg KG) und Gruppe E (Sildenafil 20mg/kg KG) vergleichend gegenübergestellt im postnatalen Alter von 28 Tagen. Aufgetragen ist die S_t in μm als Mittelwerte \pm SEM (* $p<0,05$ mittels one way ANOVA und post hoc Neuman-Keuls Test für die Gruppen D [n=5] und E [n=5] versus Kontrollgruppe B [n=7])

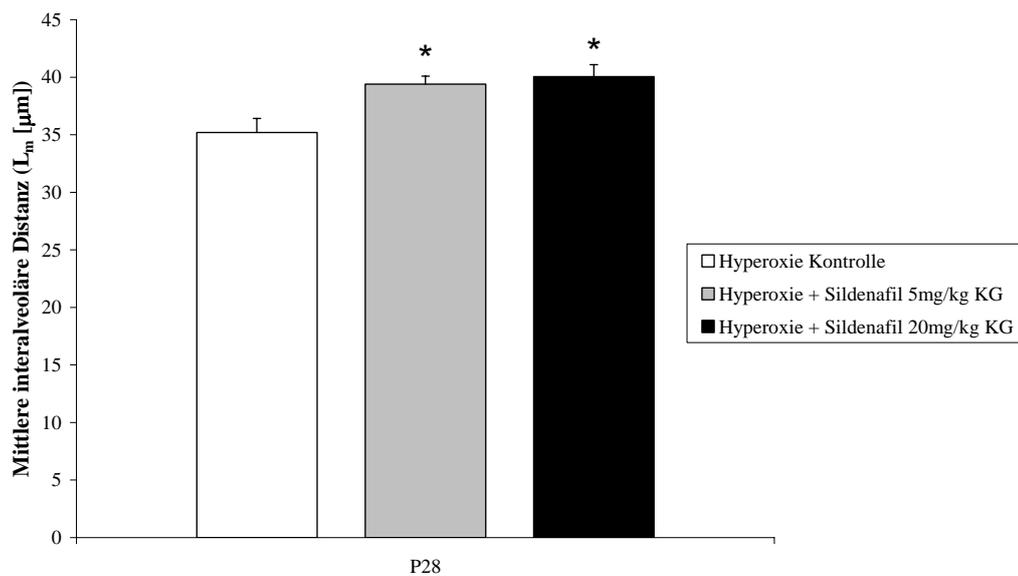


Abbildung 3.15: Mean linear intercept (L_m [μm]) von Gruppe B (unbehandelte Hyperoxie Kontrolle), Gruppe D (Sildenafil 5mg/kg KG) und Gruppe E (Sildenafil 20mg/kg KG) vergleichend gegenübergestellt im postnatalen Alter von 28 Tagen. Aufgetragen ist der L_m in μm als Mittelwerte \pm SEM (* $p < 0,05$ mittels one way ANOVA und post hoc Neuman-Keuls Test für die Gruppen D [$n=5$] und E [$n=5$] versus Kontrollgruppe B [$n=7$]).

3.4 Versuch 5: Einfluss des sGC-Aktivators HMR-1766 auf die Hyperoxie-induzierte postnatale Lungenreifungsstörung und das beeinträchtigte körperliche Gedeihen

In dieser Versuchsreihe wurde wie bei den Versuchen 3 und 4 vorgegangen, allerdings erfolgte hierbei, wie in 2.3.5 erläutert, die 28-tägige tägliche Injektion der Testsubstanz HMR-1766 (Gruppe F). Als Kontrolle diente in diesem Fall eine zusätzliche randomisierte hyperoxische Gruppe, der täglich die Trägersubstanz Polyethylenglykol (PEG) verabreicht wurde (Gruppe G).

Sowohl Gruppe F ($n=4$), als auch Gruppe G ($n=3$) zeigten keine Sterblichkeit im beobachteten Versuchszeitraum. In Bezug auf die Gewichtsentwicklung ergaben sich über den zeitlichen Beobachtungszeitraum von vier Wochen folgende Durchschnittswerte für Gruppe F (Hyperoxie + HMR-1766): 2,4g im postnatalen Stadium P7, 4,4g an P14, 6,5g an P21 und 10,8g an P28. Im Vergleich dazu zeigten sich im gleichen Zeitraum bei den Tieren der ausschließlich

mit der Trägersubstanz behandelten Gruppe G (Hyperoxie + PEG) die Durchschnittswerte wie folgt: 3,9g im postnatalen Stadium P7, 6,1g an P14, 7,4g an P21 und 12,0g an P28. In beiden Gruppen stellte sich die Gewichtsentwicklung annähernd linear dar, wobei die Körpergewichte der einzelnen Mäuse sehr homogen verteilt waren. Es ergab sich somit an P7 eine mittlere Gewichts­differenz von 1,5g, für P14 von 1,7g, für P21 von 0,9g, sowie im Alter von vier Wochen von 1,2g. In der statistischen Auswertung mittels Students t-Test für zwei unverbundene Stichproben stellten sich die Unterschiede zwischen Gruppe G und F in den ersten drei untersuchten Entwicklungsstadien als statistisch signifikant dar, an P28 erreichte die Differenz kein signifikantes Niveau (P7: $p < 0,001$, P14: $p = 0,01$, P21: $p = 0,04$, P28: $p = 0,11$). Die Gewichtsentwicklung der beiden Gruppen ist graphisch in Abbildung 3.16 veranschaulicht. Exemplarische histologische Lungenpräparate sind in Abbildung 3.17 gegenübergestellt.

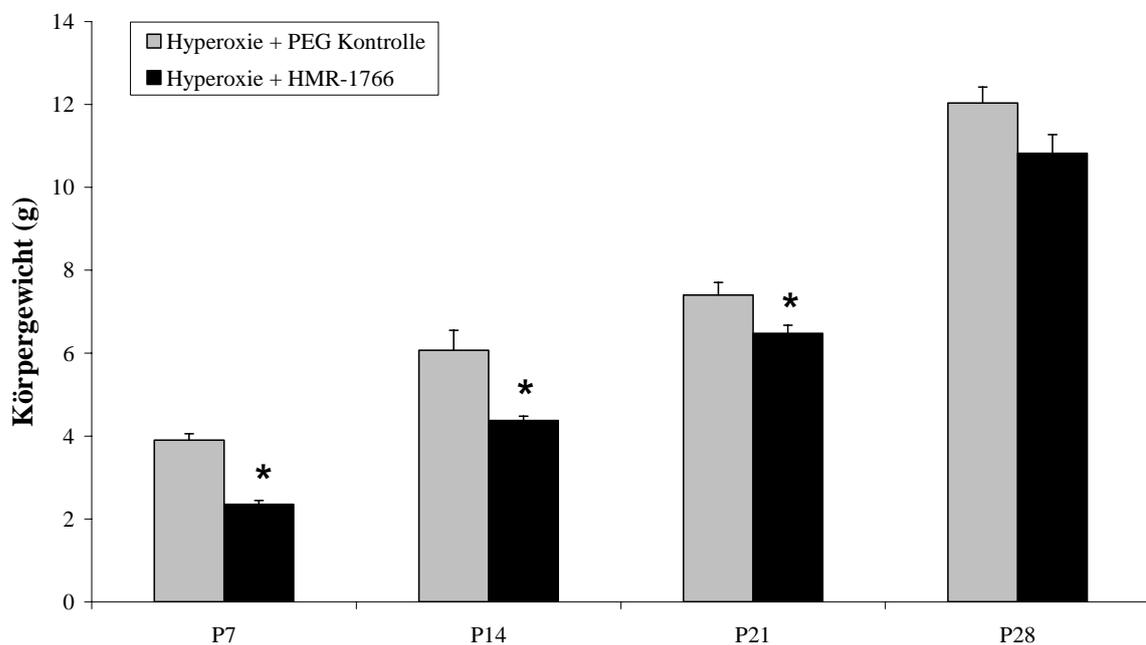


Abbildung 3.16: Gewichtsentwicklung der mit dem Lösungsmittel Polyethylenglykol therapierten Kontrollgruppe G und der mit HMR-1766 behandelten hyperoxischen Tiere (Gruppe F) im 28-tägigen postnatalen Beobachtungszeitraum. Dargestellt ist das mittlere Körpergewicht \pm SEM im postnatalen Alter von 7, 14, 21 und 28 Tagen (* $p < 0,05$ im Students t-Test für unverbundene Stichproben zwischen Gruppe G und F).

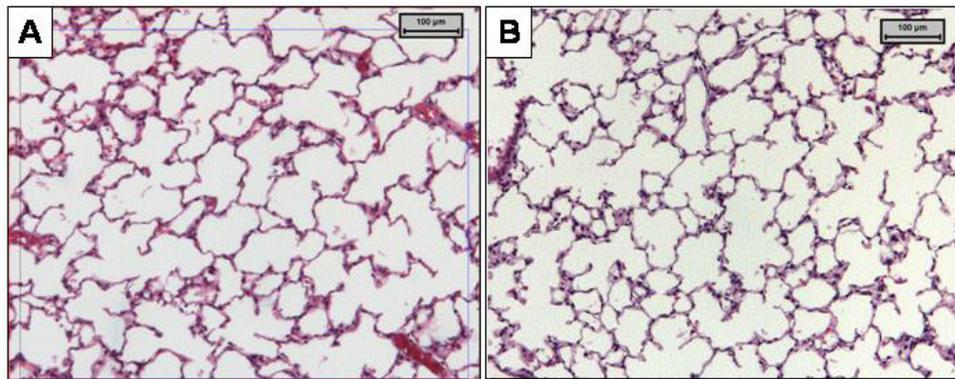


Abbildung 3.17: Dargestellt sind lungenhistologische Beispiele der hyperoxischen mit HMR-1766 behandelten Gruppe F (**A**) und der mit der Trägersubstanz PEG behandelten hyperoxischen Gruppe G (**B**). Beide Proben stammen aus dem postnatalen Stadium P28. Die Schnittdicke aller Präparate war $3\mu\text{m}$, gefärbt wurde mit Hämatoxylin und Eosin (H&E). Der in der rechten oberen Ecke der Einzelbilder abgebildete Maßstab entspricht jeweils $100\mu\text{m}$, alle Aufnahmen sind im Original mit dem 10-fach Trockenobjektiv angefertigt.

Bei der morphometrischen Analyse des mittleren prozentualen Luftanteils (A_{pc} [%]) ergaben sich minimale Unterschiede im Durchschnitt zwischen Gruppe F (75,5%) und Gruppe G (74,6%). In der statistischen Auswertung mittels Students t-Test für unverbundene Stichproben ergab sich somit auch keine Signifikanz ($p=0,60$). Für die graphische Darstellung siehe auch Abbildung 3.18.

Die Bestimmung der mittleren Septendicke (S_t [μm]) zeigte mit $6,2\mu\text{m}$ bei Gruppe F eine leichte durchschnittliche Verdickung im Gegensatz zu $5,8\mu\text{m}$ bei Gruppe G. Dieser Unterschied erreichte in der statistischen Auswertung mit $p=0,39$ jedoch kein signifikantes Niveau. Die Graphik ist in Abbildung 3.19 zu erkennen.

Tendenziell konnte auch eine leichte Erhöhung des mean linear intercept (L_m [μm]) bei der mit HMR-1766 behandelten Gruppe festgestellt werden. Bei Gruppe F waren es $37,0\mu\text{m}$ mittlere interalveoläre Distanz im Gegensatz zu durchschnittlichen $34,1\mu\text{m}$ bei den Kontrolltieren der Gruppe G. Auch diese Differenz erreichte in der statistischen Analyse kein signifikantes Ausmaß ($p=0,19$). Siehe auch Abbildung 3.20 für die optische Gegenüberstellung dieser Ergebnisse.

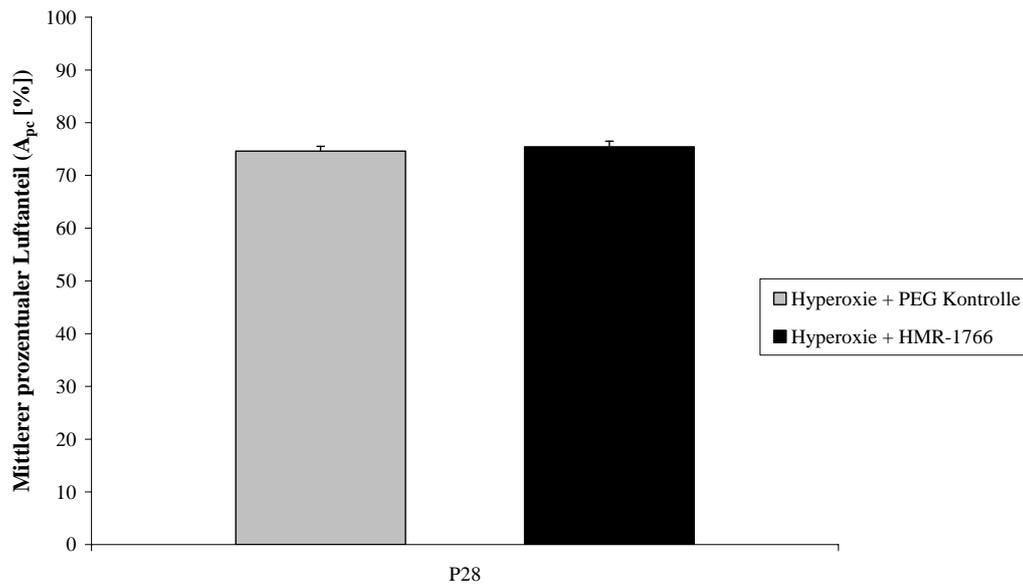


Abbildung 3.18: Mittlerer prozentualer Luftanteil (A_{pc} [%]) von Gruppe F (HMR-1766 behandelte hyperoxische Gruppe) und Gruppe G (nur mit Trägersubstanz PEG behandelte Gruppe) vergleichend gegenübergestellt im postnatalen Alter von 28 Tagen. Aufgetragen ist der A_{pc} in Prozent als Mittelwerte \pm SEM ($p=0,60$ im Students t-Test für unverbundene Stichproben zwischen Gruppe F [n=4] und Gruppe G [n=3]).

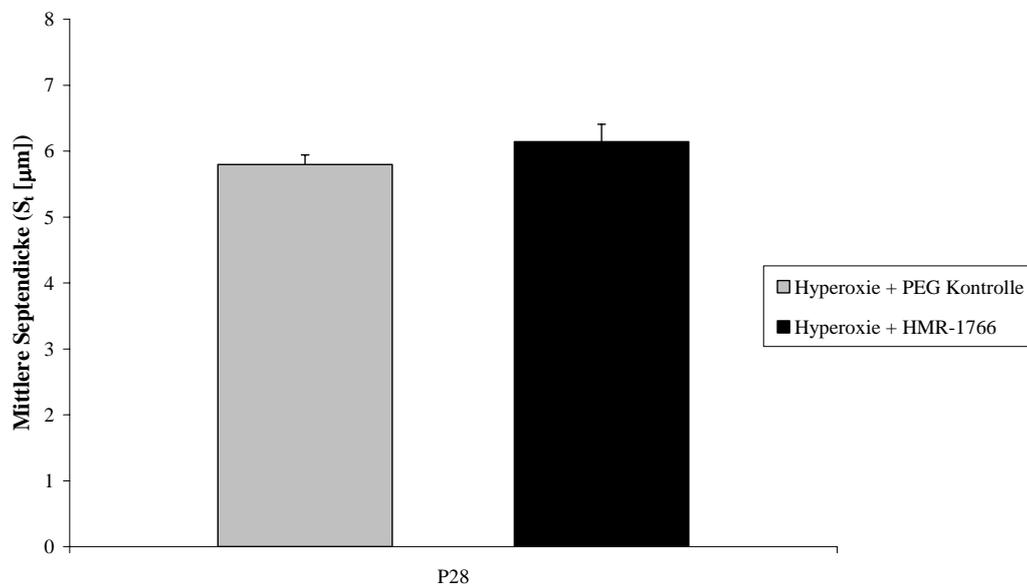


Abbildung 3.19: Mittlere Septendicke (S_t [µm]) von Gruppe F (HMR-1766 behandelte hyperoxische Gruppe) und Gruppe G (nur mit Trägersubstanz PEG behandelte Gruppe) vergleichend gegenübergestellt im postnatalen Alter von 28 Tagen. Aufgetragen ist der S_t in µm als Mittelwerte \pm SEM ($p=0,39$ im Students t-Test für unverbundene Stichproben zwischen Gruppe F [n=4] und Gruppe G [n=3]).

