

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Univ.-Professor Dr. med. Michael Zemlin

**Einfluss von Vitamin A auf die Bronchopulmonale Dysplasie
im Double-Hit Mausmodell**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2017

vorgelegt von: Lisanne Clara Michels

geb. am: 27.09.1989 in Cham

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

1. Betreuer: Univ.-Prof. Dr. med. Ludwig A. Gortner (Emeritus)

2. Betreuer: Dr. rer. nat. Dominik Monz

Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 4

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlichen und materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen.

Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe. Vor Aufnahme der vorstehenden Versicherung an Eides statt wurde ich über die Bedeutung einer eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

_____, den _____

Unterschrift der Promovierenden

_____, den _____

Unterschrift der die Versicherung an
Eides statt aufnehmenden Beamten

Für meine Eltern und
meine Oma

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	6
1 Zusammenfassung/ Summary.....	8
2 Einleitung.....	11
2.1 Die Bronchopulmonale Dysplasie.....	11
2.2 Definition und Klassifikation.....	13
2.3 Epidemiologie.....	13
2.4 Pathophysiologie und Pathogenese.....	14
2.5 Therapie und Prävention.....	16
2.6 Vitamin-A und BPD.....	18
2.7 Kandidatengene.....	18
2.7.1 TGF- β 1-3.....	19
2.7.2 IGF-1.....	19
2.7.3 VEGF.....	19
2.7.4 mTOR.....	20
2.7.5 TTF-1.....	20
2.7.6 Foxp3.....	20
2.8 Zytokine.....	21
2.9 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	22
3 Material und Methoden.....	23
3.1 Material.....	23
3.1.1 Geräte.....	23
3.1.2 Labormaterialien.....	24
3.1.3 Chemikalien und Kits.....	25
3.2 Methoden.....	27
3.2.1 Versuchstiere.....	27
3.2.1.1 Verwendetes Tiermodell.....	27
3.2.1.2 Messungen (Auxologie der Jungtiere).....	28
3.2.1.3 Versuchsdesign.....	28
3.2.2 RNA-Isolation.....	28
3.2.2.1 Methode.....	28
3.2.2.2 Durchführung.....	29
3.2.3 Messung der Konzentration der RNA im Photometer.....	30
3.2.3.1 Methode.....	30
3.2.3.2 Durchführung.....	30
3.2.4 Gelelektrophorese.....	31
3.2.4.1 Methode.....	31
3.2.4.2 Durchführung.....	31
3.2.5 DNA-Verdau der hergestellten RNA-Proben aus den Mäuselungen.....	31
3.2.5.1 Hintergrund und Methode.....	31
3.2.5.2 Durchführung.....	32
3.2.6 Umschreiben der RNA in cDNA.....	32
3.2.6.1 Methode.....	32
3.2.6.2 Durchführung.....	33
3.2.7 Qubit-Konzentrationsbestimmung.....	34
3.2.7.1 Methode.....	34
3.2.7.2 Durchführung.....	34
3.2.8 Real-Time-PCR.....	34
3.2.8.1 Das Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR).....	34

3.2.8.2 Das Prinzip der Real-Time-PCR (RT-PCR).....	36
3.2.8.3 Die ddCt-Methode.....	38
3.2.9 Zytokinbestimmung im Lungengewebe.....	39
3.2.9.1 Proteinisolierung.....	39
3.2.9.2 Zytokinmessung mittels Luminex-Verfahren.....	39
3.2.10 Statistische Auswertung.....	42
4 Ergebnisse.....	43
4.1 Versuch 1: <i>Auswirkung der Hypoxie/Hyperoxie auf die postnatale Lungenreifung und das körperliche Gedeihen im Double-Hit-Mausmodell sowie Einfluss von Vitamin A auf die genannten Faktoren</i>	43
4.1.1 Gewichtsentwicklung.....	43
4.1.2 Körperlänge.....	46
4.1.3 Fronto-okzipitaler Durchmesser.....	47
4.1.4 Lungengewicht.....	49
4.2 Versuch 2: <i>Einfluss von Vitamin-A auf die relative Genexpression verschiedener Gene an P14 im Double-Hit-Mausmodell</i>	52
4.3 Versuch 3: <i>Einfluss von Vitamin-A auf die Zytokinexpression an Lebenstag P14 im Double-Hit-Mausmodell</i>	53
5 Diskussion.....	57
5.1 Diskussion Mausmodell.....	57
5.1.1 Annahmen zur Vitamin-A-Therapie im Rahmen des Double-Hit Mausmodells.....	59
5.1.2 Mäuseauxologie.....	60
5.2 Veränderungen der Genexpression im Double-Hit-Modell.....	61
5.2.1 TGF- β 1-3.....	61
5.2.2 IGF-1.....	63
5.2.3 mTOR.....	63
5.2.4 TTF-1.....	64
5.2.5 VEGF.....	65
5.2.6 Foxp3.....	66
5.3 Zytokine.....	68
5.4 Schlussfolgerung.....	70
6 Literaturverzeichnis.....	71
7 Danksagung.....	84

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Analysis of Variance
ATRA	All-trans Retinolsäure
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
bzw.	beziehungsweise
CPAP	Continous positive airway pressure (Beatmungsverfahren)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary desoxyribonucleid acid)
Ct	Threshold Cycle
deion.	deionisiert
DEPC	Diethyldicarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleid acid)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EU	Europäische Union
FiO ₂	Fraction of inspired oxygen, Sauerstoffanteil der Umgebungsluft
Foxp3	Forkhead Box Protein P3
GA	Gestationsalter (gestational age)
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
IGF	Insulin like growth factor
IL	Interleukin
iNO	inhalativer Stickstoff
IU	Internationale Einheit (international unit)
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mTOR	Mammalian target of rapamycine
NaAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid

NICHD	Eunice Kennedy Shriver National Institutes of Child Health and Human Development
NIPPV	Nasal intermittent positive pressure ventilation
ORD	Office of Rare Diseases
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDA	Persistierender Ductus arteriosus
PMA	Postmenstrual age
RAR	Retinoic Acid Receptor
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleid acid)
RSV	Respiratory Syncytial Virus
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion oder Real-Time-PCR
RXR	Retinoic X Receptor
SSW	Schwangerschaftswoche
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
T(reg)	T-Regulations-Zellen
TTF	Thyroide transcription factor
UV	Ultraviolett
v.a.	vor allem
VEGF	Vascular endothelial growth factor

1 Zusammenfassung/ Summary

Trotz der therapeutischen Fortschritte in der Neonatologie stellt die Bronchopulmonale Dysplasie (BPD) auch heute noch eine Haupttodesursache bei Kindern mit einem Geburtsgewicht < 1000 g dar. Seit der Erstbeschreibung der BPD im Jahre 1967 haben sich die Definitionen und infolge die epidemiologischen Erhebungen sukzessive verändert und daher sind die Inzidenzraten bei dieser Erkrankung nur schwer vergleichbar. Die Pathogenese der BPD ist multifaktoriell bedingt. Sie zeichnet sich durch eine extreme Unreife der Lunge, Inflammationsreaktionen, Barotrauma sowie Sauerstofftoxizität aus. All diese Faktoren führen zu einer irreversiblen Veränderung der Lungenmorphologie und beinhalten ein hohes Risiko für pulmonale und neurologische Langzeitschäden.

Bisherige Behandlungskonzepte erbrachten noch keine wirklich befriedigenden Resultate hinsichtlich Maßnahmen zur Verhinderung einer BPD. Die experimentelle Datenlage zur Vitamin-A-Therapie scheint vielversprechend.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Einfluss von Vitamin-A auf die BPD zu untersuchen.

Hierzu wurde zunächst ein Double-Hit-Modell an Mäusen entwickelt, welches die pathogenetischen Zustände im Krankheitsbild der BPD möglichst genau widerspiegeln sollte: Eine pränatale Schädigungskomponente zur Induktion einer Wachstumsrestriktion (Sauerstoffanteil (FiO_2) = 0,1 für vier Tage) wurde kombiniert mit postnataler Hyperoxie (FiO_2 = 0,7 für zwei Wochen). Anhand von auxologischen Parametern, Genexpressionsanalysen (der Faktoren IGF-1, TGF- β 1-3, VEGF, mTOR, TTF-1, Foxp3) und Zytokinlevelbestimmung im Lungengewebe (IL-2 β , VEGF, TNF- α , IL-6 und IL-10) wurde der Einfluss von Vitamin-A auf die Lungenentwicklung im Double-Hit-Modell untersucht. Die Double-Hit-Tiere wurden dazu in zwei Gruppen eingeteilt. Die Zuweisung erfolgte zufällig. Eine Gruppe bekam entweder Vitamin-A in einer Trägersubstanz (n = 29), die andere nur die Trägersubstanz verabreicht (n = 34). Eine Kontrollgruppe (durchgehend Normoxie, keine Verabreichung von Vitamin-A oder Trägersubstanz) wurde einmalig zur besseren Vergleichbarkeit gehalten (n = 8). Sowohl die Normoxie-Gruppe, als auch die unbehandelte Double-Hit-Gruppe wurden als Kontrollgruppen gesehen.

In der behandelten und unbehandelten Double-Hit-Gruppe wurde im Vergleich zur Normoxie-Gruppe eine Verschlechterung der auxologischen Zielgrößen: Körpergewicht P1, Körpergewicht P14, Lungengewicht P14 festgestellt. Innerhalb der Double-Hit-Gruppen ergab sich eine nochmalige Verringerung der Zielgröße Körpergewicht an P1 in der mit Vitamin A behandelten Gruppe im Vergleich zur Placebo behandelten Gruppe.

Die Auswertung der Kandidatengene ergab für TGF- β 1 und - β 2 sowie IGF-1 eine vermehrte Expression in der behandelten und unbehandelten Double-Hit-Gruppe. Für TGF- β 3 zeigte sich nur in der behandelten Double-Hit-Gruppe eine vermehrte Expression. Die Auswertung der Zytokine ergab im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikante Änderung bei den Double-Hit-Tieren.

Summary: *Vitamin A in a double-hit model of bronchopulmonary dysplasia*

Despite therapeutical advances in neonatal and perinatal medicine, bronchopulmonary dysplasia (BPD) continues to be a major health problem in premature infants weighing less than 1000 g. Since its original description in 1967 the definition and thus the epidemiology of BPD has changed successively leading to difficulties in comparing incident rates.

Many factors are responsible for the pathogenesis of BPD: extremely immature lungs, toxicity of oxygen, mechanical injury and inflammation. All these factors result in an altered lung morphology and implicate a high risk for pulmonary and neurological long-term complications. Strategies in preventing BPD up to now seem only slightly promising. The experimental data concerning vitamin A therapy sound promising.

The aim of this study was to show the effect of vitamin A on BPD. For this we designed a double-hit model on rodents aiming to mirror the pathogenesis of BPD quite closely. A prenatal hit (10 % oxygen) to the dams in order to induce growth restriction was combined with a postnatal hit (70 % oxygen) to their offspring. Giving the auxological parameters, the expression of factors (IGF-1, TGF- β 1-3, VEGF, mTOR, TTF-1, Foxp3) and the cytokines (IL-2 β , VEGF, TNF α , IL-6 und IL-10), their influence on the morphogenesis of the lung in the double-hit model was tested. For that the dams were randomly divided into two groups receiving either vitamin A (n = 29) or using a vehicle (cotton seed oil) (n = 34) by intraperitoneal injection. For better comparison a normoxic group (normoxic conditions, no vitamin A or vehicle) was also tested (n = 8). Normoxic pups and sham treated double-hit pups served as control groups.

Double-hit mice showed growth restriction (in the parameters: Körpergewicht P1, Körpergewicht P14, Lungengewicht P14) compared to the normoxic group. However, vitamin A treated mice also showed growth restriction (in parameter Körpergewicht P1) when compared to the sham treated mice.

We demonstrated an upregulation in gene expression of TGF- β 1 and TGF- β 2, as well as IGF-1 in double-hit mice. For TGF- β 3, only vitamin A mice presented an upregulation in gene expression when compared to normoxic controls.

We found no significant changes in double-hit animals regarding the cytokine expression.

2 Einleitung

2.1 Die Bronchopulmonale Dysplasie

Die Bronchopulmonale Dysplasie (BPD) ist eine chronische Lungenerkrankung, die heute vor allem bei Frühgeborenen unter 28 Schwangerschaftswochen (SSW) auftritt (Jobe, 1999; Coalson, 2006). Durch die extreme Unreife der Lungen sind die Kinder auf künstliche und häufig sehr lange Beatmung mit Sauerstoff angewiesen. Kennzeichnend für die Pathologie sind ein unreifes Entwicklungsstadium der Lunge, Sauerstofftoxizität und Barotrauma (Jobe, 1999; Coalson, 2006). Dazu treten sowohl pränatale als auch postnatale Inflammationsreaktionen auf, die zu irreversiblen Veränderungen der Lungenmorphologie führen (Jobe, 1999; Coalson, 2006).

Das Krankheitsbild in seiner ursprünglichen Form wurde erstmals 1967 von William Northway beschrieben (Northway, Rosan & Porter, 1967). Diese sogenannte „klassische“ BPD betraf ursprünglich mäßig Frühgeborene (mittleres Gestationsalter (GA): 33. vollendete SSW), die aus heutiger Sicht verhältnismäßig aggressiven Beatmungsmethoden ausgesetzt waren. Diese „klassische“ Form zeichnet sich durch diffuse Schädigung der Atemwege, Hypertrophie der glatten Muskulatur, neutrophile Inflammation und interstitielle Fibrose aus (O’Brodivich & Mellins, 1985; Baraldi & Filippone, 2007).

Die betroffenen Kinder litten an schwerem Atemversagen, nicht selten entwickelten sie ein Cor pulmonale. Etwa 59 % verstarben an den Folgen (Northway, Rosan & Porter, 1967; Jain & Bancalari, 2014).

Mit der Einführung von pränataler Cortisontherapie, Surfactantgabe, neuen Beatmungskonzepten, medikamentöser Therapie und verbesserter Ernährung wurden große Erfolge in der Prävention der „klassischen“ BPD erzielt (Jobe, 1999; Baraldi & Filippone, 2007; Gien & Kinsella, 2011). Trotz dieser Therapie-Fortschritte hat sich die Inzidenz der BPD kaum verändert und stellt heute immer noch eine der Haupttodesursachen von Frühgeborenen dar (Ehrenkranz et al., 2005; Smith et al., 2005). Denn immer mehr extrem kleine (< 1000 g) und extrem unreife Frühgeborene (< 27 vollendete SSW) überleben aufgrund fortgeschrittener Behandlungsmethoden (Kinsella, Greenough & Abman, 2006; Baraldi & Filippone, 2007). Wenn diese Kinder geboren werden, befinden sich die Lungen in der kanalikulären Phase, einem Stadium kurz vor der Alveolarisation (Baraldi & Filippone, 2007). Das Krankheitsbild verschiebt sich hier morphologisch auf eine frühere Stufe der Lungenentwicklung. Die Charakteristika dieser „neuen“ Form der BPD im Vergleich zur „alten“ BPD sind eine verminderte Komplexität im Aufbau der Lunge, eine gestörte Alveolarisation (geringere Anzahl an Alveolen mit größerem Durchmesser) und eine abnorme pulmonale

Gefäßmorphologie (Husain, Siddiqui & Stocker, 1998; Coalson, 2006). Aufgrund dieser pathologischen Gegebenheiten wird der Gasaustausch erheblich eingeschränkt (Ozer et al., 2005; Thébaud & Abman, 2007).

Bei diesen Kindern zeigt sich meist ein mild ausgeprägtes Atemnotsyndrom. Der Beatmungs- und Sauerstoffbedarf ist anfangs mäßig. Jedoch ist die noch erheblich unterentwickelte Lunge anfällig für diverse Noxen und damit prädisponiert für Inflammationsreaktionen. Infolgedessen kann sich nach der ersten Lebenswoche eine progrediente Verschlechterung der Lungenfunktion entwickeln und eine BPD ausbilden (Jobe, 1999; Baraldi & Filippone, 2007).

Tabelle Nr. 1: Unterschiede der Pathophysiologie der „klassischen“ und „neuen“ Form der BPD; nach Gien & Kinsella 2011

	Klassische BPD	Neue BPD
Krankheitsbild	Atelektasen mit Hyperinflation	Weniger regionale Heterogenität als bei der klassischen Form
Respirationstrakt	Läsionen des Respirationstraktes	Kaum bis milde Läsionen des Respirationstraktes
Glatte Muskulatur	Hyperplasie der glatten Muskulatur	Moderate Hyperplasie der glatten Muskulatur
Interstitielle Fibrosierung	Starke interstitielle Fibrosierung	Weniger interstitielle Fibrosierung als bei der klassischen Form der BPD
Angiogenese	Umbau der pulmonalen Gefäße aufgrund von Hypertension	Weniger Gefäße als bei der klassischen Form, dafür dysmorphe Gefäße
Alveolarisation	Im Vergleich zu gesunden Kindern weniger Alveolarisation und weniger Surfactant-Gebiete	Weniger, größere und einfacher gebaute Alveolen als bei der klassischen Form

Für Frühgeborene mit BPD zeigt sich im Langzeitverlauf eine beträchtliche Hospitalisierungsrate. Diese liegt im ersten Lebensjahr bei 47 % (Lamarche-Vadel et al., 2004). Mitunter verantwortlich hierfür ist das häufige Auftreten der pulmonalen Hypertonie (25-37 % der BPD-Erkrankten) (Berkelhamer, Mestan & Steinhorn, 2013; Bhat et al., 2012). Im Jugendalter fallen die ehemals betroffenen Frühgeborenen durch vermehrte Lungenfunktionsstörungen auf wie z.B. eine bronchiale Hyperreagibilität oder eine Obstruktion der Atemwege. Wachstumsstörungen sowie eine eingeschränkte Leistungsfähigkeit sind weitere Langzeitschäden, die mit BPD assoziiert sind (Jensen & Schmidt, 2014).

2.2 Definition und Klassifikation

Die BPD wurde 1967 durch Northway beschrieben. Anhand von klinischen Symptomen sowie radiologischen Veränderungen des Thorax-Röntgenbildes der Frühgeborenen definierte er das Krankheitsbild. In seine Untersuchungen waren vor allem Frühgeborene nach der 31. vollendeten SSW einbezogen, mit einem durchschnittlichen Gewicht von 2200 g (Northway, Rosan & Porter 1967). Fortschritte in den Behandlungsmethoden führten zu verbesserten Überlebensraten, auch bei noch jüngeren Frühgeborenen mit weit geringerem Geburtsgewicht. Demzufolge wurde die Definition der BPD kontinuierlich erweitert (Stroustrup & Trasande, 2010). Bancalari und Mitarbeiter forderten 1979 die BPD sei dann zu diagnostizieren, sobald die Sauerstoffzufuhr länger als 28 Tage post partum notwendig wurde (Bancalari et al., 1979). Etwa 10 Jahre später empfahlen Shennan und Mitarbeiter einen angemesseneren Vorhersageparameter der BPD, solange die Notwendigkeit einer maschinellen Beatmung mehr als 36 Wochen postmenstruellen Alters (PMA) dauere (Shennan et al., 1988).

Im Jahr 2001 wurde vom Eunice Kennedy Shriver National Institutes of Child Health and Human Development (NICHD) wie auch vom Office of Rare Diseases (ORD) die noch heute gültige Definition der BPD festgelegt (Jobe & Bancalari, 2001; Jensen & Schmidt, 2014). Danach wird bei Kindern im Alter von 36 Wochen PMA die Diagnose BPD dann gestellt, wenn sie mit einem GA von < 32 Wochen geboren werden und daraufhin für länger als 28 Tage Sauerstoff benötigen (Jobe & Bancalari, 2001). Die BPD lässt sich anhand der aktuellen Definition in drei Schweregrade einteilen:

- Grad I (mild: kein erhöhter Sauerstoffbedarf mehr notwendig mit 36 PMA),
- Grad II (moderat: weniger als 30 % Sauerstoff in der Atemluft notwendig mit 36 PMA) und
- Grad III (schwer: mehr als 30 % Sauerstoff bzw. Beatmung mittels CPAP notwendig) (Jobe & Bancalari, 2001).

Radiologische Veränderungen werden heute nicht mehr berücksichtigt, da diese oft fehlinterpretiert werden (Jobe & Bancalari, 2001).

2.3 Epidemiologie

In den letzten 50 Jahren sind eine Vielzahl von Definitionen der BPD mit unterschiedlichen Ein- bzw. Ausschlusskriterien vorgelegt worden. Aussagen über Fallzahlen oder gar Vergleiche von Zahlen aus Jahren, die qualitativ unterschiedliche Behandlungsstandards implizieren, können nur eine eingeschränkte Gültigkeit beigemessen werden (Baraldi & Filippone, 2007). Die große

Divergenz der Werte, die in der Literatur berichtet werden, ist typisch für diese Sachverhalte. Des Weiteren sind heterogene Patientenkohorten, unterschiedliche Behandlungsmethoden der einzelnen Krankenhäuser und das Gestationsalter der untersuchten Kinder zu berücksichtigen (Bancalari, Claire & Sosenko, 2003; Van Marter, 2009). Dadurch sind die Zahlen des NICHD vorsichtig zu interpretieren: Sie beschreiben, dass die Inzidenzen der BPD in den letzten zwei bis drei Jahrzehnten stabil blieben, allenfalls leicht anstiegen (Fanaroff et al., 2007; Jensen & Schmidt, 2014). Mitbedacht werden muss die Tatsache, dass die Überlebenschancen für immer mehr extrem unreife Frühgeborene steigen (Fanaroff et al., 2007; Van Marter, 2009; Jensen & Schmidt, 2014). Die heutigen Angaben zu Inzidenzzahlen beziehen sich alle auf die Definition der BPD des zusätzlichen Sauerstoffbedarfs nach 36 Wochen PMA (Jobe, 2011).

Die anteilmäßig höchsten BPD-Fälle werden bei Frühgeborenen mit sehr geringem Geburtsgewicht und sehr niedrigem Gestationsalter gefunden (Van Marter, 2009; Gortner et al., 2011). Nach Fanaroff und Mitarbeitern ergeben sich – je nach Geburtsgewicht der Frühgeborenen - folgende Inzidenzraten:

- 57 % zwischen 501 g und 750 g,
- 31 % zwischen 751 g und 1000 g,
- 14 % zwischen 1001 g und 1250g und
- 6 % zwischen 1251 g und 1500 g (Fanaroff et al., 2007).

Das Vermont Oxford Network veröffentlichte zwischen 2000 und 2009 weltweit jährliche BPD-Raten von 26,2 % - 30,4 % bei Kindern mit Geburtsgewicht zwischen 501-1500 g (Horbar et al., 2012; Jensen & Schmidt, 2014).

In der Mosaic-Studie wurden für zehn Regionen in Europa Werte zwischen 10,2% (Italien) und 24,8 % (UK) gefunden (bezogen auf ein mittleres GA von 30 Wochen und mittleres Gewicht von 1250 g) (Gortner et al., 2011). In Deutschland wies man in einer früheren Studie Inzidenzraten von 29 % nach. Dies bezieht sich auf alle Frühgeborenen mit einem GA < 32 SSW (Thomas & Speer, 2005). Bei Frühgeborenen der vollendeten 25. und 26. SSW verzeichnete man im Geburtsjahrgang 2001 sogar Werte von 51 % (Thomas & Speer, 2005).