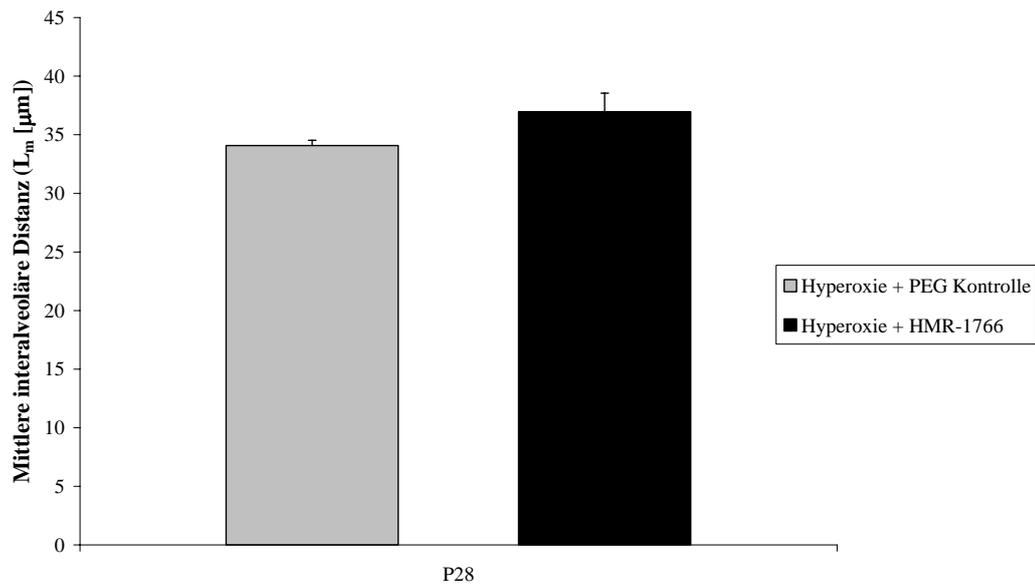


Abbildung 3.20: Mean linear intercept (L_m [μm]) von Gruppe F (HMR-1766 behandelte hyperoxische Gruppe) und Gruppe G (nur mit Trägersubstanz PEG behandelte Gruppe) vergleichend gegenübergestellt im postnatalen Alter von 28 Tagen. Aufgetragen ist der L_m in μm als Mittelwerte \pm SEM ($p=0,19$ im Students t-Test für unverbundene Stichproben zwischen Gruppe F [$n=4$] und Gruppe G [$n=3$]).

4 Diskussion

4.1 Modell der chronischen neonatalen Hyperoxie

Trotz der enormen Fortschritte in der neonatologischen Intensivmedizin bleibt die BPD einer der wesentlichen Morbiditätsfaktoren frühgeborener Kinder mit einem Geburtsgewicht unterhalb von 1000g.^{9;143} Innerhalb dieses Kollektives entwickeln etwa 30% der Patienten eine BPD.²¹⁷ Diese Kinder unterliegen einem hohen Risiko für langfristige pulmonologische und neurologische Komplikationen, die über die Kindheit hinaus reichen können.²¹⁵ Damit stellt die BPD eine erhebliche physische und emotionale Belastung der Patienten und ihrer Familien dar und führt zusätzlich zu enormen Kosten innerhalb des Gesundheitssystems.¹⁵⁶

Wie in 1.2 ausführlich dargestellt, kann die multifaktorielle perinatale Lungenschädigung von Kindern, die in einer späten kanalikulären bis frühen sakkulären Phase der Lungenentwicklung geboren werden, zu den für die neue Form der BPD typischen strukturellen Abnormalitäten führen. Dabei steht das histologische Bild der alveolären Simplifikation mit wenigen und vergrößerten terminalen Luftwegen im Vordergrund, welches auch den Begriff „Arrest der Lungenentwicklung“ geprägt hat.¹¹⁹ Diese charakteristischen Veränderungen konnten in der Vergangenheit in einer Vielzahl an Tierversuchen reproduziert werden. So berichteten die Arbeitsgruppen um Bland und Pierce von strukturellen Veränderungen in den Lungen von neugeborenen Lämmern, welche post natum 3 bis 4 Wochen mit erhöhten inspiratorischen Sauerstoffkonzentrationen künstlich beatmet wurden und in der Pathologie der humanen BPD sehr stark ähnelten.^{33;176} Dieses Großtiermodell beispielsweise erscheint dem Autor neben dem enormen experimentellen Aufwand und dem von der normalen menschlichen Lungenreifung abweichenden Alveolarisierungszeitpunkt des Lammes, zur Gewinnung neuer pathophysiologischer Erkenntnisse über die BPD als weniger geeignet. Lämmer weisen zum Zeitpunkt der reifen Geburt eine bereits abgeschlossene Alveolarisation auf und besitzen damit einen deutlich höheren Reifegrad der Lungenarchitektur als extrem frühgeborene Kinder beim Erreichen von rechnerischen 60-65% der normalen Schwangerschaftsdauer.⁵⁴ So wird es erforderlich mit induzierter Frühgeburtslichkeit zu arbeiten, um den kritischen Bereich der Lungenentwicklung zu untersuchen.

Im Gegensatz dazu findet bei Mäusen und Ratten die Alveolarisierung, wie bereits unter 1.1. erläutert, in etwa der 2. und 3. postnatalen Lebenswoche statt und zum Zeitpunkt der

physiologischen Geburt befindet sich die Lunge somit noch in einer sakkulären Entwicklungsphase (siehe Abb. 1).⁴² Diese Tatsache war entscheidend bei der Auswahl der Maus vom Typ C57Bl6/N für das in der vorliegenden Arbeit verwendete Tiermodell, da so mit Neonaten gearbeitet werden konnte, die zum einen vom Grade der Lungenreife und dem relativen zeitlichen Entwicklungsablauf der für die BPD relevanten menschlichen Sequenz qualitativ entsprechen und somit zum anderen ohne artifiziell herbeigeführte Frühgeburtlichkeit mit Kleintieren gearbeitet werden konnte. So kann beim vorliegenden Modell der Spontanpartus abgewartet werden, was für den experimentellen Aufwand und die Stabilität des Modells von großer Bedeutung ist. Zusätzlich bestehen die bei Kleintiermodellen bekannten klaren Vorteile durch die Entstehung geringerer finanzieller Kosten, leichterer Durchführbarkeit, der Möglichkeit zur genetischen Manipulation durch den Einsatz von Knock-out Tieren, sowie die potentiell höhere realisierbare Zahl an Versuchstieren innerhalb einer Versuchsreihe.

Wie zuvor in 1.2.5 erwähnt, wird in der multifaktoriellen Pathogenese der BPD die Hyperoxie als nicht obligater, aber dennoch wesentlicher ursächlicher Faktor gesehen.^{18;44;119;181} So konnte bereits in mehreren experimentellen Arbeiten der schädigende Einfluss von chronischer neonataler Hyperoxie auf die postnatale Lungenreifung bei Nagern gezeigt werden.^{31;35;147;173;222} Dabei unterscheiden sich die Berichte über die Sterblichkeit der Hyperoxie-exponierten Neonaten zum Teil erheblich. So beschreiben Warner et al. eine Sterblichkeit von bis zu 40% innerhalb eines 4-wöchigen Beobachtungszeitraumes von neonatalen FVB/N Mäusen unter 85% Sauerstoff, wobei eine Häufung der Mortalität in der ersten Lebenswoche festgestellt wurde.²²² Hingegen stellten Jouvencel und Mitarbeiter in einem 15-tägigen Beobachtungszeitraum von neonatalen Ratten unter 50% Sauerstoff keinerlei Sterblichkeit unter den Versuchstieren fest.¹²⁰ Die Arbeitsgruppe um Pappas konstatierte für neonatale C57BL Mäuse in einem 4-wöchigen Hyperoxie-Intervall von 80% O₂ eine leicht erhöhte Sterblichkeit von 18% im Gegensatz zu 15% bei der normoxischen Kontrollgruppe.¹⁷³ Bei dem in der vorliegenden Dissertation verwendeten Tiermodell konnte erfreulicherweise keine erhöhte Mortalität festgestellt werden. Worauf diese Tatsache zurückzuführen ist, lässt sich nicht mit Gewissheit beantworten, so könnten Unterschiede in der Versuchsspezies bzw. dem Mäusestamm, dem Versuchsablauf, den durch die tägliche Rotation und Pflege der Tiere verursachten Stresslevel der Mutter- und Jungtiere, sowie Differenzen der verwendeten Sauerstoffkonzentration für diese unterschiedlichen Beobachtungen verantwortlich sein.

Im vorliegenden Modell zeigte sich bei der Gruppe der neonatalen Hyperoxie eine statistisch signifikante Beeinträchtigung der Gewichtsentwicklung der Versuchstiere. So waren

die hyperoxischen Tiere bereits im postnatalen Alter von einer Woche durchschnittlich 8,3% und im Alter von 4 Wochen bereits 21,5% im Mittel leichter als die gesunde Kontrollgruppe (siehe Abb. 3.1). Diese Beobachtung bestätigt die Ergebnisse anderer Versuchsreihen mit experimenteller neonataler Hyperoxie^{173;222} und zeigt damit die weitreichenden systemischen Auswirkungen der chronischen neonatalen Hyperoxie im Sinne eines beeinträchtigten körperlichen Gedeihens. Es ist anzunehmen, dass die vermehrte Atemarbeit der hyperoxischen Tiere durch beträchtlichen zusätzlichen Energieverbrauch die unzureichende Gewichtszunahme mit bedingen könnte. So konnte beispielsweise von De Meer et al. gezeigt werden, dass an BPD erkrankte Säuglinge gegenüber anderen Frühgeborenen einen um 20% erhöhten Energieverbrauch haben, dabei korreliert das Ausmaß der Erhöhung des Energieverbrauches gut mit der Atemfrequenz.⁶¹

In der lungenhistologischen Aufarbeitung der normoxischen und hyperoxischen Tiere aus der ersten Versuchsreihe zeigt sich bereits nach einer Woche ein sichtbarer pathologischer Befund, der im Verlauf der folgenden drei untersuchten Zeitpunkte in zunehmender Weise imponiert: Hierbei ist bei den hyperoxischen Versuchstieren eine sehr homogene deutliche Rarefizierung der alveolären Komplexität zu beobachten, die im Vergleich zum Höhepunkt der physiologischen Alveolarisierung durch Ausbildung von sekundären Septen vor allem in der zweiten Lebenswoche deutlich wird. Bei der Betrachtung der histologischen Befunde in Abbildung 3.2 wird ersichtlich, dass die physiologische Alveolarisierung der Maus, mit dem Zenit ihrer Aktivität in der zweiten Lebenswoche, zum Ende der dritten Lebenswoche bereits weitestgehend abgeschlossen ist. Diese Beobachtungen decken sich mit den Berichten von Cardoso (siehe auch Abb. 1).⁴² In der histomorphometrischen Quantifizierung der histologischen Eindrücke spiegelt sich dieser Prozess durch eine konsekutive Ausdünnung der mittleren Septendicke wider, die im Mittel von 6,8 μm im Stadium P7 um 37% auf ein ab dem 21. Tag konstant bleibendes Niveau von 4,3 μm abfällt (siehe Abb. 3.4). Die in der vorliegenden Arbeit bestimmten Werte der S_t zeigen eine hohe Übereinstimmung mit den von Warner et al. publizierten Daten der Kontrollgruppe aus ihrer Studie, die ebenfalls den Einfluss der chronischen Hyperoxie an neonatalen Mäusen untersuchte.²²² Der Prozess der Alveolarisierung wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Bestimmung des L_m quantifiziert, sodass sich hier bei der normoxischen Gruppe der erwartete konsekutive Abfall dieses Wertes feststellen ließ. So kommt es zwischen dem 7. und 21. Lebenstag zu einer Reduktion der mittleren interalveolären Distanz um 29%, um dann nach weiteren sieben Tagen auf einem stabilen Niveau zu verbleiben (siehe Abb. 3.5). Dieses Ergebnis belegt die Tatsache, dass bei Mäusen

der Alveolarisationsprozess durch Aussprossung sekundärer Septen ein vollständig postnatales Ereignis darstellt, welches mit Vollendung der dritten Lebenswoche praktisch abgeschlossen ist.

Die Aussagekraft des prozentualen Luftanteils (A_{pc}) ist in Bezug auf die physiologische normoxische Lungenentwicklung nur gering, da die gemessenen Werte durch eine Abnahme der interalveolären Distanz mit zeitgleicher septaler Verdünnung im 4-wöchigen Beobachtungszeitraum auf einem annähernd gleichen Niveau verbleiben (siehe Abb. 3.3). Im Gegensatz dazu konnte bei der hyperoxischen Gruppe B ein signifikant höherer A_{pc} in allen vier untersuchten Stadien festgestellt werden. Diese Ergebnisse können als emphysematischer Aspekt des geschädigten Lungengewebes interpretiert werden und quantifizieren somit den nativen histologischen Eindruck.

Der Einfluss der neonatalen Hyperoxie führt in vorliegender Studie in sehr eindrucksvoller Weise zu einem vollständigen Arrest der Alveolarisierung durch das Ausbleiben der Einsprossung von sekundären Septen mit der Ausbildung von großen irregulär geformten terminalen Luftwegen mit sakkulärem Charakter, sodass folglich ein inadäquater Zuwachs an differenzierter, distaler Gasaustauschfläche im Vordergrund steht. Dieser Befund zeigt sich in der histomorphometrischen Analyse in einer, im Vergleich zu den altersentsprechenden Kontrollgruppen, signifikant erhöhten interalveolären Distanz. Der L_m liegt im Stadium P7 etwa um 14% höher als in der normoxischen Kontrollgruppe und konnte im Alter von vier Wochen sogar um etwa den Faktor 1,75 im Mittel erhöht gemessen werden (siehe Abb. 3.5). Dabei kann außerdem ab dem Stadium P21 eine signifikante Verdickung der Septen der Hyperoxie-exponierten Lungen im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden, die somit als interstitielle Fibrosierung zu werten ist (siehe Abb. 3.4). Auffallend dabei ist jedoch, dass es unter hyperoxischen Bedingungen nicht zu einer echten Zunahme der Septendicke zu kommen scheint, sondern vielmehr eine ausbleibende Ausdünnung stattfindet und somit erst nach drei Wochen eine signifikante Differenz zum Kontrollkollektiv präsent wird.

Interessant ist die Tatsache, dass im Stadium P7 die mittlere Septendicke in der Kontrollgruppe signifikant höher liegt als bei den hyperoxischen Neonaten. Dieses Ergebnis überrascht hinsichtlich der erwarteten Befunde zunächst, da aus den im Vorfeld getätigten Überlegungen eine Fibrosierung unter Hyperoxie erwartet wurde. Bei näherer Betrachtung findet sich jedoch eine logische Erklärung für diese Beobachtung. Wie zuvor erläutert, findet die physiologische Alveolarisationsphase in ihrer maximalen Ausprägung um den 10. Lebenstag herum statt.⁴² Warner und Mitarbeiter konnten in ihrer Arbeit demonstrieren, dass in der ersten Lebenswoche eine der sekundären Septierung vorausgehende sehr hohe pulmonal-zelluläre Proliferationsrate vorherrscht, die bei den Hyperoxie-exponierten Tieren signifikant vermindert

war.²²² Aus dieser Observation lässt sich schlussfolgern, dass im hier untersuchten Stadium P7 die normoxische Lungenentwicklung im Rahmen der hochaktiven Alveolarisation durch eine hohe Zellproliferationsrate des Lungengewebes, eine transient signifikant größere Septendicke gemessen wurde. In der gleichen Studie konstatierten auch Warner et al. eine in der ersten Lebenswoche zunächst geringere Septendicke bei den hyperoxischen Versuchstieren. Mit fortschreitender sekundärer Septierung und konsekutiver Ausdünnung der Septen bei den gesunden Tieren und Ausbleiben dieses Prozesses unter hyperoxischen Konditionen, erreichten die Ergebnisse auch dort erst im Stadium P21 statistische Signifikanz.²²² Diese Observation untermauert die These, dass chronische neonatale Hyperoxie zu einer Störung der physiologischen Lungenreifung im Sinne einer Arrestierung der normalen Entwicklungsabläufe führt. Damit zeigt sich ein hohes Maß an Übereinstimmung der in dem vorliegenden Modell festgestellten Lungenpathologie mit Berichten über die beim Menschen zu beobachtende neue Form der BPD.^{53;54;114}

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das in der vorliegenden Dissertation verwendete Tiermodell der chronischen neonatalen Hyperoxie zu einer Lungenreifungsstörung führt, die in vielen Aspekten den charakteristischen histologischen Veränderungen der BPD sehr oder extrem frühgeborener Kinder entspricht. Natürlich muss von einer Übertragbarkeit der Ergebnisse aus dieser Studie auf den Menschen mit Zurückhaltung vorgegangen werden, jedoch werden Tiermodelle mit chronischer neonataler Hyperoxie für die weitere Beleuchtung der noch unverstandenen Mechanismen der BPD von Experten als relevant und erforderlich angesehen.^{54;95} Damit bietet das in der vorliegenden Arbeit präsentierte Modell Gelegenheit, die größtenteils noch unverstandenen molekularen Pathomechanismen, sowie die Regulation der Lungenreifungsstörungen bei der BPD zu untersuchen und therapeutische Strategien zu entwickeln. Zu diesem Zwecke sollten sich lungenfunktionelle Untersuchungen im Sinne einer Bodyplethysmographie anschließen, um zusätzliche Aussagen über intensivmedizinisch hochrelevante lungenfunktionelle Parameter zu gewinnen. Einer der Vorteile dieses Modells liegt in der Lungenentwicklung der Maus, welche in der Sequenz der Abläufe ein hohes Maß an Übereinstimmung mit der menschlichen Situation aufweist, aber in einer deutlich kürzeren Zeitspanne verläuft. Zusätzlich bietet das Modell die Möglichkeit zur genetischen Manipulation durch den Einsatz von Knock-out Tieren.

4.2 Einfluss von NO und NO-Achsen stimulierenden Pharmaka auf die Hyperoxie-induzierte Lungenreifungsstörung

4.2.1 Rationale für den Therapieansatz

Wie in 1.3 ausführlich dargelegt, ist die Bedeutung von inhalativem Stickstoffmonoxid (iNO) für die Prävention und Therapie der BPD seit über einer Dekade Gegenstand lebhafter Diskussionen und intensiver Forschungsbemühungen. In den letzten Jahren wurde in mehreren teilweise sehr großen klinischen Studien der frühe Einsatz von iNO zur Prävention der BPD untersucht.^{2;17;74;103;121;128;188;213} Dabei konnte trotz teilweise vielversprechender Ergebnisse einzelner Studien, oder in Subkollektiven derselben auch nach Veröffentlichung der beiden bisher größten multizentrischen klinischen Studien um Kinsella¹²¹ und Ballard¹⁷ im Jahr 2006, bei nach wie vor uneindeutiger Studienlage, keine generelle Empfehlung für den routinemäßigen Einsatz von iNO außerhalb von kontrollierten Studien gegeben werden. Die Autoren der genannten Studien betonen, dass die genauen Mechanismen, durch welche iNO das pulmonale Outcome der Patienten verbessert, nach wie vor unklar bleiben. Es existieren viele Untersuchungen, die demonstrieren, dass iNO durch selektive pulmonale Vasodilatation gut ventilierter Lungenareale das sogenannte Ventilations-/Perfusions-Mismatch reduzieren und somit die Oxygenierung verbessern kann.^{4;125;179} Auf experimenteller Ebene konnte eine Senkung der pulmonal-vaskulären Resistance und eine Verbesserung des Gasaustausches durch iNO gezeigt werden.^{123;124} Außerdem scheinen die antiinflammatorischen Eigenschaften von iNO der Entstehung einer CLD entgegenwirken zu können.¹²⁶ Die Effekte von iNO auf die frühe Akkumulation von neutrophilen Granulozyten in der Lunge scheinen von hoher klinischer Relevanz zu sein, da der Influx von Neutrophilen eine wichtige Rolle in der inflammatorischen Kaskade spielt, die verdächtigt wird, zur Entstehung der BPD beizutragen.^{160;170;233}

Neben diesen zum Teil nur kurzfristigen Effekten von Stickstoffmonoxid auf pulmonale und pulmonal-vaskuläre Prozesse häufen sich die Hinweise darauf, dass eine beeinträchtigte endogene NO-Produktion zur Pathogenese der BPD beiträgt. So konnte in tierexperimentellen Modellen der BPD an Schafen¹⁴⁸ und Primaten⁶ eine verminderte Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS oder NOS3) demonstriert werden. Des Weiteren konnten Balasubramaniam et al.¹⁶ und die Arbeitsgruppe um Han¹⁰¹ in ihren Untersuchungen an genetisch manipulierten eNOS-defizienten Mäusen zeigen, dass es bei diesen Knock-out Tieren zu einer gestörten distalen Lungenarchitektur im Sinne einer

beeinträchtigen Alveolarisierung kommt. Diese Observationen gaben Anlass zu der Annahme, dass möglicherweise via exogener Zufuhr von NO durch Kompensation der beschriebenen verminderten endogenen Expression im unreifen Lungengewebe, eine Stimulation der gestörten Alveolarisierung erreicht werden kann. So konnten beispielsweise Lin et al. feststellen, dass in ihrem BPD-Modell das pulmonal-vaskuläre Wachstum und die Alveolarisierung bei neonatalen Ratten durch Hyperoxie gestört wird, aber durch die Behandlung dieser Tiere mit inhalativem NO nach Beenden der hyperoxischen Exposition das Lungenwachstum und die Alveolarisation verbessert werden konnten.¹⁴⁴ Dabei bleibt es nach wie vor unverstanden über welche exakten Mechanismen NO diese positive Beeinflussung der distalen Lungenentwicklung bewirkt. Wie in 1.4 ausführlich dargestellt kann NO sowohl in Abhängigkeit des intrazellulären second messenger Signalmoleküls cGMP, als auch in Unabhängigkeit davon zelluläre Effekte bewirken.¹³⁴ Die cGMP abhängigen NO-Effekte werden dabei über den in 1.4 dargestellten NO-sGC-cGMP-Signaltransduktionsweg vermittelt (siehe auch Abb. 7).

In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob durch exogene NO-Zufuhr sowie durch medikamentöse Stimulation der NO-sGC-cGMP Achse an verschiedenen Ansatzpunkten im in dieser Dissertation verwendeten Modell der chronischen neonatalen Hyperoxie, ein therapeutischer Effekt auf die Hyperoxie-induzierte Lungenreifungsstörung und das körperliche Gedeihen erzielt werden kann.

4.2.2 Zum Einfluss von inhalativem Deta-NONOate im vorliegenden Modell

Durch die tägliche Ultraschallverneblung von Deta-NONOate konnte bei der histomorphometrischen Auswertung der Präparate nach dem vierwöchigen Behandlungszeitraum kein Effekt auf die gestörte Lungenentwicklung festgestellt werden. Es kam im Vergleich zur altersentsprechenden Kontrollgruppe weder zu einer messbaren Abweichung der Septendicke, noch zu einer positiven Beeinflussung des distalen Lungenwachstums im Sinne einer verbesserten postnatalen Alveolarisierung. Auffallend zeigte sich bei ebenfalls ausbleibender Mortalität in dieser Versuchsreihe hingegen die Gewichtsentwicklung der mit Deta-NONOate behandelten Tiere. Nach einer Woche konnte noch keine Differenz zwischen beiden Gruppen konstatiert werden. Ab dem postnatalen Stadium P14 kam es wider Erwarten zu einem beeinträchtigten körperlichen Gedeihen der behandelten Tiere im Vergleich zur altersentsprechenden Kontrollgruppe. So wogen die behandelten Tiere an P14 im Mittel 12% weniger, an P21 ca. 4,5% weniger und im Alter von vier Wochen durchschnittlich 31% weniger als die entsprechende Kontrollgruppe. Statistische Signifikanz erreichten aber nur die Daten der Stadien P14 und P28 (siehe auch Abb. 3.6).

Diese Resultate erscheinen vor dem Hintergrund der kurativen Absicht dieses Therapieversuchs zunächst enttäuschend. Bei der Auswertung der international publizierten Literatur zu dieser Thematik wird deutlich, dass nach bestem Wissen des Autors dieser Arbeit bislang keine weiteren Studien an neonatalen Tiermodellen mit chronischer Hyperoxie durchgeführt und publiziert wurden, die eine inhalative Verabreichung von Deta-NONOate beschreiben. Diese Therapieform erscheint vielversprechend, da sie durch simple Ultraschallverneblung eine inhalative Applikation von NO ermöglicht, ohne dass der enorme technische Aufwand einer echten iNO-Gabe erforderlich wird. Die mit einer iNO-Therapie verbundene Problematik bezüglich erhöhter NO-Umgebungskonzentrationen und der Exposition von in diesem Bereich tätigem Personal wurde bereits an verschiedener Stelle international diskutiert.^{78;175} Als Nachteil der hier benutzten NONOate-Gabe muss allerdings die im Gegensatz zur iNO-Therapie nicht direkt quantifizierbare deponierte NO-Menge genannt werden. Dies ist vor allem im experimentellen Setting als Nachteil zu werten. In einem anderen thematischen Kontext wurde von Dukelow et al. ebenfalls inhalatives Deta-NONOate bei C57Bl/6 Mäusen eingesetzt und bei gleicher vernebelter Substratmenge wie in vorliegender Arbeit eine Deta-NONOate Konzentration in der Verneblungskammer berechnet, die mit iNO-Konzentrationen von etwa 400ppm gleichzusetzen ist.⁶³ Bei diesem im klinischen Vergleich hoch erscheinenden Wert gilt es zu bedenken, dass diese maximalen Konzentrationen lediglich zum Zeitpunkt der nur einige Minuten andauernden Verneblung erreicht werden, also nicht wie bei einer echten iNO-Therapie über 24h konstant vorherrschen. Aufgrund der langen Halbwertszeit von Deta-NONOate von etwa 20h bei Körpertemperatur ist dennoch von einer längerfristigen Wirkung auszugehen. Dukelow konnte so in seiner Studie an Mäusen zeigen, dass nach der Deta-NONOate Verabreichung auch noch 24h nach Verneblung signifikant erhöhte expiratorische NO-Konzentrationen gemessen werden konnten.⁶³ Da im vorliegenden Modell der Verneblungsprozess in einem signifikant kleineren Volumen durchgeführt wurde, ist tendenziell sogar von höheren erreichten NO-Konzentrationen auszugehen.

2006 publizierten Lopez et al. die Ergebnisse ihrer Studie an neonatalen Ratten, die unter 95% O₂ über 10 Tage mit täglichen intraperitonealen (i.p.) Injektionen von Deta-NONOate behandelt wurden.¹⁴⁵ Die in dieser Arbeit verwendete systemische Applikation des NO-Donors erscheint vor dem Hintergrund der neonatologischen klinischen Praxis als weniger geeignetes Modell. Die Resultate aus der genannten Studie von Lopez et al. können ebenfalls keinen Effekt von i.p. Deta-NONOate auf die durch Hyperoxie arrestierte strukturelle distale Lungenentwicklung belegen. Die Entwicklung des Körpergewichtes zeigte sich in Lopez'

Arbeit unter Deta-NONOate Gabe im Vergleich zur hyperoxischen Kontrollgruppe nicht beeinträchtigt. Die Vergleichbarkeit der dort ermittelten Ergebnisse mit den in der hier vorliegenden Dissertation präsentierten Daten, kann natürlich nur mit Zurückhaltung erfolgen. Zum einen handelt es sich um unterschiedliche Spezies, abweichende hyperoxische Konditionen und Applikationsformen der Testsubstanz, sowie deutlich differente Untersuchungszeitpunkte und Beobachtungszeiträume. So bleibt die Frage unbeantwortet, wie sich eine mögliche weitere Gewichtsentwicklung der neonatalen Ratten aus Lopez' Arbeit bei vierwöchiger Therapiedauer darstellen würde. Dazu müsste wahrscheinlich ein Modell mit niedrigeren O₂-Fraktionen eingesetzt werden, um die dort beschriebene hohe Mortalität der Tiere zu senken und somit einen vergleichbaren Untersuchungszeitraum realisieren zu können.

Andere Forschungsgruppen, die den Ansatz einer iNO-Therapie, wie sie im klinischen Setting eingesetzt wird, an verschiedenen Tiermodellen verfolgten, kamen zu unterschiedlichen und teilweise widersprüchlichen Ergebnissen bezüglich des Effektes auf die Alveolarisation. So demonstrierten ter Horst et al. durch den Einsatz von iNO an neonatalen Ratten, die unter 100% O₂ gehalten wurden, eine Abschwächung der pulmonalen Inflammationsreaktion und Fibrinablagerung, sowie ein gesteigertes Überleben, aber eine verbesserte Alveolarisierung konnte bei ausbleibendem signifikantem Effekt auf den L_m ebenfalls nicht konstatiert werden.²⁰⁰ Auten und Mitarbeiter beobachteten an ihrem Modell (95% O₂) an neonatalen Ratten durch Applikation von iNO über die ersten 8 Lebenstage ebensowenig eine Abschwächung der Hyperoxie-induzierten Alveolarisationsstörung. Interessanterweise war die Gewichtszunahme auch in Autens Studie unter iNO schlechter als in der unbehandelten Kontrollgruppe.¹³ Autens Resultate entsprechen weitestgehend den in dieser Dissertation vorgestellten Daten und stehen damit im Gegensatz zu den publizierten vorteilhaften Auswirkungen von iNO aus anderen Modellen der BPD.