2.4 Pathophysiologie und Pathogenese

Die zentrale Struktur der Bronchopulmonalen Dysplasie ist die Lunge. Ihre Entwicklung wird in vier Stadien eingeteilt, die sich zeitlich überlappen. Sie beginnt mit der pseudogladulären Phase im Zeitraum der vollendeten 4.-16. SSW. Der Bronchialbaum zweigt sich hier auf bis zu den

Bronchioli terminales. Ab der vollendeten 15.-24. SSW schließt sich die kanalikuläre Phase an. Die Bronchioli terminales zweigen sich nun bis hin zu den Bronchioli respiratorii auf. Diese wiederum teilen sich auf in Ductus alveolares mit Alveolen. Ab der vollendeten 22. SSW folgt die sakkuläre Phase. Die Alveolen erhalten nun Kontakt zu den Kapillaren. Es bilden sich spezialisierte Alveolarepithelzellen. Die Lunge ist von da an beschränkt atmungsfähig. Während sich diese ersten drei Stadien normalerweise im Mutterleib vollziehen, also pränatal, beginnt die alveoläre Phase etwa um die Geburt. Es kommt nun zur starken Zunahme der Alveolenzahl sowie zur Differenzierung reifer Alveolen. Die alveoläre Phase dauert mehrere Jahre an, bis die Lungenentwicklung mit dem 8.-10. Lebensjahr endet (Hislop, 2002; Thébaud & Abman, 2007; Meller & Bhandari, 2012).

Die BPD zeichnet sich durch eine multifaktorielle Genese aus. Viele Faktoren tragen additiv zur Entstehung der Krankheit bei (Jobe & Bancalari, 2001). Frühgeburtlichkeit und geringes Geburtsgewicht verbunden mit einem gewissen Unreifeegrad der Lunge sind Voraussetzung für die Entstehung der BPD (Jensen & Schmidt, 2014). Je nach Gestationsalter ergibt sich eine große Variationsbreite in den anatomisch-strukturellen und den biochemischen pathologischen Zuständen der Lunge. Dies ist für die unterschiedlichen Ausprägungsformen der „alten“ und „neuen“ BPD wichtig. Als wichtige Ätiologiefaktoren der „alten“ BPD gelten vor allem Barotrauma und Sauerstofftoxizität (Jobe & Bancalari, 2001). Die sehr aggressiven Beatmungsmethoden und hohe Beatmungsdrücke verursachen in den ohnehin schon unreifen Lungenverhältnissen proinflammatorische Reaktionen. Dadurch wird die Entstehung von Sauerstoffradikalen begünstigt. Diese verursachen in den noch unreifen Lungen Schäden, da deren antioxidatives Enzymsystem zum Abfangen der Radikale unzureichend ausgebildet ist (Gien & Kinsella, 2011; Vogelsang et al., 2009). Das Resultat sind strukturelle Umbauvorgänge. Verbesserte Beatmungsmethoden (CPAP) haben jedoch das Risiko der Entstehung der durch Baro- und Volutrauma verursachten „alten“ BPD gesenkt (Jobe, 1999; Baraldi & Filippone, 2007; Gien & Kinsella, 2011).

Die Beatmungs- und Sauerstofftherapie spielt auch bei der „neuen“ BPD immer noch eine zentrale Rolle. Hinzu kommen weitere Faktoren, die erst im Laufe der Zeit entdeckt wurden. Fetale Inflammationsreaktionen scheinen eine mögliche Rolle in der Entstehung der BPD zu spielen (Lahra, Beeby & Jeffery, 2009; Thomas & Speer, 2014; Bry, Hogmalm & Bäckström, 2010). Viel diskutiert wird in diesem Zusammenhang die Chorioamnionitis (Lacaze-Masmonteil, 2014; Kent & Dahlstrom, 2004; Thomas & Speer, 2014). Womöglich kommt es hierbei noch während der Fetalperiode zum Übertritt von schädigenden Endotoxinen in die Lunge der Feten, die eine Entstehung der BPD begünstigen können (Thomas & Speer, 2014; Jensen & Schmidt, 2014). Die aktuelle Datenlage dazu ist jedoch sehr uneinheitlich (Lacaze-Masmonteil, 2014). Nicht nur

pränatale Inflammationsreaktionen, sondern auch postnatale Sepsis und Inflammationen werden als Risikofaktor für die Entstehung der BPD angenommen (Lahra, Beeby & Jeffery, 2009). In den Lungen der Frühgeborenen werden erhöhte Konzentrationen an proinflammatorischen und chemotaktischen Faktoren gemessen. Bekannt sind hier vor allem TNF- α , IL-1 β , IL-6, und IL-8 (Jobe, 1999; Bry & Lappalainen, 2006; Yoon et al., 1997; Ambalavanan et al., 2009). Geringere Konzentrationen findet man an protektiven Faktoren wie Vitamin A und IL-10 (Vogelsang et al., 2009; Oei et al., 2002; Rocha et al., 2012). Dieses Ungleichgewicht proinflammatorischer und antiinflammatorischer Mediatoren trägt wesentlich zur Entstehung der BPD bei (Rocha et al., 2012). Die andauernde Inflammationsreaktion führt zu verminderter Alveolarisation und abnormer Gefäßmorphologie, welche den Gasaustausch nachteilig beeinflussen (Cornell et al., 2010; Jensen & Schmidt, 2014).

Des Weiteren gibt es einen Zusammenhang zwischen einem offenen Ductus arteriosus Botalli (PDA) und der BPD (Benitz, 2012; Chock et al., 2014). Bei fast allen Frühgeborenen findet man einen PDA. Der hierbei entstehende Links-Rechts-Shunt am Herzen führt zu vermehrter Lungendurchblutung und kann so die Ausbildung eines Lungenödems begünstigen. Der hohe Flüssigkeitsanteil und die damit einhergehende Druckerhöhung in der Lunge beeinflusst die Entstehung einer BPD ungünstig (Brown et al., 1978; Bancalari, Claure & Sosenko, 2003).

Frühgeborene haben außerdem ein erhöhtes Risiko für gastroösophagealen Reflux und Mikroaspiration von Mageninhalt. In den Lungen der Betroffenen finden sich erhöhte Pepsin-Level. Die mit chronischer Aspiration einhergehenden Lungenschäden scheinen zur Entwicklung der BPD beizutragen (Farhath et al., 2008; Jensen & Schmidt, 2014). Zusätzlich dazu kann eine gewisse genetische Prädisposition in der Entstehung der BPD eine nicht unerhebliche Rolle spielen (Kwinta et al., 2008).

2.5 Therapie und Prävention

Zur Therapie und Prävention der BPD geht man heute nach verschiedenen Ansätzen vor. Alle zielen darauf diejenigen Faktoren, die zu einer Schädigung der Lunge und der Gefäßbildung beitragen könnten, zu verhindern, um eine möglichst normale Lungenentwicklung zu erreichen (Jain & Bancalari, 2014).

Wichtigstes Behandlungsziel zur Vermeidung der chronischen Hypoxämie und zur Sicherstellung des Gasaustausches ist eine adäquate Sauerstoff- und Beatmungstherapie. Noninvasive nasale Beatmung mittels CPAP (continuous positive airway pressure) oder NIPPV (nasal intermittent

positive pressure ventilation) stellt im Vergleich zur endotrachealen, invasiven mechanischen Beatmung eine bessere Alternative hinsichtlich des Krankheitsverlaufs dar (Avery et al., 1987).

Es gilt hierbei vor allem das für die Entstehung der BPD verantwortliche Baro- und Volutrauma zu vermeiden. Nach der aktuellen Leitlinie zur Sauerstofftherapie sollten bei den Frühgeborenen arterielle Sauerstoffsättigungen zwischen 90 und 95 % angestrebt werden (Thomas & Speer, 2005; Saugstad & Aune, 2014).

Ebenso wichtig ist das Management des Ernährungs- und Flüssigkeitshaushalts. Eine ausreichend hochkalorische Ernährung mit erhöhten Lipid- und Proteinanteil vermindert das Risiko, eine pulmonale Schädigung davonzutragen (Atkinson, 2001). Die Flüssigkeitszufuhr muss äußerst sorgfältig kontrolliert werden: Nimmt das Volumen überhand, dann kann ein PDA bestehen bleiben. Alle diese Faktoren können zur Entstehung der BPD beitragen (Bell & Acarregui, 2008; Jain & Bancalari, 2014).

Eine gemeinhin anerkannte Maßnahme zur Förderung der Lungenentwicklung für den Fall einer drohenden Frühgeburt ist die pränatale Gabe von Corticosteroiden, welche wesentlich die Surfactant-Produktion stimulieren (Jain & Bancalari, 2014). Surfactant ist ein Gemisch aus Phospholipiden und spezifischen Proteinen, welches verhindert, dass Alveolen kollabieren und somit noch am Gasaustausch teilnehmen können (Parra & Pérez-Gil, 2015). Die postnatale Gabe von Corticosteroiden wird dagegen kontrovers diskutiert. Sie vermindert zwar signifikant das Risiko einer BPD, indem sie Inflammationen, Lungenödeme und vaskuläre Permeabilität senkt, allerdings erhöht die Gabe das Risiko zerebraler Ereignisse, gastrointestinaler Blutungen, intestinaler Perforation, Hypertension und Hyperglykämien (Jain & Bancalari, 2014). Überlegungen der Behandler gehen nun dahin, ob man die Steroidtherapie erst zu einem späteren Zeitpunkt einsetzen soll, da dies die unerwünschten Wirkungen verringern würde (Halliday, Ehrenkranz & Doyle, 2009). Vom Ansatzpunkt vergleichbar mit der Steroidtherapie ist die direkte Behandlung mit Surfactant, die man insbesondere bei extrem Frühgeborenen wählt (Jain & Bancalari, 2014). Die medikamentöse Therapie bei BPD-Kindern umfasst Vasodilatoren und Diuretika (Thomas & Speer, 2005). Pulmonale Hypertension und Lungenödem sind sehr häufig assoziiert mit BPD und stellen einen großen Mortalitäts- sowie Morbiditätsfaktor dar (Berkelhamer, Mestan & Steinhorn, 2013; Bhat et al., 2012). Häufig werden Sildenafil und inhalativer Stickstoff (iNO) gegeben, um der pulmonalen Hypertension mit vasodilatatorischen Effekten entgegenzuwirken (ter Horst et al., 2007; Van Marter 2009). Diuretika wie Furosemid werden zur Reduktion des Lungenödems verwendet (Thomas & Speer, 2005; Jain & Bancalari, 2014). Die Studienlage zur Anwendung dieser Medikamente ist jedoch nicht evidenzbasiert, auch fehlen Daten zu langfristigen Ergebnissen nach Gabe der Medikamente bei den Kindern (Thomas & Speer, 2005).

Als bisher einzige Behandlungsmethode, die die Inzidenz der BPD signifikant verringert, gilt die (wiederholte) intramuskuläre Gabe von Vitamin-A (Tyson et al., 1999; Darlow & Graham, 2011). Angenommen wird, dass Vitamin-A und dessen Metaboliten eine wichtige Rolle in der Lungenentwicklung spielen (Esteban-Pretel et al., 2010; Shenai, Chytil & Stahlman, 1985). Des Weiteren tragen sie zur Reparation des respiratorischen Epithels nach Lungenschädigung bei und sind an der Gefäßentwicklung beteiligt (Ozer et al., 2005; Schmidt et al., 2012). Eine weitere wichtige Präventionsmaßnahme bei Kindern mit BPD ist die Impfung gegen Pertussis, Hämophilus influenzae und Pneumokokken. Ab dem 6. Lebensmonat sollte zusätzlich gegen Influenza geimpft werden. Empfohlen wird bei Kindern mit einer schweren Form der BPD dazu noch die passive Immunisierung gegen RSV im ersten Lebensjahr (Thomas & Speer, 2005).

2.6 Vitamin-A und BPD

Vitamin-A gehört zur Familie der lipophilen Vitamine. Es ist ein Sammelbegriff für mehrere chemische Verbindungen. Die biologisch aktive Form des Vitamin-A ist All-Trans-Retinolsäure (ATRA). Vitamin A ist ein wichtiger Regulator diverser biologischer Prozesse auf genetischer und zellulärer Ebene und ist dadurch in der Lage, die Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Apoptose zu regulieren. Dies wirkt sich auf den Stoffwechsel aus (Massaro & Massaro, 1996; Brun et al., 2013). Im Zusammenhang mit der Lungenentwicklung spielt Vitamin-A eine wichtige Rolle. Maternales Vitamin-A gelangt über die Plazenta in den fetalen Kreislauf und beteiligt sich hier vor allem an Septierungsvorgängen, Alveolarisation und der Surfactantproduktion (Jobe & Bancalari, 2001; Schmidt et al., 2012; Gadhia et al., 2014; Massaro & Massaro, 1996). Geringe Vitamin-A-Plasmakonzentrationen scheinen die Entstehung der Brochopulmonalen Dysplasie zu begünstigen (Mactier & Weaver, 2005). Die Substitution dieser Kinder mit Vitamin-A erbrachte einen Rückgang der BPD-Inzidenzraten (Tyson et al., 1999; Darlow & Graham, 2011). In einigen Tierstudien konnte gezeigt werden, dass die Vitamin-A Supplementation sich positiv auf pathologisch veränderte Lungenstrukturen auswirken kann (Londhe et al., 2013; Gonzalez-Reyes et al., 2006).

2.7 Kandidatengene

Die Gene TGF- β 1-3, IGF-1, VEGF, mTOR, TTF-1 und Foxp3 werden mit dem Auftreten der Bronchopulmonalen Dysplasie in Zusammenhang gebracht. Sie werden im Rahmen dieser Arbeit als Kandidatengene bezeichnet und im Folgenden genauer beschrieben:

2.7.1 TGF- β 1-3

Transforming growth factor (TGF- β) wird einer Familie von Genen zugerechnet, die in zahlreiche biologische Abläufe der Zelle involviert ist. Diese beinhalten vor allem Proliferation, Differenzierung, Migration, Adhäsion, Apoptose sowie Bildung der extrazellulären Matrix (Bartram & Speer, 2004). TGF- β besteht aus drei Isoformen: TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3. Während der Lungenentwicklung werden diese in verschiedenen Zellen exprimiert. Sie sind bedeutsam für Septierungsprozesse und damit für die Alveolarbildung (Schmid et al., 1991). Des Weiteren haben sie wichtige Funktionen in der Kontrolle von Gewebereparaturprozessen sowie der lokalen Immunmodulation (Bartram & Speer, 2004). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von TGF- β einen ähnlichen pathologischen Zustand wie den der BPD erzeugt (Bartram & Speer, 2004; Vicencio et al., 2004). Inflammationsprozesse sorgen dafür, dass TGF- β vermehrt gebildet wird, wodurch chemotaktisch vor allem Fibroblasten aktiviert werden. Es kommt dadurch zu strukturellen Veränderungen, die in schwerer Lungenfibrose resultieren können. Aus diesem Grund ist TGF- β ein verlässlicher Marker für die Aktivität von Reparatur- und Umbaumechanismen in der Lunge (Bartram & Speer 2004).

2.7.2 IGF-1

Der Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) wird in vielen Organen und Geweben während der Entwicklungsphase synthetisiert. Er spielt dabei eine wichtige Rolle in der Regulation von Wachstums-, Differenzierungs- aber auch Reparaturprozessen (Schuller et al., 1995; Chetty et al., 2004). IGF-1 ist während der Lungenentwicklung für das prä- und postnatale Wachstum bedeutsam und zeichnet sich durch die Bildung alveolärer und vaskulärer Strukturen aus (Nagata et al., 2007). Synthetisiert wird IGF-1 vor allem von Epithelzellen, mesenchymalen Zellen und Makrophagen. Die IGF-1-Expression wird durch bestimmte Wachstumsfaktoren sowie durch die Nahrungsgegebenheiten vor Ort reguliert. Zytokine und Oxidantien beeinflussen die Expression des IGF-1 und tragen neben Unterernährung und Wachstumshormonmangel zu vermindertem Wachstum bei. IGF-1 wird als wichtiger Mediator in der Pathogenese der BPD angenommen (Chetty et al., 2004).

2.7.3 VEGF

Der Vascular endothelial growth factor (VEGF) ist einer der wichtigsten Gefäß-Wachstumsfaktoren und unabdingbar für die Neoangiogenese (Abman, 2001). Eine relevante Rolle spielt VEGF nicht nur beim Wachstum der Gefäße, sondern auch beim Überleben der neu gebildeten

Gefäße sowie bei Gefäßumbauprozessen. Darüber hinaus werden für VEGF protektive Eigenschaften gegenüber Sauerstoff- bzw. zytokininduzierten Zellschäden angenommen (Ozer et al., 2005; Schmidt et al., 2012). Auch im Zusammenhang mit der Lungenentwicklung und hier vor allem mit der pulmonalen Gefäßentwicklung und Alveolarbildung ist VEGF bedeutend: Eine beeinträchtigte Entwicklung der Lunge, wie sie bei der BPD bekannt ist, scheint mit einer verminderten VEGF-Expression assoziiert zu sein (Lassus et al., 1999; Bhatt et al., 2001; Thébaud & Abman 2007; Hosford & Olson, 2003; Wang et al., 2007)

2.7.4 mTOR

Mammalian target of rapamycin (mTOR) ist ein Hauptregulator des Stoffwechsels, der Proliferation und der Motilität von Zellen. In Abhängigkeit von bestimmten Umweltreizen reguliert mTOR Stoffwechsel, Wachstum, Proliferation und Überleben von Zellen. Ist der mTOR-Signalweg gestört, können daraus zahlreiche proliferative und metabolische Krankheitsbilder wie Krebs, Adipositas und Typ-2 Diabetes resultieren (Goncharova, 2013). In neueren Studien wird mTOR eine wichtige Rolle im Fortschreiten von Krankheiten zugeschrieben, die mit chronischer Hypoxie einhergehen (Goncharova, 2013; Hwang & Kim, 2011; Wang et al., 2014) So zeichnet sich mTOR im Rahmen von Lungenerkrankungen vor allem durch Umbaumechanismen pulmonaler Gefäße aus (Goncharova, 2013; Krymskaya et al., 2011).

2.7.5 TTF-1

Thyroid transcription factor-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von Genen in der Schilddrüse, der Lunge und dem Gehirn reguliert. In der Lunge kommt TTF-1 vor allem in Epithelzellen vom Typ II vor. Hier trägt er bedeutend zur Epithelzell-Entwicklung des Respirationstraktes bei (Stahlman, Gray & Whitsett, 1996). Außerdem aktiviert TTF-1 die Expression von Surfactant Proteinen, indem er an die dafür vorgesehenen Gene bindet. Im Zusammenhang mit der BPD wurde gesehen, dass TTF-1 in Bereichen der Lungen fehlt, in denen es aufgrund der Krankheit zum Kollaps der Alveolen oder zu Inflammationsreaktionen gekommen ist (Stahlman, Gray & Whitsett, 1996).

2.7.6 Foxp3

Forkhead Box Protein P3 ist ein Transkriptionsfaktor, der in Zellkernen vorkommt und im Zusammenhang mit der Entwicklung und Differenzierung regulatorischer T-Zellen (CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen = T(reg)) steht (Kang et al., 2007; Kim, Rasmussen & Rudensky, 2007;

Ziegler, 2006). Es ist zudem der spezifische Marker für T(reg)-Zellen (Kim, Rasmussen & Rudensky, 2007; Fontenot, Gavin & Rudensky, 2003). Foxp3+T(reg)-Zellen sind wichtige Immunmodulatoren: Sie sind in der Lage das Immunsystem herunterzuregulieren, um so die Selbsttoleranz des Individuums zu regulieren (Ziegler, 2006; Tang & Bluestone, 2008). Wird Foxp3 nicht exprimiert, so kann dies zu schweren Autoimmunkrankheiten führen (Tang & Bluestone, 2008; Fontenot, Gavin & Rudensky 2003).

2.8 Zytokine

Zytokine sind kleine lösliche Peptide oder Glykoproteine, die von Leukozyten, Endothelzellen oder diversen anderen Zellen produziert werden. Sie tragen beträchtlich zur interzellulären Kommunikation bei, steuern die inflammatorische Antwort und nehmen somit eine große Rolle in der Regulation der Organentwicklung ein (Rocha et al., 2012). Für die Lungenreifung ist eine Balance zwischen proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen ungemein wichtig (Rocha et al. 2012). Im Rahmen der BPD findet man vor allem erhöhte Konzentrationen an proinflammatorischen Zytokinen im Nabelschnurblut, im Fruchtwasser und im Aspirat der Frühgeborenen (Rocha et al., 2012; McGowan et al., 2009). Verminderte Konzentrationen werden dagegen bei antiinflammatorischen Zytokinen festgestellt (Oei et al., 2002; McGowan et al., 2009). Zu den inflammatorischen Zytokinen zählen: IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α . IL-1 β und TNF- α scheinen bedeutend für die Entstehung eines septischen Schocks zu sein und infolgedessen auch für das klinische Erscheinungsbild mit Fieber, Hypotension, Leukozytose (Rocha et al., 2012). Zu den antiinflammatorischen Zytokinen zählt IL-10. Dieses Zytokin nimmt wohl eine protektive Rolle bei Lungenschädigung ein. Verminderte IL-10-Konzentrationen scheinen die Entstehung der BPD zu begünstigen (Rocha et al., 2012; Oei et al., 2002).

2.9 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde der Einfluss von Vitamin-A auf verschiedene Parameter in einem Hypoxie/Hyperoxie induzierten Modell (Double-Hit-Modell) der chronischen Lungenschädigung an der jungen Maus untersucht. Das Ziel war es, neue Erkenntnisse über die Pathogenese der Bronchopulmonalen Dysplasie (BPD) zu gewinnen und potentielle Therapiemöglichkeiten durch die pränatale Gabe von Vitamin-A zu prüfen.

Entwickelt wurde dazu ein Double-Hit-Modell, um eine der BPD möglichst ähnliche Lungenreifungsstörung an der neonatalen Maus zu garantieren. Hierbei wurde das körperliche Gedeihen der Mäuse, die Genexpression der Faktoren IGF-1, TGF- β 1-3, VEGF, mTOR, TTF-1, Foxp3 und die Zytokinproduktion von IL-2 β , VEGF, TNF- α , IL-6 und IL-10 in den Lungen unter pränatal applizierter Hypoxie und postnatal induzierter Hyperoxie erforscht.

In einem weiteren Schritt wurde der Einfluss von Vitamin-A auf die oben genannten Parameter untersucht. Die behandelte Double-Hit-Gruppe wurde anschließend mit der unbehandelten Gruppe in Vergleich gesetzt. Ebenso wurden beide Double-Hit-Gruppen nochmals mit der Normoxie-Gruppe verglichen (Gortner et al. 2013).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Biocap by erlab, Nummer: 1052000, UV-Gerät	Erlab D.F.S. Köln, Deutschland
Ziegra Eis-Maschinen Nr. 950940	Ziegra Eis-Maschinen, Isernhagen, Deutschland
Electrophoresis Power Supply, Power 300, Elektrophoresegerät	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Feinwaage Type 1801	Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland
Plexiglaskammer und Sauerstoffmessgerät	
Molecular Imager Geld Doc™ XRX Imaging System, No: 721BR04118, Kamera für Elektrophorese	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Luminex® 100/200™	Luminex Corporation, Austin, Texas, USA
Magnetrührer, RCT Nr. 116146	Janke & Kunkel GmbH & Co. KG. IKA-WERK, Staufen, Deutschland
Eppendorf BioPhotometer	Eppendorf Netheler Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
Qubit ® 2.0 Fluorometer	Life technologies Corporation, Invitrogen. Carlsbad, Kalifornien, USA
TaqMan® 7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, Californien, USA
Mastercycler gradient 5331, Thermocycler	Eppendorf Netheler Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Thermomixer comfort	Eppendorf Netheler Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
VWR lab dancer S40, Mischer	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Eppendorf Zentrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Zentrifuge 5804, no: 0011276	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Micro Zentrifuge, SN 045366	Carl ROTH GmbH & Co. KG., Karlsruhe, Deutschland