So demonstrierten Lin et al. eine signifikante Verbesserung der distalen Lungenreifung bei neonatalen Ratten, die nach Beendigung der unbehandelten hyperoxischen Exposition (100% O₂) von 6 Tagen über weitere zwei Wochen mit iNO unter Raumluftbedingungen in der Rehabilitationsphase behandelt worden waren.¹⁴⁴ Diese Ergebnisse wirken zwar vielversprechend, allerdings erscheint der zeitliche Ablauf der im Modell durchgeführten Behandlung sehr weit von der klinischen Situation distanziert, in der ja gerade in der Phase der respiratorischen Insuffizienz regelhaft mit hohen inspiratorischen O₂-Fraktionen gearbeitet werden muss und eine iNO-Therapie unter Raumluftbedingungen in der neonatologischen Praxis nicht vorkommt. Es lassen sich aus Lins Studie somit, wenn überhaupt, nur sehr vage Rückschlüsse über den potentiell protektiven Einfluss von iNO auf die Entstehung der BPD

unter hyperoxischen Bedingungen ableiten. Allerdings bieten die Beobachtungen von Lin et al. Hinweise für einen denkbaren neuen Therapieansatz, der nach Ende der Intensivpflichtigkeit bei suffizienter Spontanatmung und nur geringem zusätzlichem Sauerstoffbedarf möglicherweise eine verbesserte distale Lungenreifung bei Kindern mit BPD -sozusagen eine raschere Erholung- bewirken könnte. In diesem Zusammenhang stellt sich auch eine Ultraschallverneblung von NO-Donatoren als durchaus denkbar und klinisch leicht realisierbar dar. Zur Überprüfung der von Lin et al. publizierten Beobachtungen erscheint eine Versuchsreihe am vorliegenden Modell, die in diesem Kontext den Einfluss von NONOate auf die Lungenreifung nach Beendigung der hyperoxischen Exposition untersucht, als geeignete Methode.

4.2.3 Zum Einfluss von Sildenafil im vorliegenden Modell

Durch die tägliche subkutane Applikation von 5 beziehungsweise 20mg Sildenafil/kg Körpergewicht über den untersuchten Zeitraum von vier Wochen zeigte sich wider Erwarten eines therapeutischen Benefits, ein negativer Effekt dieser Behandlung auf die untersuchten Zielvariablen. So bot sich eine verschlechterte Gewichtsentwicklung sowohl in der niedrig, als auch der hoch dosierten Sildenafilgruppe. Dabei kam es bei den Tieren mit 20mg Sildenafil/kg KG pro Tag zu einer tendenziell schlechteren Gewichtsentwicklung als im niedriger dosierten Versuchskollektiv, allerdings erreichte diese Differenz zwischen beiden Therapiegruppen keine statistische Signifikanz. Die Differenz zur Kontrollgruppe hingegen zeigte sich mit 23% (5mg/kg KG) bzw. 24% (20mg/kg KG) mittlerer Gewichtsunterschied zwischen niedrig, sowie hoch dosierter Sildenafilgruppe und den hyperoxischen Kontrolltieren im Stadium P28, als statistisch hoch signifikant (siehe auch Abb. 3.11). Wider Erwarten ergab die histomorphometrische Analyse das Bild einer verschlechterten distalen Lungenentwicklung mit einer im Mittel um fast 19% (5mg/kg KG) bzw. 11% (20mg/kg KG) erhöhten Septendicke. Diese Differenzen erreichten in der statistischen Auswertung im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikantes Niveau ohne dass zwischen den beiden Therapiegruppen ein signifikanter Unterschied festzustellen war (siehe auch Abb. 3.14). Ähnliche Ergebnisse lieferte die Bestimmung der mittleren interalveolären Distanz mit einer im Mittel um 12% (5mg/kg KG) bzw. 14% (20mg/kg KG) erhöhten interalveolären Strecke. Auch diese Resultate erwiesen sich im Vergleich zum Kontrollkollektiv als statistisch signifikant ohne einen dosisabhängigen Effekt zu belegen (siehe auch Abb. 3.15).

Auch diese Versuchsreihe erscheint vor der kurativen Absicht dieser Therapie zunächst als enttäuschend. Dem Autor der vorliegenden Dissertationsarbeit ist nach bestem Wissen nur

eine einzige weitere Studie, in welcher der Einfluss von Sildenafil in einem Tiermodell der BPD durch chronische neonatale Hyperoxie untersucht wird, bekannt. Im Gegensatz zu den hier präsentierten Ergebnissen demonstrierte die Arbeitsgruppe um Ladha et al. durch die tägliche subkutane Verabreichung von Sildenafil (100mg/kg KG) eine Verbesserung der durch chronische Hyperoxie gestörten Alveolarisation und pulmonalen Angiogenese bei neugeborenen Ratten (95% O₂ über 14d).¹³⁷

Neben den offensichtlichen Unterschieden in der verwendeten Spezies, der Sauerstoffkonzentration und dem nur halb so langen Untersuchungszeitraum, scheint die von Ladha et al. deutlich höher gewählte Sildenafilosis für die differenten Ergebnisse eine wichtige Rolle zu spielen. Die in der vorliegenden Dissertation verwendeten Dosen wurden vor dem Hintergrund der in der Behandlung der pulmonalen Hypertension des Menschen klinisch eingesetzten Dosierung gewählt. Bei dieser Indikation werden Dosen verwendet, die in der Größenordnung von 1mg/kg KG pro Tag liegen⁸¹, sodass die in der vorliegenden Arbeit gewählten Mengen bereits bewusst hoch angesetzt wurden. Bei näherer Betrachtung findet sich eine eindeutige Erklärung für die extrem hoch erscheinende Dosierung des Sildenafil in der Arbeit von Ladha und Mitarbeitern. Dort wird die Publikation von Walker et al. zitiert, die einen fast hundertfach erhöhte Verstoffwechslungsrate von Sildenafil bei Nagern im Vergleich zum Menschen zeigen konnte.²¹⁶ Diese Tatsache kann sicherlich als sinnvolle Begründung für die gewählte Dosierung von der Gruppe um Ladha herangezogen werden. Die widersprüchlichen Aussagen bezüglich der distalen Lungenentwicklung zu den negativen Effekten der vorliegenden Arbeit können aus den bekannten Daten hierdurch jedoch nicht näher beleuchtet werden. Zur weiteren Aufklärung einer möglichen Dosisabhängigkeit der erwünschten Effekte von Sildenafil im neonatalen Modell der chronischen Hyperoxie, erscheinen weitere Versuchsreihen unter standardisierten Bedingungen erforderlich. Zur besseren Objektivierbarkeit sollte hierbei eine Bestimmung der cGMP Spiegel aus Lungengewebeproben angestrebt werden. Da Ladha et al. keine Informationen über die Gewichtsentwicklung der Versuchstiere in ihrer Studie liefern, können die Beobachtungen aus der vorliegenden Arbeit diesbezüglich leider nicht näher vergleichend bewertet werden.

Es bleibt festzuhalten, dass im vorliegenden Modell durch den Einsatz von sowohl niedrig als auch hoch dosiertem Sildenafil eine, in der histomorphometrischen Analyse quantifizierte, signifikante Verschlechterung der distalen Lungenentwicklung beobachtet wurde. Zusätzlich zeigte sich eine beeinträchtigte Gewichtszunahme der behandelten Versuchstiere. Diese Differenz erreichte sowohl für die niedrig, als auch die hoch dosierte Sildenafilgruppe im postnatalen Alter von vier Wochen ein signifikantes Niveau.

4.2.4 Zum Einfluss von HMR-1766 im vorliegenden Modell

In dieser Versuchsreihe kam der Häm-unabhängige sGC-Aktivator HMR-1766 zum Einsatz. Durch die Verwendung von HMR-1766 sollte durch einen weiteren neuartigen pharmakologischen Angriffspunkt eine Stimulation der NO-sGC-cGMP Achse erreicht werden, um so mögliche Aufschlüsse über die Bedeutung dieses Signaltransduktionsweges für die NO-Therapie der durch chronische Hyperoxie gestörten postnatalen Lungenreifung zu gewinnen.

Die Resultate dieser Versuchsreihe fügen sich in das Bild der Vorversuche mit NONOate und Sildenafil ein. Es kam interessanterweise auch hier zu einer unerwarteten Beeinträchtigung der körperlichen Entwicklung der Verumgruppe im Vergleich zu den ausschließlich mit der Trägersubstanz behandelten Neonaten des Kontrollkollektivs. Anders als bei den beiden zuvor diskutierten Gruppen scheint hier die Schere mit zunehmendem Alter nicht weiter auseinander zu gehen, sondern vielmehr wurde die Differenz auf fortschreitender Zeitachse geringer, sodass im Stadium P28 die statistische Auswertung bei einer mittleren Gewichts Differenz von 10% erstmals das Signifikanzniveau verfehlt. Im Stadium P7 konnten hier noch im Mittel 38% Gewichts Differenz konstatiert werden (siehe auch Abb. 3.16). Erwartungsgemäß kam es im Vergleich von der mit der Trägersubstanz PEG behandelten Kontrollgruppe mit den völlig unbehandelten hyperoxischen Neonaten, zu keiner statistisch greifbaren Differenz. Bisher existieren keine weiteren dem Autor bekannten publizierten Studien, welche mit der sehr neuartigen pharmakologischen Gruppe der sGC-Aktivatoren bei chronischer neonataler Hyperoxie arbeiten. Es bleibt daher sehr schwierig diese Beobachtungen kausal zu bewerten, allerdings bleibt festzuhalten, dass HMR-1766 in der vorliegenden Arbeit erstmalig in einem Modell der chronischen neonatalen Hyperoxie eingesetzt wurde und vor allem in der Phase der Alveolarisierung, also in den ersten zwei Lebenswochen, zu einer signifikanten Beeinträchtigung des körperlichen Gedeihens führt.

In der histomorphometrischen Analyse zeigt sich ähnlich wie bei der mit NONOate behandelten Gruppe ein nur marginal verändertes Bild mit einer im Mittel um ca. 7% höheren Septendicke und einem durchschnittlich ca. 8% längeren L_m , ohne dass sich diese Unterschiede statistisch signifikant darstellen (siehe auch Abb. 3.19 und 20). Als Kritikpunkt ist die in diesem Fall mit drei Kontrolltieren bzw. vier Tieren aus der Therapiegruppe relativ geringe Stichprobenanzahl anzuführen, allerdings erscheint diese vor der Arbeitshypothese als ausreichend, da auch bei größerer Stichprobenanzahl keine qualitative Änderung der Aussage zu erwarten ist. In sich anschließenden Untersuchungen sollte eine Quantifizierung der pulmonalen cGMP-Spiegel angestrebt werden, um auf molekularer Ebene konkretere

Informationen über die Wirksamkeit dieser Therapie im Vergleich zu anderen NO-sGC-cGMP Achsen stimulierenden Ansätzen zu gewinnen. Dies erscheint erforderlich, da es natürlich ähnlich wie bei den Ergebnissen der Sildenafilgruppe denkbar ist, dass dosisabhängige Effekte existieren und so protektive Eigenschaften des sGC-Aktivators erst bei höheren Dosierungen sichtbar werden könnten.

4.3 Schlussfolgerung

Es bleibt festzuhalten, dass in der vorliegenden Arbeit weder durch die exogene Zufuhr von NO mittels Ultraschallverneblung von Deta-NONOate, noch über eine medikamentöse Stimulation des NO-sGC-cGMP Signaltransduktionsweges mit Sildenafil und HMR-1766 eine Verbesserung der durch chronische neonatale Hyperoxie gestörten postnatalen Lungenreifung erreicht werden konnte. Darüber hinaus scheint der Einsatz von Sildenafil sogar einen negativen Effekt auf den durch Hyperoxie gestörten Alveolarisationsprozess zu haben. Interessanterweise führten alle in dieser Arbeit angewendeten Therapieversuche zu einer Beeinträchtigung der Gewichtszunahme im Sinne eines verschlechterten körperlichen Gedeihens.

In Bezug auf die hier beschriebenen nicht feststellbaren positiven Effekte von Deta-NONOate stehen die Ergebnisse im Gegensatz zu den in anderen Modellen der BPD zuvor beschriebenen und für den Alveolarisationsprozess vorteilhaften Eigenschaften von inhalativ zugeführtem NO. Allerdings basieren diese zunächst widersprüchlich erscheinenden Ergebnisse auf einer Vielzahl an interagierenden Faktoren, wie zum Beispiel dem Ausmaß des im Tiermodell vorherrschenden oxidativen Stresses, der Dosierung und dem Zeitpunkt der NO-Therapie, sowie der An- beziehungsweise Abwesenheit von mechanischer Beatmung. So konnte zum Beispiel eine klare Verbesserung der Alveolarisation in einem Rattenmodell gezeigt werden, bei dem erst nach Ende der hyperoxischen Exposition eine NO-Therapie durchgeführt wurde¹⁴⁴, also praktisch eine Beschleunigung der nachfolgenden Erholungsphase demonstriert werden konnte. In einem anderen Modell in dem die BPD unter normoxischen Bedingungen durch die Gabe eines Inhibitors des VEGF-Rezeptors induziert wurde, konnte durch iNO ebenfalls ein positiver Effekt auf die Alveolarisation konstatiert werden.¹⁹⁹ In zwei weiteren Studien an mechanisch beatmeten Großtieren (frühgeborene Lämmer³⁴ bzw. Paviane¹⁵⁷) konnten vorteilhafte Wirkungen von iNO bei nur geringen inspiratorischen O₂-Fraktionen

demonstriert werden. Im Gegensatz dazu konnte die systemische Behandlung mit einem NO-Donator (neugeborene Ratten bei 95% O₂)¹⁴⁵, sowie die iNO-Therapie mit 10ppm bei neonatalen Ratten¹³ die gestörte Alveolarisation nicht verbessern. Diese Beobachtungen geben Anlass zu der Vermutung, dass der protektive Effekt von NO für die postnatale Lungenreifung in Modellen mit hohem oxidativem Stress nicht in signifikantem Maße vorhanden sein könnte. Die vorliegende Arbeit unterstützt diese Hypothese. Auten et al. konstatierten in ihrer Studie an neonatalen Ratten bei 95% O₂, dass durch den Einsatz von inhalativem Ethylnitrit (ENO) in eindrucksvoller Weise die Hyperoxie-induzierte Wachstumsrestriktion und gestörte Alveolarisation verbessert werden kann. In der gleichen Studie konnte durch iNO keine Abmilderung der pulmonalen Veränderungen erreicht werden.¹³ Diese Beobachtung unterstützt die These, dass möglicherweise gerade bei hohem oxidativem Stress durch die S-Nitrolyse von zellulären Proteinen weitere für die postnatale Lungenentwicklung wichtige NO-Effekte vermittelt werden, die über sGC-cGMP-Achsen unabhängige Signalwege fungieren. Da ENO die für die sGC-cGMP unabhängigen NO-Effekte entscheidende Bildung von S-Nitrosothiolen bei hohem oxidativem Stress effektiver bewirken kann als NO¹⁶⁴, liefert Autens Arbeit wichtige Hinweise für die noch sehr unklare Bedeutung dieser Signalwege in der postnatalen Lungenentwicklung. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern ebenfalls Hinweise dafür, dass die sGC-cGMP vermittelten NO-Effekte nicht wesentlich für die zuvor publizierten lungenprotektiven Wirkungen von NO zu sein scheinen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können keinen positiven Einfluss von NO auf die Alveolarisation konstatieren und unterstützen zusätzlich die Hypothese, dass auch die sGC-cGMP vermittelten NO-Effekte nicht, oder zumindest nicht in erster Linie, für die an anderer Stelle zuvor berichteten lungenprotektiven NO-Wirkungen verantwortlich zu machen sind. Damit untermauert diese Dissertation die Forderung, den intensivmedizinischen Einsatz von iNO bei der BPD auch weiterhin nur im Rahmen von kontrollierten klinischen Studien zu betreiben. Auf experimenteller Ebene sollten die molekularen Zusammenhänge zwischen oxidativem Stress und den für die postnatale Lungenreifung wesentlichen Signalkaskaden näher untersucht werden, dabei sollte in Hinblick auf die Bedeutung der NO-Therapie neben den sGC-cGMP abhängigen NO-Effekten auch alternativen NO-Signalwegen Aufmerksamkeit geschenkt werden. Das hier vorgestellte Modell ist zur Bearbeitung dieser Fragestellungen und Überprüfung der aufgeworfenen Hypothesen als gut geeignet anzusehen.