3.1.2 Labormaterialien

Materialien	Hersteller
MicroAmp® Fast optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (0,1ml)	Applied Biosystems, Wooston Warrington, UK
Qubit assay tubes, Q32856	invitrogen™, Eugene, Oregon, USA
UV-transparente Einmal-Küvetten ab 220nm, No.: 67.758	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
MicroAmp® Optical Adhesive Film, PCR compatible	Applied Biosystems, Wooston Warrington, UK
Pestle & Microtube Combo, Lot.-No. 120723-277	Argos Technologies, Inc. Ely, UK
Universalindikator, pH-Indikatorpapier	MerckKGaA, Darmstadt, Deutschland
Pipetman® Classic	Gilson
Pipettenspitzen, blau (100-1000 µl) type Gilson/Eppendorf/Biohit/Finnpipette/Brand/Scorex	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen, gelb (200 µl) type Gilson/Eppendorf	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen, gelb (2-100 µl) type Gilson/Eppendorf/Biohit/Finnpipette/Brand/Scorex	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen, gelb (20 µl) type Gilson/Eppendorf	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen, weiß (0,1-10 µl) type Gilson/Eppendorf/Biohit/Finnpipette/Brand/Scorex	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Surgical Disposal Scalpel,	Braun, Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland

3.1.3 Chemikalien und Kits

Chemikalie	Hersteller
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe, Deutschland
DEPC-Wasser zur Inaktivierung von RNasen (Herstellung: 1 ml DEPC wird in 1000 ml deionisiertes Wasser gegeben, anschließend in eine ausreichend große Flasche gefüllt (halbvoll) und autoklaviert.)	Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Apothek des Universitätsklinikum Homburg, Deutschland
Ethanol, Art. Nr. 32205	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim am Albuch, Deutschland
Formaldehyd 10 %	A.+E. Fischer-Chemie, Wiesbaden, Deutschland
Kit: Ambion® RNA by Life Technologies™, DNase Treatment & Removal	Applied Biosystems, Ambion, Foster City, CA, USA
Kit: DNA-free™ Kit DNase Treatment and Removal Reagents	Applied Biosystems, Ambion, Foster City, CA, USA
Kit: High Capacity cDNA Reverse Transcription, Part No.: 4368814	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Kit: High Sensitivity Human Cytokine Magnetic Bead Kit	EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
Kit: Milliplex Map Mouse Cytokine/Chemokine, Magnetic Bead Panel, LOT: 2433452	EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
Kit: NucleoSpin® RNAII, REF 740955,50	Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Kit: NucleoSpin® RNA, REF 740955,50	Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Kit: PARIS™ Kit, Protein and RNA Isolation System, Part Number AM 1921	Applied Biosystems, Ambion, Foster City, CA, USA
Kit: TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Part No. 4444557)	Applied Biosystems, Foster City, Californien, USA
Kit: TaqMan® Gene Expression Assays, Rack ID 1086089 -Mm 01281449_m1 Vegfa -Mm 01178820_m1 Tgfb1 -Mm 00436955_m1 Tgfb2 -Mm 0043690_m1 Tgfb3 -Mm 00444968_m1 Mtor -Mm 00657018_m1 Ttf1 -Mm m1 Foxp3	Applied Biosystems, Foster City, Californien, USA
Kit: TaqMan® Assay Reagents, pre-developed, Mouse ACTB (20x)	Applied Biosystems, Warrington, UK
Qubit RNA Standard Nr. 1 (Q32852) (0 ng/µl in TE buffer), Qubit RNA Standard Nr. 2 (Q32852)	Life technologies Corporation, Invitrogen. Carlsbad, Kalifornien, USA

(10ng/µl in TE buffer), Qubit RNA BR Standard Nr. 1 (Q10210)(0 ng/µl in TE buffer) Qubit RNA BR Standard Nr. 2 (Q10210) (100 ng/µl in TE buffer)	
Midori-Green Advance, Art. Nr. 617004	Biozym Vertrieb GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
MOPS-Puffer, 10-fach (Herstellung: 20,972 g MOPS (0,2 M), 2,05 g NaAc (0,05 M), 1,86 g EDTA (0,01 M), In ca. 350 ml deionisiertem Wasser lösen, pH zwischen 5,5 und 7,0 einstellen, auf 500 ml auffüllen und 500 µl DEPC Wasser zugeben. Über Nacht stehen lassen, danach autoklavieren.)	Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe, Deutschland
NaAc	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
NaOH	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Phentobarbital-Natrium	Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland
Retinyl palmitate (Sigma R 3375)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim am Albuch, Deutschland
Water, Molecular Biology Grade	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1 Versuchstiere

Alle durchgeführten Versuche wurden auf Antrag bei dem zuständigen Landesamt (Landesamt für Gesundheit und Verbraucherschutz, Abteilung Lebensmittel und Veterinärwesen, Saarbrücken, Deutschland, AZ: C1 2.4.2.2) genehmigt. Wir hielten uns durchweg an die EU-Richtlinien vom 24. November 1986 (86/609/EEC). Insgesamt wurden 22 adulte, multipare Mäuse sowie deren Neonaten vom Typ C57BL/6N verwendet. Die Tiere wurden von der Firma Charles River Laboratories GmbH (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Pro Versuchsreihe wurden zwei oder vier Muttertiere bestellt, die jeweils am 14. Tag post conceptionem geliefert wurden. Die Verteilung der Muttertiere erfolgte zufällig in die Double-Hit-Gruppen (Hypoxie/ Hyperoxie mit Vitamin A und Hypoxie/ Hyperoxie ohne Vitamin A). Zur Vergleichbarkeit lief einmalig eine Kontrollgruppe (Normoxie) mit.

Für die Haltung der Tiere wurden kontrollierte Standardbedingungen geschaffen: Raumtemperatur, Standardfutter und -wasser ad libitum, sowie ein künstlicher Tag- und Nachtrhythmus (12 h : 12 h). Im Rahmen unserer Versuche war es notwendig, die Sauerstoffkonzentration in der Umgebungsluft der Mäuse zu verändern. Dazu wurden die Käfige der Tiere in eine Plexiglaskammer gestellt. Durch das Einleiten von Sauerstoff bzw. Stickstoff konnten die für die Versuche notwendigen hypo- oder hyperoxischen Zustände geschaffen werden. Geringe Mengen Zufuhr von Frischluft waren immer gegeben und sorgten für die nötige Kohlenstoffdioxidelimination.

Die im Folgenden beschriebene Verabreichung der Medikation an die Muttertiere sowie die Euthanasierung der Jungtiere wurden von Herrn Dr. rer. nat. Dominik Monz durchgeführt. Die Präparation und Organentnahme der Jungtiere wurden unter seiner Anleitung und Aufsicht vollzogen.

3.2.1.1 Verwendetes Tiermodell

Am 14. Tag post conceptionem (E14) erfolgte die Aufteilung der Muttertiere in Einzelkäfige und ihre Überführung in eine Plexiglaskammer. Noch am gleichen Tag wurde der mit Vitamin-A behandelten Versuchsgruppe pro Tier umgerechnet 25.000 IU Vitamin A verabreicht. Dazu wurde eine Ampulle mit 1 800 000 IU/g Retinyl palmitat (Vitamin-A) zur besseren Resorption in 1000 µl Baumwollsaamenöl gelöst und schließlich in oben genannter Dosierung intraperitoneal gegeben. Der unbehandelten Versuchsgruppe wurde die gleiche Menge Trägersubstanz ohne Vitamin-A injiziert. Um eine Wachstumsrestriktion der Mäusejungen zu induzieren wurden die Muttertiere noch am

gleichen Tag bis zur Geburt in den Zustand der Hypoxie gebracht (10% Sauerstoff) (Monz et al., 2013).

Meist kamen die Jungen zwischen Tag E19/E20 (Durchschnittswert: E19,24) = P0 (postnataler Tag 0) unter Spontangeburt zur Welt. Die hyperoxische Phase begann ab Tag P1 der Jungtiere (70 % Sauerstoff) und bestand bis Versuchsende. Hiermit sollte bei den Jungtieren eine ähnliche Lungenschädigung erzeugt werden, wie sie bei der BPD bekannt ist. Je nach Versuchsgruppe erfolgte an Tag P1/P7/P14 die Entnahme der Lungen der Jungen. Diese wurden vermessen und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.2.1.2 Messungen (Auxologie der Jungtiere)

Das Gewicht der Jungtiere wurde mithilfe einer Präzisionswaage (Analytical Plus, Ohaus Europe, Switzerland) an Tag P1, P7 und P14 gemessen. Ebenso wurde das Gewicht der Lunge direkt nach deren Entnahme bestimmt. Bei den Jungtieren wurde je nach Versuchsreihe entweder an Tag P1, P7, oder P14 kurz nach der Euthanasierung die Körperlänge und der fronto-okzipitale Durchmesser mithilfe eines digitalen Abstandsmessgerätes erfasst.

3.2.1.3 Versuchsdesign

Die Euthanasierung, Präparation und Organentnahme erfolgte in Abhängigkeit von der jeweiligen Untersuchung an Tag P1, P7 oder P14. Dazu wurde den Jungtieren 400 mg/kg Körpergewicht Phentobarbital-Natrium intraperitoneal injiziert. Nach vorsichtiger medianer Sternotomie und Laparotomie kam es über Durchtrennung der Aorta zur Exsanguination der Jungtiere.

Die entnommenen Lungen wurden für die weiteren Versuche, nachdem sie gewogen wurden, direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.2.2 RNA-Isolation

3.2.2.1 Methode

Ribonukleinsäure (RNA) ist ein wichtiger Bestandteil in der Umsetzung von genetischer Information in Proteine. Hierbei wird erst die Desoxyribonukleinsäure (DNA) in RNA umgeschrieben (Transkription) und diese dann in einem weiteren Schritt in die Aminosäuresequenz übersetzt (Translation) (Heinrich, Müller & Graeve, 2014). Die RNA-Isolation aus Geweben ist eine Methode zur Darstellung der momentanen Zelltätigkeit einer Zelle. Erfasst werden hierbei nur

die Gene, die zum Zeitpunkt der Extraktion transkribiert werden und damit als mRNA vorliegen. Die isolierte RNA kann durch zahlreiche weitere molekularbiologische Methoden ein differenziertes Bild über die Genexpression in Geweben liefern. Da die RNA sehr empfindlich gegenüber dem Abbau durch stabile RNasen ist, muss darauf geachtet werden, dass sehr zügig und präzise auf Eis gearbeitet wird (Chomczynski & Sacchi, 1987; Peirson & Butler, 2007).

3.2.2.2 Durchführung

Die RNA-Isolation wurde mit dem Kit NucleoSpin® RNA (Machery-Nagel) nach Anleitung des Herstellers wie folgt durchgeführt:

Zellyse

Mit einem Skalpell wurden die bei -80 °C eingefrorenen Lungen auf Trockeneis zerkleinert und in ein RNA-freies Reaktionsgefäß gegeben. Die Lungen wurden jeweils mithilfe eines Pistills auf dem Eis zerdrückt. Anschließend wurden 350 µl Puffer RA1 und 3,5 µl β-Mercaptoethanol hinzugefügt, alles auf einem Mischer gründlich durchmischt, sodass eine homogene Masse entstand.

RNA-Präzipitation

Das Lysat wurde mit einer Pipette mindestens fünfmal auf- und abgezogen und auf den NucleoSpin-Filter gegeben. Alles wurde für eine Minute bei 11.000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und es wurden 350 µl Ethanol (70 %) zum Lysat hinzupipettiert. Das Lysat wurde zwei- bis dreimal auf- und abgezogen und anschließend auf ein NucleoSpin-RNA-Säulchen pipettiert und für 30 s bei 11.000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Säulchen mit der RNA wurde auf ein weiteres Reaktionsgefäß überführt.

Es wurden 350 µl MDB auf das NucleoSpin-RNA-Säulchen gegeben und schließlich eine Minute bei 11.000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert.

Ein DNase-Reaktions-Mix wurde in einem sterilen Mikrozentrifugations-Behälter hergestellt: Hierzu wurden 10 µl rDNase mit 90 µl Reaktionspuffer für rDNase gemischt. Von dieser Mischung wurden 95 µl dann auf die Mitte des NucleoSpin-RNA-Säulchens gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Waschung der RNA

1. Waschung: Es wurden 200 µl Puffer RA(W)2 auf das NucleoSpin-RNA-Säulchen gegeben und 30 Sekunden bei 11.000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Säulchen auf ein neues 2 ml Reaktionsgefäß gestellt.

2. Waschung: 600 µl Puffer RA3 wurden auf das NucleoSpin-RNA-Säulchen gegeben und 30 Sekunden bei 11.000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Der Überstand aus dem 2 ml-Reaktionsgefäß wurde verworfen.

3. Waschung: 250 µl Puffer RA3 wurden dann auf das NucleoSpin-RNA-Säulchen gegeben und zwei Minuten bei 11.000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Säulchen auf ein neues Nuklease-freies 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesetzt.

Elution der RNA

Um die RNA zu eluieren wurden 60 µl RNase-freies-H₂O auf das Säulchen gegeben. Das Ganze wurde eine Minute bei 11.000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert.

3.2.3 Messung der Konzentration der RNA im Photometer

3.2.3.1 Methode

Das Photometer ist ein Messgerät, mit dem man über Licht-Absorption die Konzentration eines Moleküls in einer Lösung bestimmen kann. Es funktioniert anhand des Lambert-Beer'schen Gesetzes. Dabei wird eine Küvette mit einer Testlösung gefüllt. Diese wird im Photometer mit monochromatischem Licht bestrahlt. Gemessen wird die Abschwächung der Strahlungsintensität beim Durchgang durch die Küvette. So kann die Menge der das Licht absorbierenden Moleküle berechnet werden (Otto, 2011).

3.2.3.2 Durchführung

Für die photometrische Messung wurden je 2 µl der (in 3.2.2 RNA-Isolation) hergestellten Proben in eine Küvette mit jeweils 148 µl deionisiertem Wasser gegeben. Als Negativkontrolle diente eine Küvette mit 150 µl deionisiertem Wasser. Im Photometer wurde anschließend die Konzentrationsbestimmung der eluierten RNA vorgenommen.

3.2.4 Gelelektrophorese

3.2.4.1 Methode

Die Gelelektrophorese ist ein Verfahren mit dem man Makromoleküle (wie DNA, RNA und Proteine) voneinander trennen und sichtbar machen kann. Dazu werden die Moleküle auf ein Gel gegeben, welches in einer ionischen Pufferlösung liegt. Ein elektrisches Gleichstrom-Feld führt dazu, dass sich die verschiedenen Teilchen aufgrund ihrer Größe und Ladung unterschiedlich schnell bewegen. Kleinere Moleküle wandern dabei schneller durch die Poren des Gels als größere. Nach Beendigung der Elektrophorese werden die aufgetrennten Moleküle als sogenannte Banden sichtbar. Anhand dieser kann man auf die Art des Moleküls schließen (Richter, 2003).

3.2.4.2 Durchführung

Für die Herstellung des Agarose Gels der Gelelektrophorese wurden 0,7 g Agarose, 63 ml Wasser und 7 ml 10-facher MOPS-Puffer aufgekocht und so lange leicht geschüttelt bis alles gelöst war. Nachdem die Lösung etwas abgekühlt war, wurden unter einem Abzug 3 ml Formaldehyd (10 %) hinzugegeben. Das Ganze wurde luftblasenfrei in die vorgefertigte Elektrophorese-Kammer gegossen und 15 Minuten ruhen gelassen. Da es sich um einen 10-fach konzentrierten Puffer handelt, wurden 50 ml MOPS-Puffer-Konzentrat mit 450 ml deionisiertem Wasser aufgefüllt, sodass eine 1 : 10 Verdünnung vorlag. Das nun hergestellte Gel wurde demzufolge mit 500 ml einfach-konzentriertem MOPS-Puffer übergossen.

In einem nächsten Schritt wurden 4 µl der hergestellten RNA-Proben mit je 2 µl Ladepuffer Midori-Green gut vermischt, für 20 Minuten bei 50 °C inkubiert und anschließend in die vorgefertigten „Taschen“ des hergestellten Elektrophorese-Gels gegeben. Die Elektrophorese wurde darauf für eine Stunde bei 80 mV laufen gelassen.

3.2.5 DNA-Verdau der hergestellten RNA-Proben aus den Mäuselungen

3.2.5.1 Hintergrund und Methode

Mittels der oben erläuterten Gelelektrophorese wurde die Qualität der erhaltenen RNA aus den Mäuselungen getestet. Um eine Kontamination der gewonnenen RNA auszuschließen wurde in einem nächsten Schritt eine Non-RT-PCR durchgeführt. Non-RT-PCR steht für Non-Reverse-Transkription-PCR und beschreibt eine Polymerasekettenreaktion (PCR), welche nicht mit cDNA,

sondern mit RNA durchgeführt wird (zum Prinzip der PCR vgl. Kapitel 3.2.8). Die Polymerasen der PCR sind DNA-Polymerasen und können nur DNA, nicht jedoch RNA als ihr Substrat verwenden. Eine Amplifikationskurve, wie sie bei der PCR mit DNA bekannt ist, bleibt bei der Non-RT-PCR aus. Liegt jedoch eine Kontamination der RNA mit genomischer DNA vor, so kommt es zu einer Amplifikationskurve. Für weitere Genexpressionsanalysen wird jedoch die reine RNA benötigt und ein DNA-Verdau muss in diesem Fall durchgeführt werden. Hierbei wird die noch vorhandene genomische DNA über die Zugabe des rekombinant gewonnenen Enzyms DNase abgebaut. Die Proben können anschließend erneut mittels Non-RT-PCR auf genomische DNA überprüft werden.

3.2.5.2 Durchführung

Der DNA-Verdau wurde mit dem Kit DNA-free™ Kit DNase Treatment and Removal Reagents (Applied Biosystems, Ambion) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt:

Komponenten	Volumen (µl)
10-facher DNase Buffer	0,1
rDNase	1,0
Errechnetes RNA-Volumen	17,0/ 26,0
DNase Inactivation Reagent	0,1 x Volumen

Zu dem errechneten RNA-Volumen wurden 10-facher DNase-Puffer und rDNase gegeben. Der Mix wurde bei 37 °C für 20-30 Minuten inkubiert. Danach wurde der DNase-Inactivation-Reagent hinzugegeben und alles gut gemischt. Bei Raumtemperatur wurde der Mix für zwei Minuten inkubiert und immer wieder per Hand vorsichtig gemischt, um eine gleichmäßige Verteilung zu garantieren. Schließlich wurde alles für 1½ Minuten bei 10.000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert, sodass sich der DNase-Inactivation-Reagent am Boden des Reaktionsgefäßes absetzen konnte. Der Überstand wurde entnommen und nochmals per Non-RT-PCR auf genomische DNA überprüft.

3.2.6 Umschreiben der RNA in cDNA

3.2.6.1 Methode

cDNA ist eine komplementäre (c = complementary) DNA, deren Sequenz derjenigen der mRNA entspricht. Sie kann durch das Enzym reverse Transkriptase aus einer vorliegenden mRNA synthetisiert werden. cDNA kann in einem nächsten Schritt über eine PCR vervielfältigt werden und

dadurch für verschiedene wissenschaftliche Untersuchungen verwendet werden.

So kann, wie auch in dieser Arbeit, die Expressionsrate der jeweils zugrundeliegenden RNA bestimmt werden, um so Unterschiede der Genexpression in verschiedenen Geweben festzustellen (Heinrich, Müller & Graeve, 2014).

3.2.6.2 Durchführung

Die Herstellung der cDNA erfolgte mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems) und wurde gemäß Anleitung des Herstellers durchgeführt:

Herstellung des Mastermixes nach Anzahl der zu verwendeten Proben:

Komponenten	Volumen (µl)
10x RT Puffer	2,0
25x dNTP Mix (100mM)	0,8
10x beliebige Primer	2,0
MultiScribetM Reverse Transkriptase	1,0
RNase Inhibitor	-
Nuklease-freies H ₂ O	4,2
Total	10,0

Von dem Mastermix wurden jeweils 10 µl mit 10 µl der jeweiligen RNA-Proben in ein Reaktionsgefäß gegeben und dann etwa vier- bis fünfmal auf- und abpipettiert, um die Bestandteile zu vermischen. Die Proben wurden anschließend kurz zentrifugiert, um mögliche Blasenbildung zu verhindern. Anschließend wurden die Proben so lange auf Eis gelagert, bis sie zur Weiterverarbeitung auf den Thermocycler gegeben werden konnten. Die Proben wurden dann für die spätere Weiterverarbeitung bei -20 °C eingefroren.

Der Thermocycler wurde nach folgendem Schema programmiert:

	1. Schritt	2. Schritt	3. Schritt	4. Schritt
Temperatur (°C)	25	37	85	4
Zeit	10min	120min	5min	∞

3.2.7 Qubit-Konzentrationsbestimmung

3.2.7.1 Methode

Das Qubit-Fluorometer dient zur genauen Quantifizierung von RNA, DNA und Protein. Im Gegensatz zu anderen Quantifizierungs-Methoden, wie dem Photometer, nutzt das Qubit fluoreszierende Farbstoffe um den RNA-, DNA- oder Protein-Anteil in einer Probe zu bestimmen. Die Farbstoffe sind sehr spezifisch für die jeweilige Zielstruktur. Sobald sie an diese binden, emittieren sie ihren fluoreszierenden Farbstoff. Der emittierte Farbstoff ist direkt proportional zur Menge der enthaltenen Zielstruktur und kann so vom Qubit gemessen werden. Das Gerät setzt die ermittelten Werte in Vergleich zu Standardlösungen bekannter Molekül-Konzentrationen. Ausgehend von diesen Standardlösungen wird das Verhältnis zwischen Konzentration und Fluoreszenz bei jeder Messung abgeleitet. Der Vorteil gegenüber der UV-Methode ist, dass so die genaue Menge der jeweiligen Biomoleküle in einer Probe bestimmt werden kann (Manchester, 1996; Gallagher & Desjardins, 2007).

3.2.7.2 Durchführung

Zur Herstellung der Arbeitslösung wurden zu 200 µl Puffer (in unserem Fall entweder RNA- oder Protein-Puffer) je 1 µl der jeweiligen Probe gegeben und anschließend auf einen Mischer vermengt. Von der Arbeitslösung wurden nun 190 µl entnommen und in zwei Teströhrchen gefüllt (für die Protein-Messung waren es drei Teströhrchen). Zu den 190 µl wurden 10 µl der jeweiligen Standards gegeben. Anschließend wurde alles auf dem Mischer gründlich vermengt. Für die Messung der Proben wurden 1 µl der jeweiligen Proben in 199 µl der Arbeitslösung gegeben und anschließend auf dem Mischer vermengt. Die Proben wurden dann zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Protein-Messung waren es 15 Minuten. Anschließend wurde je nach Versuch die Konzentration an RNA bzw. Protein der Proben im Qubit-Fluorometer gemessen.

3.2.8 Real-Time-PCR

3.2.8.1 Das Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion wurde 1984 von Kary Mullis entwickelt und stellte einen Durchbruch für den experimentellen Umgang mit DNA dar (Mullis & Faloona, 1987). Es war nun möglich, spezifische DNA-Sequenzen (bis zu 10 kb) in vitro beliebig oft zu amplifizieren. Das

Prinzip der PCR orientiert sich am Ablauf der natürlichen Replikation der DNA. Ein Reaktionszyklus der PCR besteht aus drei Schritten: Denaturierung, Annealing und Elongation. Wird dieser Zyklus mehrmals wiederholt, ergibt sich eine exponentielle Zunahme der amplifizierten DNA-Sequenzen. Um eine ausreichende Menge an DNA-Sequenzen zu erhalten, finden etwa 20-30 Reaktionszyklen statt. Damit die spezifischen DNA-Sequenzen aufgefunden werden, verwendet man synthetisch hergestellte Oligonucleotide, auch Primer genannt, die an der DNA anheften und den Startpunkt der Amplifikation darstellen. Mithilfe von komplementären Nukleotiden, der Taq-Polymerase und einem speziell angepassten Reaktionspuffer werden so neue DNA-Sequenzen gewonnen (Heinrich, Müller & Graeve 2014).

Komponenten

Die einzelnen Komponenten werden im Folgenden kurz erläutert:

Primer:

Primer sind synthetisch hergestellte Einzelstrang-Oligonukleotide, deren Sequenzen komplementär zu den 3'-Enden der gewählten DNA-Sequenz sind. Sie stellen die Startsequenz der Replikation dar, da sich hier die DNA-Polymerase anheftet.