5 Zusammenfassung

Trotz der großen Fortschritte in der Peri- und Neonatologie stellt die bronchopulmonale Dysplasie (BPD) 40 Jahre nach ihrer erstmaligen Beschreibung einen der wesentlichen Morbiditätsfaktoren frühgeborener Kinder mit einem Geburtsgewicht von weniger als 1000g dar. Innerhalb dieses Kollektives entwickeln etwa 30% der Patienten eine BPD. Diese Kinder unterliegen einem hohen Risiko für chronische pulmologische und neurologische Komplikationen. Die Pathogenese gilt als multifaktoriell, neben der anatomisch-strukturellen und biochemischen Unreife der Lunge gilt Hyperoxie als wichtiger ätiologischer Faktor. Bei der BPD zeigt sich heute im Wesentlichen das histopathologische Bild einer alveolären Simplifikation im Sinne einer gestörten distalen Lungenreifung. Trotz angestrebter Bemühungen sind bisher keine effektiven und sicheren präventiven Behandlungskonzepte identifiziert worden. Aufgrund von vielversprechenden experimentellen Daten bleiben die Erwartungen an die Therapie mit inhalativem Stickstoffmonoxid (NO) bei unklarer klinischer Studienlage hoch.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zunächst ein stabiles Modell der Hyperoxie-induzierten postnatalen Lungenreifungsstörung an Mäusen zu etablieren. Zielvariablen waren hierbei, neben der Sterblichkeit und dem körperlichen Gedeihen, vor allem die histomorphometrische Quantifizierung der Fibro- und Alveolarisierung. In nachfolgenden Versuchsreihen wurde zusätzlich der Einfluss des NO-Donors *Deta-NONOate*, des Phosphodiesterase Typ 5 (PDE-5) Inhibitors *Sildenafil*, sowie des Aktivators der löslichen Guanylatzyklase (sGC) *HMR-1766*, auf die durch chronische Hyperoxie gestörte postnatale Lungenentwicklung untersucht.

Die Exposition der neonatalen Mäuse gegenüber 85% O₂ über die ersten vier Lebenswochen führte zu einem signifikanten Arrest der Alveolarisierung mit der Ausbildung von großen irregulär geformten terminalen Luftwegen mit sakkulärem Charakter und einer -im Vergleich zum normoxischen Kontrollkollektiv- signifikanten Verdickung der Septen. Die Gewichtszunahme der hyperoxischen Neonaten war bei nicht erhöhter Mortalität signifikant geringer als bei der Kontrollgruppe. Die 4-wöchige Behandlung mit inhalativem *Deta-NONOate* führte bei unbeeinflusster distaler Lungenarchitektur zu einer verschlechterten Gewichtsentwicklung der Tiere. Ähnliche Ergebnisse lieferte die Versuchsreihe mit dem sGC-Aktivator *HMR-1766*. Unter der Therapie mit *Sildenafil* kam es neben der Beeinträchtigung des

körperlichen Gedeihens zusätzlich zu einer signifikanten Verschlechterung der distalen Lungenreifung.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können im Gegensatz zu anderen Studien keinen positiven Einfluss von exogen zugeführtem NO auf die durch chronische postnatale Hyperoxie induzierte Lungenreifungsstörung konstatieren. Durch die fehlenden positiven Effekte der medikamentösen Stimulation der NO-cGMP Achse unterstützt sie zusätzlich die Hypothese, dass die sGC-cGMP vermittelten NO-Effekte nicht, oder zumindest nicht in erster Linie, für die aus der BPD Forschung zuvor berichteten lungenprotektiven NO-Eigenschaften verantwortlich zu machen sind.

6 Summary

40 years after the original description of bronchopulmonary dysplasia (BPD), and despite significant advances in peri- and neonatology, BPD remains one of the major factors of morbidity in prematurely born babies weighing 1000g at birth or less. 30% of these patients develop BPD. These children are at high risk for chronic pulmonary and neurological complications. The pathogenesis is thought to be multi-factorial. In addition to the anatomical-structural and biochemical immaturity of the lung, hyperoxia plays an important etiological role. Nowadays the histopathological picture of BPD shows primarily alveolar simplification in the sense of a disturbed lung-maturation process. Intense efforts have yielded no effective and safe preventive concepts of therapy. Despite inconclusive clinical studies, promising experimental data maintain high expectations for treatment with inhaled nitric oxide (NO).

The aim of this thesis has been to establish a reliable model for disturbed hyperoxia-induced postnatal lung-maturation in mice. Variables of interest aside from survival and weight gain have been the histomorphometric quantification of alveolarization and fibrosis. In animal experiments, the effect of the NO-donor *Deta-NONOate*, the phosphodiesterase type 5 (PDE-5) inhibitor *Sildenafil*, as well as the activator of soluble guanylate cyclase (sGC) *HMR-1766* on disturbed hyperoxia-induced postnatal lung-maturation was examined.

The exposure of neonatal mice to 85% oxygen over the first four weeks of life led to a significantly arrested alveolarization, characterized by the formation of large irregularly-shaped terminal airways of saccular character. Compared with normoxic controls, a significant increase in septal thickness could be observed. Weight gain in hyperoxic neonates was significantly less than in healthy controls; survival did not differ. The four-week long treatment with inhaled *Deta-NONOate* led to an impaired weight gain, but did not show effects on distal lung architecture. Results of the treatment groups with the sGC-activator *HMR-1766* were very similar. The treatment with *Sildenafil* caused a significant impairment of weight gain and distal lung maturation.

In contrast to other studies, the results of this thesis cannot state positive effects of exogenous administration of nitric oxide on chronic hyperoxia-induced postnatal lung damage. The lack of positive effects by pharmacological stimulation of the NO-cGMP axis in this study also supports the hypothesis that sGC-cGMP mediated NO effects do not seem to be – at least not primarily- responsible for BPD researchers' previously reported lung-protective NO-properties.

7 Literaturverzeichnis

1. Surfactant replacement therapy for severe neonatal respiratory distress syndrome: an international randomized clinical trial. Collaborative European Multicenter Study Group. *Pediatrics* 1988; 82: 683-91
2. Early compared with delayed inhaled nitric oxide in moderately hypoxaemic neonates with respiratory failure: a randomised controlled trial. The Franco-Belgium Collaborative NO Trial Group. *Lancet* 1999; 354: 1066-71
3. Abman SH: Bronchopulmonary dysplasia: "a vascular hypothesis". *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2001; 164: 1755-6
4. Abman SH, Kinsella JP, Schaffer MS, Wilkening RB: Inhaled nitric oxide in the management of a premature newborn with severe respiratory distress and pulmonary hypertension. *Pediatrics* 1993; 92: 606-9
5. Abman SH, Wolfe RR, Accurso FJ, Koops BL, Bowman CM, Wiggins JW, Jr.: Pulmonary vascular response to oxygen in infants with severe bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics* 1985; 75: 80-4
6. Afshar S, Gibson LL, Yuhanna IS, Sherman TS, Kerecman JD, Grubb PH, Yoder BA, McCurnin DC, Shaul PW: Pulmonary NO synthase expression is attenuated in a fetal baboon model of chronic lung disease. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2003; 284: L749-L758
7. 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; 159: 945-58
8. Alejandre-Alcazar MA, Kwapiszewska G, Reiss I, Amarie OV, Marsh LM, Sevilla-Perez J, Wygrecka M, Eul B, Koebrich S, Hesse M, Schermuly RT, Seeger W, Eickelberg O, Morty RE: Hyperoxia modulates TGF- β /BMP signaling in a mouse model of bronchopulmonary dysplasia. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2006;
9. Allen J, Zwerdling R, Ehrenkranz R, Gaultier C, Geggel R, Greenough A, Kleinman R, Klijanowicz A, Martinez F, Ozdemir A, Panitch HB, Nickerson B, Stein MT, Tomezsko J, Van Der AJ: Statement on the care of the child with chronic lung disease of infancy and childhood. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2003; 168: 356-96
10. Asikainen TM, Ahmad A, Schneider BK, White CW: Effect of preterm birth on hypoxia-inducible factors and vascular endothelial growth factor in primate lungs. *Pediatr.Pulmonol.* 2005; 40: 538-46
11. Asikainen TM, White CW: Antioxidant defenses in the preterm lung: role for hypoxia-inducible factors in BPD? *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 2005; 203: 177-88
12. Atkinson SA: Special nutritional needs of infants for prevention of and recovery from bronchopulmonary dysplasia. *J.Nutr.* 2001; 131: 942S-6S

13. Auten RL, Mason SN, Whorton MH, Lampe WR, Foster WM, Goldberg RN, Li B, Stamler JS, Auten KM: Inhaled ethyl nitrite prevents hyperoxia-impaired postnatal alveolar development in newborn rats. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2007; 176: 291-9
14. Avery ME, Tooley WH, Keller JB, Hurd SS, Bryan MH, Cotton RB, Epstein MF, Fitzhardinge PM, Hansen CB, Hansen TN, .: Is chronic lung disease in low birth weight infants preventable? A survey of eight centers. *Pediatrics* 1987; 79: 26-30
15. Balasubramaniam V, Maxey AM, Fouty BW, Abman SH: Nitric oxide augments fetal pulmonary artery endothelial cell angiogenesis in vitro. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2006; 290: L1111-L1116
16. Balasubramaniam V, Tang JR, Maxey A, Plopper CG, Abman SH: Mild hypoxia impairs alveolarization in the endothelial nitric oxide synthase-deficient mouse. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2003; 284: L964-L971
17. Ballard RA, Truog WE, Cnaan A, Martin RJ, Ballard PL, Merrill JD, Walsh MC, Durand DJ, Mayock DE, Eichenwald EC, Null DR, Hudak ML, Puri AR, Golombok SG, Courtney SE, Stewart DL, Welty SE, Phibbs RH, Hibbs AM, Luan X, Wadlinger SR, Asselin JM, Coburn CE: Inhaled nitric oxide in preterm infants undergoing mechanical ventilation. *N.Engl.J.Med.* 2006; 355: 343-53
18. Bancalari E: Changes in the pathogenesis and prevention of chronic lung disease of prematurity. *Am.J.Perinatol.* 2001; 18: 1-9
19. Bancalari E, Abdenour GE, Feller R, Gannon J: Bronchopulmonary dysplasia: clinical presentation. *J.Pediatr.* 1979; 95: 819-23
20. Bancalari E, Claure N, Sosenko IR: Bronchopulmonary dysplasia: changes in pathogenesis, epidemiology and definition. *Semin.Neonatol.* 2003; 8: 63-71
21. Banks BA, Seri I, Ischiropoulos H, Merrill J, Rychik J, Ballard RA: Changes in oxygenation with inhaled nitric oxide in severe bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics* 1999; 103: 610-8
22. Baraldi E, Filippone M: Chronic lung disease after premature birth. *N.Engl.J.Med.* 2007; 357: 1946-55
23. Baraldi E, Filippone M, Trevisanuto D, Zanardo V, Zacchello F: Pulmonary function until two years of life in infants with bronchopulmonary dysplasia. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 1997; 155: 149-55
24. Barrington KJ, Finer NN: Treatment of bronchopulmonary dysplasia. A review. *Clin.Perinatol.* 1998; 25: 177-202
25. Bartram U, Speer CP: The role of transforming growth factor beta in lung development and disease. *Chest* 2004; 125: 754-65
26. Baveja R, Christou H: Pharmacological strategies in the prevention and management of bronchopulmonary dysplasia. *Semin.Perinatol.* 2006; 30: 209-18

27. Bhandari V, Gruen JR: The genetics of bronchopulmonary dysplasia. *Semin.Perinatol.* 2006; 30: 185-91
28. 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: 1971-80
29. Bjorklund LJ, Ingimarsson J, Curstedt T, John J, Robertson B, Werner O, Vilstrup CT: Manual ventilation with a few large breaths at birth compromises the therapeutic effect of subsequent surfactant replacement in immature lambs. *Pediatr.Res.* 1997; 42: 348-55
30. Bjorklund LJ, Ingimarsson J, Curstedt T, Larsson A, Robertson B, Werner O: Lung recruitment at birth does not improve lung function in immature lambs receiving surfactant. *Acta Anaesthesiol.Scand.* 2001; 45: 986-93
31. Blanco LN, Frank L: The formation of alveoli in rat lung during the third and fourth postnatal weeks: effect of hyperoxia, dexamethasone, and deferoxamine. *Pediatr.Res.* 1993; 34: 334-40
32. Bland and Coalson, J. J. *Chronic lung disease in early infancy.* New York: Marcel Dekker, 2000.
33. Bland RD, Albertine KH, Carlton DP, Kullama L, Davis P, Cho SC, Kim BI, Dahl M, Tabatabaei N: Chronic lung injury in preterm lambs: abnormalities of the pulmonary circulation and lung fluid balance. *Pediatr.Res.* 2000; 48: 64-74
34. Bland RD, Albertine KH, Carlton DP, MacRitchie AJ: Inhaled nitric oxide effects on lung structure and function in chronically ventilated preterm lambs. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2005; 172: 899-906
35. Bonikos DS, Bensch KG, Northway WH, Jr.: Oxygen toxicity in the newborn. The effect of chronic continuous 100 percent oxygen exposure on the lungs of newborn mice. *Am.J.Pathol.* 1976; 85: 623-50
36. Bonikos DS, Bensch KG, Northway WH, Jr., Edwards DK: Bronchopulmonary dysplasia: the pulmonary pathologic sequel of necrotizing bronchiolitis and pulmonary fibrosis. *Hum.Pathol.* 1976; 7: 643-66
37. Bose CL, Laughon M: Treatment to prevent patency of the ductus arteriosus: beneficial or harmful? *J.Pediatr.* 2006; 148: 713-4
38. Brion LP, Bell EF, Raghuvver TS: Vitamin E supplementation for prevention of morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane.Database.Syst.Rev.* 2003; CD003665
39. Brown ER: Increased risk of bronchopulmonary dysplasia in infants with patent ductus arteriosus. *J.Pediatr.* 1979; 95: 865-6

40. Bryan MH, Hardie MJ, Reilly BJ, Swyer PR: Pulmonary function studies during the first year of life in infants recovering from the respiratory distress syndrome. *Pediatrics* 1973; 52: 169-78
41. Burri PH: Fetal and postnatal development of the lung. *Annu.Rev.Physiol* 1984; 46: 617-28
42. Cardoso WV: Lung morphogenesis revisited: old facts, current ideas. *Dev.Dyn.* 2000; 219: 121-30
43. Chambers HM, van Velzen D: Ventilator-related pathology in the extremely immature lung. *Pathology* 1989; 21: 79-83
44. Charafeddine L, D'Angio CT, Phelps DL: Atypical chronic lung disease patterns in neonates. *Pediatrics* 1999; 103: 759-65
45. Chen Y, Martinez MA, Frank L: Prenatal dexamethasone administration to premature rats exposed to prolonged hyperoxia: a new rat model of pulmonary fibrosis (bronchopulmonary dysplasia). *J.Pediatr.* 1997; 130: 409-16
46. Chess PR, D'Angio CT, Pryhuber GS, Maniscalco WM: Pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Semin.Perinatol.* 2006; 30: 171-8
47. Cheung PY, Salas E, Etches PC, Phillipos E, Schulz R, Radomski MW: Inhaled nitric oxide and inhibition of platelet aggregation in critically ill neonates. *Lancet* 1998; 351: 1181-2
48. Christou H, Brodsky D: Lung injury and bronchopulmonary dysplasia in newborn infants. *J.Intensive Care Med.* 2005; 20: 76-87
49. Clark PL, Ekekezie II, Kaftan HA, Castor CA, Truog WE: Safety and efficacy of nitric oxide in chronic lung disease. *Arch.Dis.Child Fetal Neonatal Ed* 2002; 86: F41-F45
50. 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: 478-86
51. 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. N.Engl.J.Med.* 2000; 342: 469-74
52. Coalson JJ: Experimental models of bronchopulmonary dysplasia. *Biol.Neonate* 1997; 71 Suppl 1: 35-8
53. Coalson JJ: Pathology of new bronchopulmonary dysplasia. *Semin.Neonatol.* 2003; 8: 73-81
54. Coalson JJ: Pathology of bronchopulmonary dysplasia. *Semin.Perinatol.* 2006; 30: 179-84

55. Cordero L, Ayers LW, Davis K: Neonatal airway colonization with gram-negative bacilli: association with severity of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr.Infect.Dis.J.* 1997; 16: 18-23
56. Crapo JD, Peters-Golden M, Marsh-Salin J, Shelburne JS: Pathologic changes in the lungs of oxygen-adapted rats: a morphometric analysis. *Lab Invest* 1978; 39: 640-53
57. D'Angio CT, Finkelstein JN, LoMonaco MB, Paxhia A, Wright SA, Baggs RB, Notter RH, Ryan RM: Changes in surfactant protein gene expression in a neonatal rabbit model of hyperoxia-induced fibrosis. *Am.J.Physiol* 1997; 272: L720-L730
58. Danan C, Franco ML, Jarreau PH, Dassieu G, Chailley-Heu B, Bourbon J, Delacourt C: High concentrations of keratinocyte growth factor in airways of premature infants predicted absence of bronchopulmonary dysplasia. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2002; 165: 1384-7
59. Dani C, Bertini G, Pezzati M, Filippi L, Cecchi A, Rubaltelli FF: Inhaled nitric oxide in very preterm infants with severe respiratory distress syndrome. *Acta Paediatr.* 2006; 95: 1116-23
60. Darlow BA, Graham PJ: Vitamin A supplementation for preventing morbidity and mortality in very low birthweight infants. *Cochrane.Database.Syst.Rev.* 2002; CD000501
61. de Meer K, Westerterp KR, Houwen RH, Brouwers HA, Berger R, Okken A: Total energy expenditure in infants with bronchopulmonary dysplasia is associated with respiratory status. *Eur.J.Pediatr.* 1997; 156: 299-304
62. Dreyfuss D, Saumon G: Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 1998; 157: 294-323
63. Dukelow AM, Weicker S, Karachi TA, Razavi HM, McCormack DG, Joseph MG, Mehta S: Effects of nebulized diethylenetetraamine-NONOate in a mouse model of acute *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Chest* 2002; 122: 2127-36
64. Ehrenkranz RA, Ablow RC, Warshaw JB: Prevention of bronchopulmonary dysplasia with vitamin E administration during the acute stages of respiratory distress syndrome. *J.Pediatr.* 1979; 95: 873-8
65. Ehrenkranz RA, Ablow RC, Warshaw JB: Effect of vitamin E on the development of oxygen-induced lung injury in neonates. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1982; 393: 452-66
66. Ehrenkranz RA, Bonta BW, Ablow RC, Warshaw JB: Amelioration of bronchopulmonary dysplasia after vitamin E administration. A preliminary report. *N.Engl.J.Med.* 1978; 299: 564-9
67. Ehrenkranz RA, Walsh MC, Vohr BR, Jobe AH, Wright LL, Fanaroff AA, Wrage LA, Poole K: Validation of the National Institutes of Health consensus definition of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics* 2005; 116: 1353-60

68. Ehrenkranz, R. A. and Warshaw, J. B. Chronic lung disease in the newborn. In: Stern L, editor. *Diagnosis and management of respiratory disorders in the newborn*. Menlo Park, CA. 84-109. 1983. Addison Wesley.
69. Ellsbury DL, Acarregui MJ, McGuinness GA, Klein JM: Variability in the use of supplemental oxygen for bronchopulmonary dysplasia. *J.Pediatr.* 2002; 140: 247-9
70. Evgenov OV, Pacher P, Schmidt PM, Hasko G, Schmidt HH, Stasch JP: NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat.Rev.Drug Discov.* 2006; 5: 755-68
71. Feelisch M: The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 1998; 358: 113-22
72. Fenton AC, Annich G, Mason E, Solimano A, Field DJ: Chronic lung disease following neonatal ventilation. I. incidence in two geographically defined populations. *Pediatr.Pulmonol.* 1996; 21: 20-3
73. Fenton AC, Mason E, Clarke M, Field DJ: Chronic lung disease following neonatal ventilation. II. Changing incidence in a geographically defined population. *Pediatr.Pulmonol.* 1996; 21: 24-7
74. Field D, Elbourne D, Truesdale A, Grieve R, Hardy P, Fenton AC, Subhedar N, Ahluwalia J, Halliday HL, Stocks J, Tomlin K, Normand C: Neonatal Ventilation With Inhaled Nitric Oxide Versus Ventilatory Support Without Inhaled Nitric Oxide for Preterm Infants With Severe Respiratory Failure: the INNOVO multicentre randomised controlled trial (ISRCTN 17821339). *Pediatrics* 2005; 115: 926-36
75. Filippone M, Sartor M, Zacchello F, Baraldi E: Flow limitation in infants with bronchopulmonary dysplasia and respiratory function at school age. *Lancet* 2003; 361: 753-4
76. Fouron JC, Le Guennec JC, Villemant D, Perreault G, Davignon A: Value of echocardiography in assessing the outcome of bronchopulmonary dysplasia of the newborn. *Pediatrics* 1980; 65: 529-35
77. Fowlie PW, Davis PG: Prophylactic intravenous indomethacin for preventing mortality and morbidity in preterm infants. *Cochrane.Database.Syst.Rev.* 2002; CD000174
78. Francoe M, Troncy E, Blaise G: Inhaled nitric oxide: technical aspects of administration and monitoring. *Crit Care Med.* 1998; 26: 782-96
79. Frank L, Sosenko IR: Undernutrition as a major contributing factor in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1988; 138: 725-9
80. George TN, Johnson KJ, Bates JN, Segar JL: The effect of inhaled nitric oxide therapy on bleeding time and platelet aggregation in neonates. *J.Pediatr.* 1998; 132: 731-4
81. Ghofrani HA, Osterloh IH, Grimminger F: Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond. *Nat.Rev.Drug Discov.* 2006; 5: 689-702

82. Goldman SL, Gerhardt T, Sonni R, Feller R, Hehre D, Tapia JL, Bancalari E: Early prediction of chronic lung disease by pulmonary function testing. *J.Pediatr.* 1983; 102: 613-7
83. Gomez R, Romero R, Ghezzi F, Yoon BH, Mazor M, Berry SM: The fetal inflammatory response syndrome. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 1998; 179: 194-202
84. Gonzalez A, Sosenko IR, Chandar J, Hummler H, Claire N, Bancalari E: Influence of infection on patent ductus arteriosus and chronic lung disease in premature infants weighing 1000 grams or less. *J.Pediatr.* 1996; 128: 470-8
85. Gortner L, Hilgendorff A, Bahner T, Ebsen M, Reiss I, Rudloff S: Hypoxia-induced intrauterine growth retardation: effects on pulmonary development and surfactant protein transcription. *Biol.Neonate* 2005; 88: 129-35
86. Gortner L, Wauer RR, Stock GJ, Reiter HL, Reiss I, Jorch G, Hentschel R, Hieronimi G: Neonatal outcome in small for gestational age infants: do they really better? *J.Perinat.Med.* 1999; 27: 484-9
87. Greenough A: Measuring respiratory outcome. *Semin.Neonatol.* 2000; 5: 119-26
88. Greenough A, Alexander J, Burgess S, Chetcuti PA, Cox S, Lenney W, Turnbull F, Shaw NJ, Woods A, Boorman J, Coles S, Turner J: Home oxygen status and rehospitalisation and primary care requirements of infants with chronic lung disease. *Arch.Dis.Child* 2002; 86: 40-3
89. Greenough A, Alexander J, Burgess S, Chetcuti PA, Cox S, Lenney W, Turnbull F, Shaw NJ, Woods A, Boorman J, Coles S, Turner J: High versus restricted use of home oxygen therapy, health care utilisation and the cost of care in chronic lung disease infants. *Eur.J.Pediatr.* 2004; 163: 292-6
90. Greenough A, Cox S, Alexander J, Lenney W, Turnbull F, Burgess S, Chetcuti PA, Shaw NJ, Woods A, Boorman J, Coles S, Turner J: Health care utilisation of infants with chronic lung disease, related to hospitalisation for RSV infection. *Arch.Dis.Child* 2001; 85: 463-8
91. Greenough A, Kavvadia V, Johnson AH, Calvert S, Peacock J, Karani J: A simple chest radiograph score to predict chronic lung disease in prematurely born infants. *Br.J.Radiol.* 1999; 72: 530-3
92. Groneck P, Goetze-Speer B, Speer CP: Inflammatory bronchopulmonary response of preterm infants with microbial colonisation of the airways at birth. *Arch.Dis.Child Fetal Neonatal Ed* 1996; 74: F51-F55
93. Groneck P, Schmale J, Soditt V, Stutzer H, Gotze-Speer B, Speer CP: Bronchoalveolar inflammation following airway infection in preterm infants with chronic lung disease. *Pediatr.Pulmonol.* 2001; 31: 331-8
94. Groneck P, Speer CP: [Pharmacological prophylaxis and treatment of bronchopulmonary dysplasia]. *Z.Geburtshilfe Neonatol.* 2005; 209: 119-27

95. Grover TR: The diverse role of inhaled nitric oxide in experimental BPD: reduced fibrin deposition and improved lung growth. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2007; 293: L33-L34
96. Gutierrez HH, Nieves B, Chumley P, Rivera A, Freeman BA: Nitric oxide regulation of superoxide-dependent lung injury: oxidant-protective actions of endogenously produced and exogenously administered nitric oxide. *Free Radic.Biol.Med.* 1996; 21: 43-52
97. Halliday HL, Dumpit FM, Brady JP: Effects of inspired oxygen on echocardiographic assessment of pulmonary vascular resistance and myocardial contractility in bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics* 1980; 65: 536-40
98. Hallman M, Bry K, Hoppu K, Lappi M, Pohjavuori M: Inositol supplementation in premature infants with respiratory distress syndrome. *N.Engl.J.Med.* 1992; 326: 1233-9
99. Hallman M, Haataja R: Genetic influences and neonatal lung disease. *Semin.Neonatol.* 2003; 8: 19-27
100. Hallman M, Haataja R: Surfactant protein polymorphisms and neonatal lung disease. *Semin.Perinatol.* 2006; 30: 350-61
101. Han RN, Babaei S, Robb M, Lee T, Ridsdale R, Ackerley C, Post M, Stewart DJ: Defective lung vascular development and fatal respiratory distress in endothelial NO synthase-deficient mice: a model of alveolar capillary dysplasia? *Circ.Res.* 2004; 94: 1115-23
102. Han RN, Buch S, Tseu I, Young J, Christie NA, Frndova H, Lye SJ, Post M, Tanswell AK: Changes in structure, mechanics, and insulin-like growth factor-related gene expression in the lungs of newborn rats exposed to air or 60% oxygen. *Pediatr.Res.* 1996; 39: 921-9
103. Hascoet JM, Fresson J, Claris O, Hamon I, Lombet J, Liska A, Cantagrel S, Al Hosri J, Thiriez G, Valdes V, Vittu G, Egreteau L, Henrot A, Buchweiller MC, Onody P: The safety and efficacy of nitric oxide therapy in premature infants. *J.Pediatr.* 2005; 146: 318-23
104. Hilgendorff A, Reiss I, Thul J, Alzen G, Gortner L: [Wilson-Mikity syndrome as a cause of respiratory insufficiency of prematurity.]. *Klin.Padiatr.* 2000; 212: 318-9
105. Hirasaki A, Jones KA, Perkins WJ, Warner DO: Use of nitric oxide-nucleophile adducts as biological sources of nitric oxide: effects on airway smooth muscle. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1996; 278: 1269-75
106. Hislop AA, Wigglesworth JS, Desai R: Alveolar development in the human fetus and infant. *Early Hum.Dev.* 1986; 13: 1-11
107. 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: 147-64
108. Hodgman JE: Relationship between Wilson-Mikity syndrome and the new bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics* 2003; 112: 1414-5

109. Hodgman JE, Mikity VG, Tatter D, Cleland RS: Chronic respiratory distress in the premature infant. Wilson-Mikity syndrome. *Pediatrics* 1969; 44: 179-95
110. Hogman M, Frostell C, Arnberg H, Hedenstierna G: Bleeding time prolongation and NO inhalation. *Lancet* 1993; 341: 1664-5
111. Horbar JD, McAuliffe TL, Adler SM, Albersheim S, Cassady G, Edwards W, Jones R, Kattwinkel J, Kraybill EN, Krishnan V, .: Variability in 28-day outcomes for very low birth weight infants: an analysis of 11 neonatal intensive care units. *Pediatrics* 1988; 82: 554-9
112. Howlett A, Ohlsson A: Inositol for respiratory distress syndrome in preterm infants. *Cochrane.Database.Syst.Rev.* 2003; CD000366
113. Hrabie JA, Klose JR, Wink DA: New Nitric oxide-releasing zwitterions derived from polyamines. *J Org Chem* 1993; 58: 1472-6
114. Husain AN, Siddiqui NH, Stocker JT: Pathology of arrested acinar development in postsurfactant bronchopulmonary dysplasia. *Hum.Pathol.* 1998; 29: 710-7
115. Issa A, Lappalainen U, Kleinman M, Bry K, Hallman M: Inhaled nitric oxide decreases hyperoxia-induced surfactant abnormality in preterm rabbits. *Pediatr.Res.* 1999; 45: 247-54
116. Jobe AH: Severe BPD is decreasing. *J.Pediatr.* 2005; 146: A2
117. Jobe AH: Let's feed the preterm lung. *J.Pediatr.(Rio J.)* 2006; 82: 165-6
118. Jobe AH, Bancalari E: Bronchopulmonary dysplasia. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2001; 163: 1723-9
119. Jobe AJ: The new BPD: an arrest of lung development. *Pediatr.Res.* 1999; 46: 641-3
120. Jouvencel P, Fayon M, Choukroun ML, Carles D, Montaudon D, Dumas E, Begueret H, Marthan R: Montelukast does not protect against hyperoxia-induced inhibition of alveolarization in newborn rats. *Pediatr.Pulmonol.* 2003; 35: 446-51
121. Kinsella JP, Cutter GR, Walsh WF, Gerstmann DR, Bose CL, Hart C, Sekar KC, Auten RL, Bhutani VK, Gerdes JS, George TN, Southgate WM, Carriedo H, Couser RJ, Mammel MC, Hall DC, Pappagallo M, Sardesai S, Strain JD, Baier M, Abman SH: Early inhaled nitric oxide therapy in premature newborns with respiratory failure. *N.Engl.J.Med.* 2006; 355: 354-64
122. Kinsella JP, Greenough A, Abman SH: Bronchopulmonary dysplasia. *Lancet* 2006; 367: 1421-31
123. Kinsella JP, Ivy DD, Abman SH: Inhaled nitric oxide improves gas exchange and lowers pulmonary vascular resistance in severe experimental hyaline membrane disease. *Pediatr.Res.* 1994; 36: 402-8