Taq-Polymerase:

Die Taq-Polymerase ist eine hitzestabile DNA-Polymerase, die die DNA-Synthese katalysiert. Das Enzym benutzt die einzelsträngige DNA als Matrize und baut komplementär zur DNA die Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) ein. Sie arbeitet in 5'-3'-Richtung.

Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs):

Die dNTPs sind Moleküle, die unter anderem die Basen Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin enthalten. Sie werden von der Taq-Polymerase zur Herstellung des komplementären DNA-Strangs verwendet.

Reaktionspuffer:

Der Reaktionspuffer ist ein speziell auf die Taq-Polymerase abgestimmter zehnfach Puffer. Er enthält 100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂ sowie einprozentige TritonX-100. Diese Mischung gewährleistet die notwendigen Reaktionsbedingungen für die Polymerase.

Ablauf

1. Denaturierung

Die doppelsträngige DNA wird auf 95 °C erhitzt, was zum Aufbruch der sie zusammenhaltenden Wasserstoffbrückenbindungen führt. Die DNA liegt dann in zwei Einzelsträngen vor.

2. Anheftung der Oligonukleotid-Primer

Im nächsten Schritt erfolgt eine rasche Abkühlung auf 50-65 °C. Dies entspricht der optimalen Hybridisierungstemperatur der synthetisch hergestellten Oligonukleotid-Primer. Die Primer müssen komplementär zu einer spezifischen DNA-Sequenz am 3'-Ende der Ziel-DNA sein und lagern sich dort im Folgenden an.

3. Elongation

Die Taq-Polymerase kann nun von den Primern ausgehend mit der Synthese des komplementären DNA-Strangs beginnen. Dazu baut sie in 5' → 3' Richtung die dNTPs nach Vorlagestrang ein. Der so neu gewonnene DNA-Strang wird anschließend als Matrize im nächsten Zyklus verwendet. Die optimale Temperatur der Polymerase liegt bei 72 °C.

3.2.8.2 Das Prinzip der Real-Time-PCR (RT-PCR)

Die Real-Time-PCR (RT-PCR) oder auch quantitative PCR ist eine PCR, bei der zusätzlich Fluoreszenzfarbstoffe verwendet werden. Dies ermöglicht eine Echtzeit-Bestimmung der PCR-Produkte während eines PCR-Zyklus. Die Real-Time-PCR findet große Anwendungen in der medizinischen Diagnostik, den Neurowissenschaften sowie der Entwicklungsbiologie. An die zu amplifizierenden Gensegmente werden DNA-Farbstoffe angelagert. Die Fluoreszenzsignale nehmen dadurch proportional zu – von Zyklus zu Zyklus – mit dem exponentiellen Wachstum der DNA-Produkte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur quantitativen Erfassung der RT-PCR-Produkte sogenannte TaqMan-Sonden benutzt. Diese fluorogenen Sonden bestehen aus einem Oligonukleotid und sind zudem gekoppelt mit einem Reporter-Farbstoff (5'-Ende) sowie einem Quencher-Farbstoff (3'-Ende). Ist die Sonde intakt, wird so eine unmittelbare Nähe des Quencher-Farbstoffes zum Reporter-Farbstoff garantiert. Der Quencher unterdrückt durch Fluoreszenzlöschung/ Fluoreszenz-Energietransfer eine Emittierung der Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes. Die Sonden lagern sich schließlich an das zu amplifizierende DNA-Segment an. Unter Ausnutzung der 5'-3'-Exonuklease Aktivität der Taq-Polymerase wird die Sonde während des Replikationsvorgangs abgebaut. Dadurch entfernen sich Quencher und Reporter voneinander. Die räumliche Trennung führt zu einer

Aufhebung der Fluoreszenzlöschung durch den Quencher und bedingt so eine steigende Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes. Diese wird am Ende jeder Elongation gemessen und zeigt mit jedem Zyklus ein exponentielles Wachstum (Ramakers et al., 2003; Schild, o.J.).

Durchführung

Die Herstellung des Reaktionsansatzes erfolgte mit dem Kit TaqMan® Fast Advanced Master Mix: Dieses enthielt neben deionisiertem Wasser den Mastermix mit den für die Real-Time-PCR notwendigen Bestandteilen: Taq-Polymerase, Reaktionspuffer, Desoxynukleosidtriphosphate, Primer. Die einzelnen Bestandteile wurden im Abschnitt Komponenten (vgl. Abschnitt 3.2.8.1) ausführlich beschrieben. Außerdem wurden zur Genexpressionsanalyse verschiedene Reaktionsansätze mit den folgenden Genen angesetzt: IGF-1, TGF- β 1-3, TTF-1, VEGF, mTOR, Foxp3, sowie das Kontrollgen β -Actin. Durch die Real-Time-PCR war es nun möglich, die Expression der aufgeführten Gene in den Lungen der Mäuse zu analysieren.

Der Reaktionsansatz wurde nach folgenden Vorgaben hergestellt:

Komponenten	Volumen in μ l
H ₂ O deion.	4,75
Mastermix (enthält Taq-Polymerase, Puffer, Desoxynukleosidtriphosphate, Primer)	7,5
Proben-Gen (TaqMan® Genexpressions-Proben)	0,75
Gesamtvolumen	13,0

Der Reaktionsansatz wurde zu einem Gesamtvolumen von 13 μ l aufgefüllt. Für jeden Ansatz wurden je 2 μ l der jeweiligen auf 2,5 ng/ μ l verdünnten cDNA verwendet, sodass in den Ansätzen je 5 ng cDNA enthalten waren. Für die Messung der einzelnen Proben wurden jeweils Triplikate angesetzt, um die Genauigkeit der Messwerte zu erhöhen.

Die Triplikate wurden auf eine 96-Well Platte pipettiert, mit optischer Folie beklebt und im PCR-Gerät ausgelesen.

Das PCR-Programm lief wie folgt ab (Schritt 2-4 wurde 40 mal wiederholt):

Schritte	1. Schritt	2. initiale Denaturierung	3. Denaturierung	4. Anheften
Temperatur	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
Zeit (min.)	2:00	10:00	00:15	1:00

Auswertung der qPCR-Ergebnisse

Nach dem Ende der PCR wurde mittels der Software TaqMan® Gene Expression Assays by Life Technologies auf einem Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time-PCR System gemessen.

Dieses ist sowohl mit einem Thermocycler als auch mit einer optischen Einheit verbunden und erzeugt eine Amplifikationskurve. Bei dieser wird die Fluoreszenz gegen die Zykluszahl aufgetragen. Der Verlauf der Amplifikationskurve ist in etwa sigmoid. Zu Beginn eines jeweiligen Zyklus ist die in der PCR amplifizierte DNA noch so gering, dass die Kurve annähernd eine Steigung von null aufweist. Sie läuft entlang der sogenannten „Baseline“. Sobald immer mehr Zyklen durchlaufen werden, zeigt die Kurve einen annähernd exponentiellen Verlauf. Gegen Ende der PCR flacht sie ab. Dies lässt sich durch den Substratverbrauch der PCR-„Reagenzien“ erklären. Die Amplifikationskurven der jeweiligen technischen Replikate (in Triplets aufgetragen) verlaufen im Idealfall gleich.

Die Amplifikationskurven wurden anhand ihrer Ct-Werte (threshold cycle) verglichen. Diese Werte beschreiben den Schnittpunkt der Amplifikationskurve mit einer vom Computerprogramm berechneten Threshold-Linie und geben an bei welcher Zykluszahl die Amplifikationskurve der PCR-Produkte in das exponentielle Wachstum übergeht. Der Ct-Wert verhält sich also umgekehrt proportional zu der vorhandenen DNA-Probe. Aus den drei berechneten Ct-Werten der technischen Replikate wird pro Triplet ein arithmetisches Mittel gebildet.

3.2.8.3 Die ddCt-Methode

Die Analyse der quantitativen real-time PCR wird mittels der ddCt-Methode durchgeführt. Neben den ermittelten Ct-Werten der Zielgene werden für diese relative Quantifizierungsmethode die Ct-Werte einer endogenen Kontrolle (oder Referenzgen) benötigt. Die endogene Kontrolle sollte so gewählt werden, dass sie einmal leicht zu detektieren ist und zusätzlich kaum Schwankungen aufweist (die z.B. durch bestimmte Stressoren im Rahmen von experimentellen Behandlungen ausgelöst werden können). Im Rahmen unserer Studie wurde β -Actin als endogene Kontrolle verwendet. β -Actin ist ein Protein, das im Zytoskelett jeder Zelle vorkommt.

Die relative Quantifizierung setzt voraus, dass die Ct-Werte des jeweiligen Zielgens und der endogenen Kontrolle bekannt sind. Zur Berechnung ist eine gleiche Effizienz der PCR-Reaktionen von Bedeutung. Als Erstes wird die Differenz aus dem Ct-Wert jedes Zielgens und dem Ct-Wert der endogenen Kontrolle gebildet (dCt). Im nächsten Schritt wird der dCt-Wert der experimentell behandelten Gruppe vom dCt-Wert der Kontrollgruppe abgezogen (ddCt).

Der erhaltene Wert wird in die 2^{-ddCt} -Formel eingesetzt und beschreibt damit den relativen

Expressionsunterschied einer Probe nach einer experimentellen Behandlung zu ihrer Kontrolle (Livak & Schmittgen, 2001; Zhang, Ruschhaupt & Biczok, 2013; Pfaffl, 2004).

3.2.9 Zytokinbestimmung im Lungengewebe

3.2.9.1 Proteinisolierung

Method

Eine Proteinisolierung dient dazu, bestimmte Proteine aus biologischem Material (Zellen, Gewebe) zu isolieren.

Durchführung

Die Proteinisolation erfolgte mithilfe des PARIS™ Protein and RNA Isolation System Kits by Life technologies, Ambion gemäß Angaben des Herstellers:

Zuerst wurde ein Proteinlysate der Mäuselungen von Tag 14 gewonnen. Die Lungen wurden dazu jeweils auf Eis mit einem Skalpell zerkleinert. Dazu wurden je 300 µl Puffer gegeben. Die Lungen wurden mithilfe eines Pistills weiter zerkleinert, sodass eine homogene Masse entstand. Anschließend wurde das Protein-Puffer-Gemisch auf einen Mischer gegeben und gründlich vermengt.

Die Proteinkonzentration der einzelnen Lungen wurden dann im Qubit 2.0 Fluorometer nach Anleitung gemessen. In einem nächsten Schritt wurden über das Luminex-Analytensystem die Zytokinlevel im Proteinlysate den jeweiligen Lungen der Mäuse bestimmt.

3.2.9.2 Zytokinmessung mittels Luminex-Verfahren

Method

Die Luminex-xMAP-Technologie ist ein Multiplex-Analyten-Verfahren, welches in der Lage ist, bis zu 100 Analyten gleichzeitig zu messen. Ausgangsmaterial der Luminex-Technologie sind Polystyrolpartikel, die auch Mikrosphären oder Beads genannt werden können. Diese werden wie bei ELISA als Festphase für biochemische Nachweisreaktionen verwendet. Die große Flexibilität und Messbreite erklärt sich dadurch, dass die jeweiligen Mikrosphären über einen eigenen roten Fluoreszenzfarbstoff verfügen, der in seiner Intensität auf einer „Skala“ vorgegeben und klar

definiert ist. Die Mikrosphären können dadurch mit verschiedensten Testsubstanzen/Nachweisreagenzien (z.B.: Proteine, Antikörper etc.) gleichzeitig beladen werden. Je mehr Testsubstanz vorhanden ist, desto mehr Mikrosphären werden beladen. Der Nachweis der Analyten erfolgt über spezifische Detektionsmoleküle, die ihren jeweiligen Analyten binden. Die Detektionsmoleküle sind ebenso mit einem eigenen grünen Fluoreszenzfarbstoff beladen. Der spektrale Bereich unterscheidet sich allerdings von dem der Mikrosphärenfarbstoffe, sodass die Klassifizierung der Mikrosphären und die Quantifizierung der Analyten gleichzeitig stattfinden kann.