124. Kinsella JP, Ivy DD, Abman SH: Ontogeny of NO activity and response to inhaled NO in the developing ovine pulmonary circulation. *Am.J.Physiol* 1994; 267: H1955-H1961
125. Kinsella JP, Neish SR, Shaffer E, Abman SH: Low-dose inhalation nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Lancet* 1992; 340: 819-20
126. Kinsella JP, Parker TA, Galan H, Sheridan BC, Halbower AC, Abman SH: Effects of inhaled nitric oxide on pulmonary edema and lung neutrophil accumulation in severe experimental hyaline membrane disease. *Pediatr.Res.* 1997; 41: 457-63
127. Kinsella JP, Truog WE, Walsh WF, Goldberg RN, Bancalari E, Mayock DE, Redding GJ, deLemos RA, Sardesai S, McCurnin DC, Moreland SG, Cutter GR, Abman SH: Randomized, multicenter trial of inhaled nitric oxide and high-frequency oscillatory ventilation in severe, persistent pulmonary hypertension of the newborn. *J.Pediatr.* 1997; 131: 55-62
128. Kinsella JP, Walsh WF, Bose CL, Gerstmann DR, Labella JJ, Sardesai S, Walsh-Sukys MC, McCaffrey MJ, Cornfield DN, Bhutani VK, Cutter GR, Baier M, Abman SH: Inhaled nitric oxide in premature neonates with severe hypoxaemic respiratory failure: a randomised controlled trial. *Lancet* 1999; 354: 1061-5
129. Kotecha S, Hodge R, Schaber JA, Miralles R, Silverman M, Grant WD: Pulmonary *Ureaplasma urealyticum* is associated with the development of acute lung inflammation and chronic lung disease in preterm infants. *Pediatr.Res.* 2004; 55: 61-8
130. Kotecha S, Wangoo A, Silverman M, Shaw RJ: Increase in the concentration of transforming growth factor beta-1 in bronchoalveolar lavage fluid before development of chronic lung disease of prematurity. *J.Pediatr.* 1996; 128: 464-9
131. Koumbourlis AC, Motoyama EK, Mutich RL, Mallory GB, Walczak SA, Fertal K: Longitudinal follow-up of lung function from childhood to adolescence in prematurely born patients with neonatal chronic lung disease. *Pediatr.Pulmonol.* 1996; 21: 28-34
132. Kovar J, Sly PD, Willet KE: Postnatal alveolar development of the rabbit. *J.Appl.Physiol* 2002; 93: 629-35
133. Kraybill EN, Runyan DK, Bose CL, Khan JH: Risk factors for chronic lung disease in infants with birth weights of 751 to 1000 grams. *J.Pediatr.* 1989; 115: 115-20
134. Krumenacker JS, Murad F: NO-cGMP signaling in development and stem cells. *Mol.Genet.Metab* 2006; 87: 311-4
135. Kumar VH, Lakshminrusimha S, El Abiad MT, Chess PR, Ryan RM: Growth factors in lung development. *Adv.Clin.Chem.* 2005; 40: 261-316
136. Kumar VH, Ryan RM: Growth factors in the fetal and neonatal lung. *Front Biosci.* 2004; 9: 464-80
137. Ladha F, Bonnet S, Eaton F, Hashimoto K, Korbitt G, Thebaud B: Sildenafil improves alveolar growth and pulmonary hypertension in hyperoxia-induced lung injury. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2005; 172: 750-6

138. Lal MK, Manktelow BN, Draper ES, Field DJ: Chronic lung disease of prematurity and intrauterine growth retardation: a population-based study. *Pediatrics* 2003; 111: 483-7
139. Lassus P, Heikkila P, Andersson LC, von Boguslawski K, Andersson S: Lower concentration of pulmonary hepatocyte growth factor is associated with more severe lung disease in preterm infants. *J.Pediatr.* 2003; 143: 199-202
140. Lassus P, Turanlahti M, Heikkila P, Andersson LC, Nupponen I, Sarnesto A, Andersson S: Pulmonary vascular endothelial growth factor and Flt-1 in fetuses, in acute and chronic lung disease, and in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2001; 164: 1981-7
141. Laughon MM, Simmons MA, Bose CL: Patency of the ductus arteriosus in the premature infant: is it pathologic? Should it be treated? *Curr.Opin.Pediatr.* 2004; 16: 146-51
142. Lecart C, Cayabyab R, Buckley S, Morrison J, Kwong KY, Warburton D, Ramanathan R, Jones CA, Mino P: Bioactive transforming growth factor-beta in the lungs of extremely low birthweight neonates predicts the need for home oxygen supplementation. *Biol.Neonate* 2000; 77: 217-23
143. Lemons JA, Bauer CR, Oh W, Korones SB, Papile LA, Stoll BJ, Verter J, Temprosa M, Wright LL, Ehrenkranz RA, Fanaroff AA, Stark A, Carlo W, Tyson JE, Donovan EF, Shankaran S, Stevenson DK: Very low birth weight outcomes of the National Institute of Child health and human development neonatal research network, January 1995 through December 1996. NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* 2001; 107: E1
144. Lin YJ, Markham NE, Balasubramaniam V, Tang JR, Maxey A, Kinsella JP, Abman SH: Inhaled nitric oxide enhances distal lung growth after exposure to hyperoxia in neonatal rats. *Pediatr.Res.* 2005; 58: 22-9
145. Lopez E, Boucherat O, Franco-Montoya ML, Bourbon JR, Delacourt C, Jarreau PH: Nitric oxide donor restores lung growth factor and receptor expression in hyperoxia-exposed rat pups. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 2006; 34: 738-45
146. Lowson SM: Inhaled alternatives to nitric oxide. *Anesthesiology* 2002; 96: 1504-13
147. Ludwin SK, Northway WH, Jr., Bensch KG: Oxygen toxicity in the newborn. Necrotizing bronchiolitis in mice exposed to 100 per cent oxygen. *Lab Invest* 1974; 31: 425-35
148. MacRitchie AN, Albertine KH, Sun J, Lei PS, Jensen SC, Freestone AA, Clair PM, Dahl MJ, Godfrey EA, Carlton DP, Bland RD: Reduced endothelial nitric oxide synthase in lungs of chronically ventilated preterm lambs. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2001; 281: L1011-L1020
149. Makri V, Hospes B, Stoll-Becker S, Borkhardt A, Gortner L: Polymorphisms of surfactant protein B encoding gene: modifiers of the course of neonatal respiratory distress syndrome? *Eur.J.Pediatr.* 2002; 161: 604-8

150. Manji JS, O'Kelly CJ, Leung WI, Olson DM: Timing of hyperoxic exposure during alveolarization influences damage mediated by leukotrienes. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2001; 281: L799-L806
151. 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
152. Marletta MA: Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 1994; 78: 927-30
153. Marshall DD, Kotelchuck M, Young TE, Bose CL, Kruyer L, O'Shea TM: Risk factors for chronic lung disease in the surfactant era: a North Carolina population-based study of very low birth weight infants. *North Carolina Neonatologists Association. Pediatrics* 1999; 104: 1345-50
154. Martin JA, Hamilton BE, Sutton PD, Ventura SJ, Menacker F, Kirmeyer S: Births: final data for 2004. *Natl.Vital Stat.Rep.* 2006; 55: 1-101
155. Mataloun MM, Rebello CM, Mascaretti RS, Dohlnikoff M, Leone CR: Pulmonary responses to nutritional restriction and hyperoxia in premature rabbits. *J.Pediatr.(Rio J.)* 2006; 82: 179-85
156. McAleese KA, Knapp MA, Rhodes TT: Financial and emotional cost of bronchopulmonary dysplasia. *Clin.Pediatr.(Phila)* 1993; 32: 393-400
157. McCurnin DC, Pierce RA, Chang LY, Gibson LL, Osborne-Lawrence S, Yoder BA, Kerecman JD, Albertine KH, Winter VT, Coalson JJ, Crapo JD, Grubb PH, Shaul PW: Inhaled NO improves early pulmonary function and modifies lung growth and elastin deposition in a baboon model of neonatal chronic lung disease. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2005; 288: L450-L459
158. McCurnin DC, Yoder BA, Coalson J, Grubb P, Kerecman J, Kupferschmid J, Breuer C, Siler-Khodr T, Shaul PW, Clyman R: Effect of ductus ligation on cardiopulmonary function in premature baboons. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2005; 172: 1569-74
159. Mercier JC, Lacaze T, Storme L, Roze JC, Dinh-Xuan AT, Dehan M: Disease-related response to inhaled nitric oxide in newborns with severe hypoxaemic respiratory failure. *French Paediatric Study Group of Inhaled NO. Eur.J.Pediatr.* 1998; 157: 747-52
160. Merritt TA, Cochrane CG, Holcomb K, Bohl B, Hallman M, Strayer D, Edwards DK, III, Gluck L: Elastase and alpha 1-proteinase inhibitor activity in tracheal aspirates during respiratory distress syndrome. Role of inflammation in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *J.Clin.Invest* 1983; 72: 656-66
161. Mestan KK, Marks JD, Hecox K, Huo D, Schreiber MD: Neurodevelopmental outcomes of premature infants treated with inhaled nitric oxide. *N.Engl.J.Med.* 2005; 353: 23-32
162. Monte LF, Silva Filho LV, Miyoshi MH, Rozov T: [Bronchopulmonary dysplasia]. *J.Pediatr.(Rio J.)* 2005; 81: 99-110

163. Mourani PM, Ivy DD, Gao D, Abman SH: Pulmonary vascular effects of inhaled nitric oxide and oxygen tension in bronchopulmonary dysplasia. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2004; 170: 1006-13
164. Moya MP, Gow AJ, McMahon TJ, Toone EJ, Cheifetz IM, Goldberg RN, Stamler JS: S-nitrosothiol repletion by an inhaled gas regulates pulmonary function. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2001; 98: 5792-7
165. Murad F: Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N.Engl.J.Med.* 2006; 355: 2003-11
166. Muscedere JG, Mullen JB, Gan K, Slutsky AS: Tidal ventilation at low airway pressures can augment lung injury. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 1994; 149: 1327-34
167. Northway WH, Jr., Rosan RC, Porter DY: Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease. Bronchopulmonary dysplasia. *N.Engl.J.Med.* 1967; 276: 357-68
168. O'Brodovich HM, Mellins RB: Bronchopulmonary dysplasia. Unresolved neonatal acute lung injury. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1985; 132: 694-709
169. Ogawa Y, Fujimura M, Goto A, Kawano T, Kondo T, Nakae N, Nishida A, Ohno T, Takeuchi Y, Togari H, .: Epidemiology of neonatal chronic lung disease in Japan. *Acta Paediatr.Jpn.* 1992; 34: 663-7
170. Ogden BE, Murphy S, Saunders GC, Johnson JD: Lung lavage of newborns with respiratory distress syndrome. Prolonged neutrophil influx is associated with bronchopulmonary dysplasia. *Chest* 1983; 83: 31S-3S
171. Oh W, Poindexter BB, Perritt R, Lemons JA, Bauer CR, Ehrenkranz RA, Stoll BJ, Poole K, Wright LL: Association between fluid intake and weight loss during the first ten days of life and risk of bronchopulmonary dysplasia in extremely low birth weight infants. *J.Pediatr.* 2005; 147: 786-90
172. Palta M, Gabbert D, Weinstein MR, Peters ME: Multivariate assessment of traditional risk factors for chronic lung disease in very low birth weight neonates. The Newborn Lung Project. *J.Pediatr.* 1991; 119: 285-92
173. Pappas CT, Obara H, Bensch KG, Northway WH, Jr.: Effect of prolonged exposure to 80% oxygen on the lung of the newborn mouse. *Lab Invest* 1983; 48: 735-48
174. Parker TA, Abman SH: The pulmonary circulation in bronchopulmonary dysplasia. *Semin.Neonatol.* 2003; 8: 51-61
175. Phillips ML, Hall TA, Sekar K, Tomey JL: Assessment of medical personnel exposure to nitrogen oxides during inhaled nitric oxide treatment of neonatal and pediatric patients. *Pediatrics* 1999; 104: 1095-100
176. Pierce RA, Albertine KH, Starcher BC, Bohnsack JF, Carlton DP, Bland RD: Chronic lung injury in preterm lambs: disordered pulmonary elastin deposition. *Am.J.Physiol* 1997; 272: L452-L460

177. Rehbinder C, Baneux P, Forbes D, van Herck H, Nicklas W, Rugaya Z, Winkler G: FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, gerbil, guinea pig and rabbit experimental units. Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) Working Group on Animal Health accepted by the FELASA Board of Management, November 1995. *Lab Anim* 1996; 30: 193-208
178. Reiss I, Landmann E, Heckmann M, Misselwitz B, Gortner L: Increased risk of bronchopulmonary dysplasia and increased mortality in very preterm infants being small for gestational age. *Arch.Gynecol.Obstet.* 2003; 269: 40-4
179. Roberts JD, Polaner DM, Lang P, Zapol WM: Inhaled nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Lancet* 1992; 340: 818-9
180. Roberts RJ, Weesner KM, Bucher JR: Oxygen-induced alterations in lung vascular development in the newborn rat. *Pediatr.Res.* 1983; 17: 368-75
181. Rojas MA, Gonzalez A, Bancalari E, Claire N, Poole C, Silva-Neto G: Changing trends in the epidemiology and pathogenesis of neonatal chronic lung disease. *J.Pediatr.* 1995; 126: 605-10
182. Saugstad OD: Oxidative stress in the newborn--a 30-year perspective. *Biol.Neonate* 2005; 88: 228-36
183. Schelonka RL, Katz B, Waites KB, Benjamin DK, Jr.: Critical appraisal of the role of Ureaplasma in the development of bronchopulmonary dysplasia with metaanalytic techniques. *Pediatr.Infect.Dis.J.* 2005; 24: 1033-9
184. Schindler U, Strobel H, Schonafinger K, Linz W, Lohn M, Martorana PA, Rutten H, Schindler PW, Busch AE, Sohn M, Topfer A, Pistorius A, Jannek C, Mulsch A: Biochemistry and pharmacology of novel anthranilic acid derivatives activating heme-oxidized soluble guanylyl cyclase. *Mol.Pharmacol.* 2006; 69: 1260-8
185. Schmidt B, Cao L, Mackensen-Haen S, Kendziorra H, Klingel K, Speer CP: Chorioamnionitis and inflammation of the fetal lung. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 2001; 185: 173-7
186. Schmidt B, Davis P, Moddemann D, Ohlsson A, Roberts RS, Saigal S, Solimano A, Vincer M, Wright LL: Long-term effects of indomethacin prophylaxis in extremely-low-birth-weight infants. *N.Engl.J.Med.* 2001; 344: 1966-72
187. Schmidt B, Roberts RS, Fanaroff A, Davis P, Kirpalani HM, Nwaesei C, Vincer M: Indomethacin prophylaxis, patent ductus arteriosus, and the risk of bronchopulmonary dysplasia: further analyses from the Trial of Indomethacin Prophylaxis in Preterms (TIPP). *J.Pediatr.* 2006; 148: 730-4
188. Schreiber MD, Gin-Mestan K, Marks JD, Huo D, Lee G, Srisuparp P: Inhaled nitric oxide in premature infants with the respiratory distress syndrome. *N.Engl.J.Med.* 2003; 349: 2099-107

189. Short EJ, Klein NK, Lewis BA, Fulton S, Eisengart S, Kerckmar C, Baley J, Singer LT: Cognitive and academic consequences of bronchopulmonary dysplasia and very low birth weight: 8-year-old outcomes. *Pediatrics* 2003; 112: e359
190. Siaplaouras J, Heckmann M, Reiss I, Schaible T, Waag KL, Gortner L: Lung volume reduction surgery in bronchopulmonary dysplasia. *Acta Paediatr.* 2003; 92: 754-6
191. Sime PJ, Marr RA, Gaudie D, Xing Z, Hewlett BR, Graham FL, Gaudie J: Transfer of tumor necrosis factor-alpha to rat lung induces severe pulmonary inflammation and patchy interstitial fibrogenesis with induction of transforming growth factor-beta1 and myofibroblasts. *Am.J.Pathol.* 1998; 153: 825-32
192. Skimming JW, Bender KA, Hutchison AA, Drummond WH: Nitric oxide inhalation in infants with respiratory distress syndrome. *J.Pediatr.* 1997; 130: 225-30
193. Smith VC, Zupancic JA, McCormick MC, Croen LA, Greene J, Escobar GJ, Richardson DK: Trends in severe bronchopulmonary dysplasia rates between 1994 and 2002. *J.Pediatr.* 2005; 146: 469-73
194. Speer CP: Inflammation and bronchopulmonary dysplasia. *Semin.Neonatol.* 2003; 8: 29-38
195. Speer CP: Inflammation and bronchopulmonary dysplasia: a continuing story. *Semin.Fetal Neonatal Med.* 2006; 11: 354-62
196. Stevenson DK, Wright LL, Lemons JA, Oh W, Korones SB, Papile LA, Bauer CR, Stoll BJ, Tyson JE, Shankaran S, Fanaroff AA, Donovan EF, Ehrenkranz RA, Verter J: Very low birth weight outcomes of the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, January 1993 through December 1994. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 1998; 179: 1632-9
197. Takemura T, Akamatsu H: Ultrastructural study on the pulmonary parenchyma of the neonates following prolonged mechanical ventilation. *Acta Pathol.Jpn.* 1987; 37: 1115-26
198. Tambunting F, Beharry KD, Waltzman J, Modanlou HD: Impaired lung vascular endothelial growth factor in extremely premature baboons developing bronchopulmonary dysplasia/chronic lung disease. *J.Investig.Med.* 2005; 53: 253-62
199. Tang JR, Markham NE, Lin YJ, McMurtry IF, Maxey A, Kinsella JP, Abman SH: Inhaled nitric oxide attenuates pulmonary hypertension and improves lung growth in infant rats after neonatal treatment with a VEGF receptor inhibitor. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2004; 287: L344-L351
200. ter Horst SA, Walther FJ, Poorthuis BJ, Hiemstra PS, Wagenaar GT: Inhaled nitric oxide attenuates pulmonary inflammation and fibrin deposition and prolongs survival in neonatal hyperoxic lung injury. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2007; 293: L35-L44
201. Thebaud B, Ladha F, Michelakis ED, Sawicka M, Thurston G, Eaton F, Hashimoto K, Harry G, Haromy A, Korbitt G, Archer SL: Vascular endothelial growth factor gene therapy increases survival, promotes lung angiogenesis, and prevents alveolar damage in

- hyperoxia-induced lung injury: evidence that angiogenesis participates in alveolarization. *Circulation* 2005; 112: 2477-86
202. Thomas M, Greenough A, Johnson A, Limb E, Marlow N, Peacock JL, Calvert S: Frequent wheeze at follow up of very preterm infants: which factors are predictive? *Arch.Dis.Child Fetal Neonatal Ed* 2003; 88: F329-F332
203. Thomas W, Speer CP: Management of infants with bronchopulmonary dysplasia in Germany. *Early Hum.Dev.* 2005; 81: 155-63
204. Thome U, Gotze-Speer B, Speer CP, Pohlandt F: Comparison of pulmonary inflammatory mediators in preterm infants treated with intermittent positive pressure ventilation or high frequency oscillatory ventilation. *Pediatr.Res.* 1998; 44: 330-7
205. Thurlbeck WM: Measurement of pulmonary emphysema. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1967; 95: 752-64
206. Thurlbeck WM: The internal surface area of nonemphysematous lungs. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1967; 95: 765-73
207. Todd DA, Jana A, John E: Chronic oxygen dependency in infants born at 24-32 weeks' gestation: the role of antenatal and neonatal factors. *J.Paediatr.Child Health* 1997; 33: 402-7
208. Tremblay L, Valenza F, Ribeiro SP, Li J, Slutsky AS: Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model. *J.Clin.Invest* 1997; 99: 944-52
209. Tsuchida S, Engelberts D, Roth M, McKerlie C, Post M, Kavanagh BP: Continuous positive airway pressure causes lung injury in a model of sepsis. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2005; 289: L554-L564
210. Turgut M, Basaran O, Cekmen M, Karatas F, Kurt A, Aygun AD: Oxidant and antioxidant levels in preterm newborns with idiopathic hyperbilirubinaemia. *J.Paediatr.Child Health* 2004; 40: 633-7
211. 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; 340: 1962-8
212. Van Lierde S, Cornelis A, Devlieger H, Moerman P, Lauweryns J, Eggermont E: Different patterns of pulmonary sequelae after hyaline membrane disease: heterogeneity of bronchopulmonary dysplasia? A clinicopathologic study. *Biol.Neonate* 1991; 60: 152-62
213. Van Meurs KP, Wright LL, Ehrenkranz RA, Lemons JA, Ball MB, Poole WK, Perritt R, Higgins RD, Oh W, Hudak ML, Laptook AR, Shankaran S, Finer NN, Carlo WA, Kennedy KA, Fridriksson JH, Steinhorn RH, Sokol GM, Konduri GG, Aschner JL, Stoll BJ, D'Angio CT, Stevenson DK: Inhaled nitric oxide for premature infants with severe respiratory failure. *N.Engl.J.Med.* 2005; 353: 13-22

214. Vernooij JH, Dentener MA, van Suylen RJ, Buurman WA, Wouters EF: Long-term intratracheal lipopolysaccharide exposure in mice results in chronic lung inflammation and persistent pathology. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 2002; 26: 152-9
215. Vohr BR, Wright LL, Poole WK, McDonald SA: Neurodevelopmental outcomes of extremely low birth weight infants <32 weeks' gestation between 1993 and 1998. *Pediatrics* 2005; 116: 635-43
216. Walker DK, Ackland MJ, James GC, Muirhead GJ, Rance DJ, Wastall P, Wright PA: Pharmacokinetics and metabolism of sildenafil in mouse, rat, rabbit, dog and man. *Xenobiotica* 1999; 29: 297-310
217. Walsh MC, Szeffler S, Davis J, Allen M, Van Marter L, Abman S, Blackmon L, Jobe A: Summary proceedings from the bronchopulmonary dysplasia group. *Pediatrics* 2006; 117: S52-S56
218. Walsh MC, Wilson-Costello D, Zadell A, Newman N, Fanaroff A: Safety, reliability, and validity of a physiologic definition of bronchopulmonary dysplasia. *J.Perinatol.* 2003; 23: 451-6
219. Walsh MC, Yao Q, Gettner P, Hale E, Collins M, Hensman A, Everette R, Peters N, Miller N, Muran G, Auten K, Newman N, Rowan G, Grisby C, Arnell K, Miller L, Ball B, McDavid G: Impact of a physiologic definition on bronchopulmonary dysplasia rates. *Pediatrics* 2004; 114: 1305-11
220. Walther FJ, Benders MJ, Leighton JO: Persistent pulmonary hypertension in premature neonates with severe respiratory distress syndrome. *Pediatrics* 1992; 90: 899-904
221. Wang EE, Matlow AG, Ohlsson A, Nelson SC: Ureaplasma urealyticum infections in the perinatal period. *Clin.Perinatol.* 1997; 24: 91-105
222. Warner BB, Stuart LA, Papes RA, Wispe JR: Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice. *Am.J.Physiol* 1998; 275: L110-L117
223. Watts JL, Milner R, Zipursky A, Paes B, Ling E, Gill G, Fletcher B, Rand C: Failure of supplementation with vitamin E to prevent bronchopulmonary dysplasia in infants less than 1,500 g birth weight. *Eur.Respir.J.* 1991; 4: 188-90
224. Weber B, Borkhardt A, Stoll-Becker S, Reiss I, Gortner L: Polymorphisms of surfactant protein A genes and the risk of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. *Turk.J.Pediatr.* 2000; 42: 181-5
225. Werthammer J, Brown ER, Neff RK, Taeusch HW, Jr.: Sudden infant death syndrome in infants with bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics* 1982; 69: 301-4
226. Wilson MG, Mikity VG: A new form of respiratory disease in premature infants. *Am.J.Dis.Child* 1960; 99: 489-99
227. Wolfson MR, Bhutani VK, Shaffer TH, Bowen FW, Jr.: Mechanics and energetics of breathing helium in infants with bronchopulmonary dysplasia. *J.Pediatr.* 1984; 104: 752-7

228. Yoder BA, Coalson JJ, Winter VT, Siler-Khodr T, Duffy LB, Cassell GH: Effects of antenatal colonization with ureaplasma urealyticum on pulmonary disease in the immature baboon. *Pediatr.Res.* 2003; 54: 797-807
229. Yoon BH, Romero R, Jun JK, Park KH, Park JD, Ghezzi F, Kim BI: Amniotic fluid cytokines (interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8) and the risk for the development of bronchopulmonary dysplasia. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 1997; 177: 825-30
230. Young SL, Evans K, Eu JP: Nitric oxide modulates branching morphogenesis in fetal rat lung explants. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2002; 282: L379-L385
231. Zhang R, Wang L, Zhang L, Chen J, Zhu Z, Zhang Z, Chopp M: Nitric oxide enhances angiogenesis via the synthesis of vascular endothelial growth factor and cGMP after stroke in the rat. *Circ.Res.* 2003; 92: 308-13
232. Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, Granger HJ, Bicknell R: Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J.Clin.Invest* 1997; 99: 2625-34
233. Zimmerman JJ: Bronchoalveolar inflammatory pathophysiology of bronchopulmonary dysplasia. *Clin.Perinatol.* 1995; 22: 429-56

8 Anhang

8.1 Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen

ANS	Atemnotsyndrom
A_{pc}	mittlerer prozentualer Luftanteil
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
cGMP	zyklisches Guanosin-3'-5'-monophosphat
CLD	chronic lung disease
CLDI	chronic lung disease of infancy
CPAP	continuous positive airway-pressure ventilation
CTGF	connective tissue growth factor
Deta-NONOate	Diethylenetetraamine-NONOate
ELBWI	extremely low birth weight infant
ENO	Ethylnitrit
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
FiO_2	inspiratorische Sauerstofffraktion
GC	Guanylatzyklase
GMP	Guanosinmonophosphat
GTC	Guanosintriphosphat
HFOV	high frequency oscillation ventilation
HGF	hepatocyte growth factor
HIFs	hypoxia-inducible factors
HMD	hyaline membrane disease
iNO	inhalatives Stickstoffmonoxid
i.p.	intraperitoneal
IPPV	intermittend positive pressure ventilation
IVH	intraventrikuläre Hämorrhagie
KG	Körpergewicht
KGF	keratinocyte growth factor
L_m	mittlere interalveoläre Distanz, mean linear intercept
MAS	Mekonium-Aspirations-Syndrom

n	Stichprobenanzahl
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
P	postnataler Lebensstag
PaCO ₂	arterieller CO ₂ -Partialdruck
PDA	persistierender Ductus arteriosus
PDE	Phosphodiesterase
PEEP	positive end-expiratory pressure
PEG	Polyethylenglykol
p.m.	post menstruationem
PMA	postmenstruelles Alter
PNA	postnatales Alter
ppm	parts per million
RDS	respiratory distress syndrome
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RSV	respiratory syncytial virus
S _t	mittlere Septendicke
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SGA	small for gestational age
sGC	soluble guanylatcyclase
SIDS	sudden infant death syndrome
SOD	Superoxiddismutase
SpO ₂	partielle Sauerstoffsättigung
TGF-β	transforming growth factor β
Uu	Ureaplasma urealytikum
VEGF	vascular endothelial growth factor
VLBWI	very low birth weight infant
WMS	Wilson-Mikity Syndrom

8.2 Curriculum Vitae

PERSÖNLICH

Name:	Martin <u>Alexander</u> Rühlmann
Geburtsdatum/-ort:	23.02.1980 in Duisburg
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Konfession:	römisch-katholisch

SCHULBILDUNG

1986-1990	Gemeinschaftsgrundschule Roetgen, Kreis Aachen
1990-1999	Privates Franziskus-Gymnasium Hürtgenwald-Vossenack, Kreis Düren Allgemeine Hochschulreife
1996-1997	New Trier Township High-School, Illinois, USA

WEHRDIENST

1999-2000	Sanitätssoldat in Eschweiler, Oldenburg und Aachen
-----------	--

HOCHSCHULSTUDIUM

2000-2006	Studium der Humanmedizin im vorklinischen und klinischen Abschnitt Justus-Liebig-Universität Giessen
09/2002	Ärztliche Vorprüfung
08/2003	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2005	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2005-2006	Praktisches Jahr Klinikum Bad Hersfeld Wahlfach: Pädiatrie
10/2006	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2006	Approbation als Arzt

ÄRZTLICHE TÄTIGKEIT

Seit 02/2007	Assistenzarzt Clementine Kinderhospital Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Frankfurt am Main
--------------	---

8.3 Danksagung

An dieser Stelle gilt mein Dank allen, die in den letzten Jahren durch ihre Mitarbeit und Unterstützung zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei meinem Doktorvater Herrn Priv. Doz. Dr. med. Irwin Reiss möchte ich mich ganz herzlich für die Anvertrauung des spannenden Projektes, sowie für die stets menschlich und fachlich hochwertige Betreuung dieser Arbeit bedanken. Durch die Einblicke, die er mir jenseits dieser Dissertation auch klinisch ermöglichte, wurde meine Motivation für die Kinderheilkunde weiter bestärkt.

Kein geringerer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ralph Theo Schermuly. Ohne seine stetige tatkräftige Unterstützung in allen Belangen dieser Arbeit, seine ständige Präsenz, Diskussions- und Hilfsbereitschaft wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Eine bessere Betreuung hätte ich mir nicht wünschen können.

Der Tierärztin meines Vertrauens Frau Silke Köbrich danke ich für die stets freundschaftliche und produktive Zusammenarbeit im Rahmen dieses Projektes. Ihr großer Einsatz und ihr Geschick im Umgang mit den Tieren haben entscheidenden Beitrag am Gelingen des praktischen Teils dieser Dissertation gehabt.

Meinem großen Bruder Sebastian danke ich für das Korrekturlesen und die vielen hilfreichen transatlantischen Ratschläge beim Erstellen dieser Arbeit.

Nicht zuletzt danke ich meinen lieben Eltern Christiane und Ulrich und meiner Marta für ihren Rückhalt, die Motivation, die Aufmunterungen und die uneingeschränkte Unterstützung in allen Lebenslagen. Ohne sie wäre diese Arbeit neben vielem Anderen niemals möglich gewesen.