Mit dem Luminex-Analytensystem wird anschließend das Mikrosphären-basierte Assay per Durchflusszytometrie ausgewertet. Dazu werden zwei Laser benötigt, deren emittiertes Licht proportional zur gemessenen Analytenmenge ist. Die Signale werden im Folgenden digitalisiert und im Signalprozessor in Messwerte übersetzt (Dunbar, 2006).

Durchführung

Reagenzienvorbereitung

Die Analyten wurden nach dem High Sensitivity Human Cytokine Magnetic Bead Kit gemäß den Angaben des Herstellers verarbeitet:

Antikörper-Immobilisierte Mikrosphären

Die Mikrosphären unseres Kits waren magnetisch geladen. Zu Beginn der Verarbeitung wurden sie jeweils 30 s sonifiziert und danach eine Minute auf einem Mischer vermenget. Aus jedem Fläschchen wurden 60 µl entnommen und alles in eine Misch-Flasche gegeben. Bei den verwendeten sechs Flaschen ergab dies ein Gesamtvolumen von 360 µl. Dies wurde mit 2,64 ml Probepuffer auf insgesamt 3 ml aufgefüllt.

Folgende Mikrosphären wurden verwendet:

1. MCY IL6-MAG
2. MCY TNF α -MAG
3. MIL 1 β -MAG
4. MIL 10-MAG
5. MIL 2-MAG
6. MVEGF-MAG

Qualitätskontrollen

Die Kontrollen 1 und 2 lagen lyophilisiert vor und wurden in jeweils 250 µl deionisiertem Wasser gelöst. Um eine ausreichende Mischung zu garantieren, wurden die Flaschen auf einen Mischer gegeben. Anschließend wurden die Kontrollen für 5-10 min ruhen gelassen.

Waschpuffer

Die Waschpuffer wurden auf Raumtemperatur gebracht und gut gemischt. Da es sich hierbei um einen 10-fach konzentrierten Puffer handelte, wurden 60 ml Waschpuffer-Konzentrat mit 540 ml deionisiertem Wasser aufgefüllt, sodass eine 1 : 10 Verdünnung vorlag.

Standard

Der Standard, ebenfalls lyophilisiert, wurde in 250 µl deionisiertem Wasser gelöst. Anschließend wurde alles gut gemischt und 5-10 min ruhen gelassen. Dies ergab einen 10.000 pg/ml Standard. Im Folgenden wurde ausgehend von dem 10.000 pg/ml Standard eine Verdünnungsreihe hergestellt, die sich wie folgend gliedert: 10.000 pg/ml, 2.000 pg/ml, 400 pg/ml, 80 pg/ml, 16 pg/ml und 3,2 pg/ml. Dazu wurden sechs Reaktionsgefäße gerichtet, die jeweils mit 200 µl Probepuffer befüllt wurden. Die einzelnen Verdünnungsstufen wurden durch Entnahme von je 50 µl aus der vorhergehenden Verdünnungsstufe hergestellt. Als 0 pg/ml Standard (= Background) wurde Probepuffer genommen.

Ablauf

Es wurden jeweils 200 µl des angesetzten Waschpuffers in die jeweiligen Nöpfchen der 96-Well-Platte gegeben. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit einer Schutzfolie abgedeckt und für 10 min. bei Raumtemperatur auf dem Thermomixer gemischt. Dann wurde der Waschpuffer aus der 96-Well-Platte gegossen. Die Platte wurde nun von links oben nach rechts unten hin belegt. Die einzelnen Standards und Kontrollen wurden als Duplikat aufgetragen. Von diesen wurde demnach je 25 µl nach festgelegtem Pipettierschema auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. Danach wurden 25 µl Probepuffer in alle Proben-Nöpfchen gefüllt. Ebenso wurden 25 µl phosphatgepufferte Salzlösung in das Background-, Standard- und Kontroll-Nöpfchen gegeben. Anschließend wurden je 25 µl der jeweiligen Proben der vorher beschriebenen Proteinisolation nach Pipettierschema in die dafür vorgesehenen Nöpfchen der Mikrotiterplatte aufgeteilt. Die Mikrosphären wurden auf einen Mischer zugeteilt und anschließend wurden davon 25 µl in jedes Nöpfchen der Mikrotiterplatte eingefüllt. Die Platte wurde mit einer Schutzfolie beklebt und zur Sicherheit nochmals in Plastikfolie gewickelt. Anschließend wurde diese bei 4 °C für 16-18 h auf dem Thermomixer über Nacht inkubiert. In einem nächsten Schritt wurde die Mikrotiterplatte gewaschen: Dazu wurde die

Platte für eine Minute auf einen Magneten gegeben. Dies führte dazu, dass die magnetischen Mikrosphären sich komplett am Boden absetzen konnten und nicht im nächsten Schritt mit ausgeleert wurden. Dann wurden 200 µl Waschpuffer in jedes Nöpfchen gefüllt. Die Platte wurde anschließend auf dem Thermomixer 30 s gemischt, wieder auf den Magnet gegeben, es wurde wieder eine Minute gewartet und die Platte wurde daraufhin erneut ausgeleert. Die Mikrotiterplatte wurde dann nochmals mit 200 µl Waschpuffer befüllt und der Vorgang wurde wiederholt. Danach wurden 25 µl Detektions-Antikörper (Sekundärantikörper) in jedes Nöpfchen pipettiert. Die Platte wurde mit Schutzfolie beklebt und eine Stunde auf dem Thermomixer bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 25 µl Streptavidin-Phycoerythrin in jedes Nöpfchen verteilt. Die Platte wurde nochmals mit Schutzfolie beklebt und 30 min auf dem Thermomixer bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Platte wieder auf den Magnet gestellt. Es wurde eine Minute gewartet und daraufhin wurde die Platte ausgeleert. Nun wurden nochmals 200 µl Waschpuffer in jedes Well pipettiert. Die Platte wurde auf dem Thermomixer 30 s gemischt, wieder auf den Magnet gegeben, eine Minute gewartet und dann ausgeleert. Die Platte wurde dann nochmals mit 200 µl Waschpuffer befüllt und der Vorgang wurde wiederholt. Anschließend wurden 150 µl Sheath Fluid in jedes Nöpfchen pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde für fünf Minuten auf den Thermomixer gegeben, sodass die Mikrosphären resuspendiert werden konnten. Nach Kalibrierung des Luminex-Gerätes wurde die Platte ausgelesen.

3.2.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Statistikprogramms SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Die Daten wurden alle als Mittelwert und Standardfehler der Mittelwerte bzw. Median mit Minimum und Maximum angegeben.

Normalverteilung wurde mithilfe des Kolmogorov-Smirnov- und des Shapiro-Wilk-Testes getestet. War eine Normalverteilung gegeben, wurden die Daten mithilfe des Students t-Tests ausgewertet. War dies nicht der Fall, wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet.

Der Vergleich von mehr als zwei Gruppen erfolgte mittels ANOVA-Varianzanalyse (Analysis of Variance). Dabei wurde eine Post-hoc-Korrektur nach Bonferroni durchgeführt.

Für die statistische Auswertung der Daten der Genexpressionsanalyse wurde das DataAssist von Applied Biosystems verwendet.

Eine statistische Signifikanz wurde jeweils mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Versuch 1: Auswirkung der Hypoxie/Hyperoxie auf die postnatale Lungenreifung und das körperliche Gedeihen im Double-Hit-Mausmodell sowie Einfluss von Vitamin A auf die genannten Faktoren.

Für diesen Versuch wurde von unserer Gruppe ein Double-Hit-Mausmodell ($FiO_2 = 0,10$ für durchschnittlich 6,24 Tage: Tag E14- E19,24, dann $FiO_2 = 0,70$ für 14 Tage) entwickelt. Untersucht wurden über 14 Tage jeweils die Gewichtsentwicklung, Körperlänge, Kopflänge sowie das Lungengewicht in den einzelnen Gruppen. Die statistische Auswertung wurde, nachdem eine Normalverteilung gegeben war, mit der einfaktoriellen ANOVA berechnet und im Post-hoc-Test mittels Bonferroni-Test korrigiert. Lediglich die Werte, die nicht im Mehrfachvergleich berechnet werden konnten (Körperlänge P1, Kopfumfang P1, Lungengewicht P1, Körpergewicht P7 aufgrund fehlender Werte der Normoxie-Tiere), wurden mit t-Test für unverbundene Stichproben statistisch ausgewertet.

Tabelle Nr. 2: Werte der Mäuseauxologie, angegeben als Mittelwert an Tag P1, P7 und P14 (* $p < 0,05$)

Einteilung	Gewicht P1 (g)	Länge P1 (mm)	Kopf P1 (mm)	Lunge P1 (g)	Gewicht P7 (g)	Gewicht P14 (g)	Länge P14 (mm)	Kopf P14 (mm)	Lunge P14 (g)
Normoxie (Kontrolle)	1,57 (N = 8)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7,70 (N = 4)	41,85 (N = 4)	18,80 (N = 4)	0,117 (N = 4)
Hypoxie – Vitamin A	1,32* (N = 34) -16%	26,11 (N = 3)	10,54 (N = 3)	0,036 (N = 3)	3,72 (N = 15)	5,31* (N = 16) -31%	37,70 (N = 15) -10%	17,76 (N = 15) -5%	0,088* (N = 6) -25%
Hypoxie + Vitamin A	1,19* (N=29) -25%	24,75 (N = 4)	10,63 (N = 4)	0,033 (N = 4)	3,39 (N = 18)	4,89* (N = 13) -36%	34,31 (N = 13) -18%	17,55 (N = 11) -6%	0,079* (N = 11) -32%

4.1.1 Gewichtsentwicklung

Für die Gewichtsentwicklung wurden im Beobachtungszeitraum von zwei Wochen folgende Durchschnittswerte für die Gruppe 0 (Normoxie; $FiO_2 = 0,21$) gefunden: 1,57 g im postnatalen Stadium P1 ($n = 8$). Im postnatalen Stadium P7 wurden keine Daten ermittelt. Für das postnatale Stadium P14 wurde ein Durchschnittswert von 7,70 g ($n = 4$) bestimmt.

Innerhalb der Gruppe 1 (Hypoxie: $FiO_2 = 0,10$ / Hyperoxie: $FiO_2 = 0,70$; keine Vitamin A-Behandlung) ergaben sich folgende Durchschnittswerte: 1,32 g an P1 ($n = 34$), 3,72 g an P7 ($n = 15$) und 5,31 g an P14 ($n = 16$). Im Vergleich dazu zeigten sich im gleichen Zeitraum bei der

Gruppe 2 (Hypoxie: $\text{FiO}_2 = 0,10$ / Hyperoxie: $\text{FiO}_2 = 0,70$; Vitamin A-Behandlung) folgende Durchschnittswerte: 1,19 g an P1 ($n = 29$), 3,39 g an P7 ($n = 18$) und 4,89 g an P14 ($n = 13$).

Die Werte ergaben für das postnatale Stadium P1 in allen Gruppen signifikante Unterschiede: Zwischen der Gruppe 0 und 1 ergab sich eine mittlere Gewichts­differenz von 0,24 g ($p = 0,002$). Zwischen Gruppe 0 und 2 betrug sie 0,37 g ($p < 0,001$). Zwischen der Gruppe 1 und 2 wurde eine mittlere Gewichts­differenz von 0,13 g bestimmt ($p = 0,01$).

An P7 konnte nur die mittlere Gewichts­differenz von Gruppe 1 und 2 ermittelt werden. Sie betrug 0,33 g ($p = 0,245$).

Im postnatalen Stadium P14 ergaben sich nur für die mittleren Gewichts­differenzen der Gruppen 1 und 2 bezogen auf die Normoxie-Gruppe signifikante Unterschiede. Innerhalb der Gruppe 1 und 2 konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Die mittlere Gewichts­differenz für die Gruppen 0 und 1 war 2,39 g ($p = 0,006$). Für die Gruppen 0 und 2 ergab sich ein Wert von 2,81 g ($p = 0,002$). Zwischen den Gruppen 1 und 2 lag die mittlere Gewichts­differenz bei 0,42 g ($p = 1,0$). Die Gewichtswerte sind in Abbildung 3, 4 und 5 dargestellt.

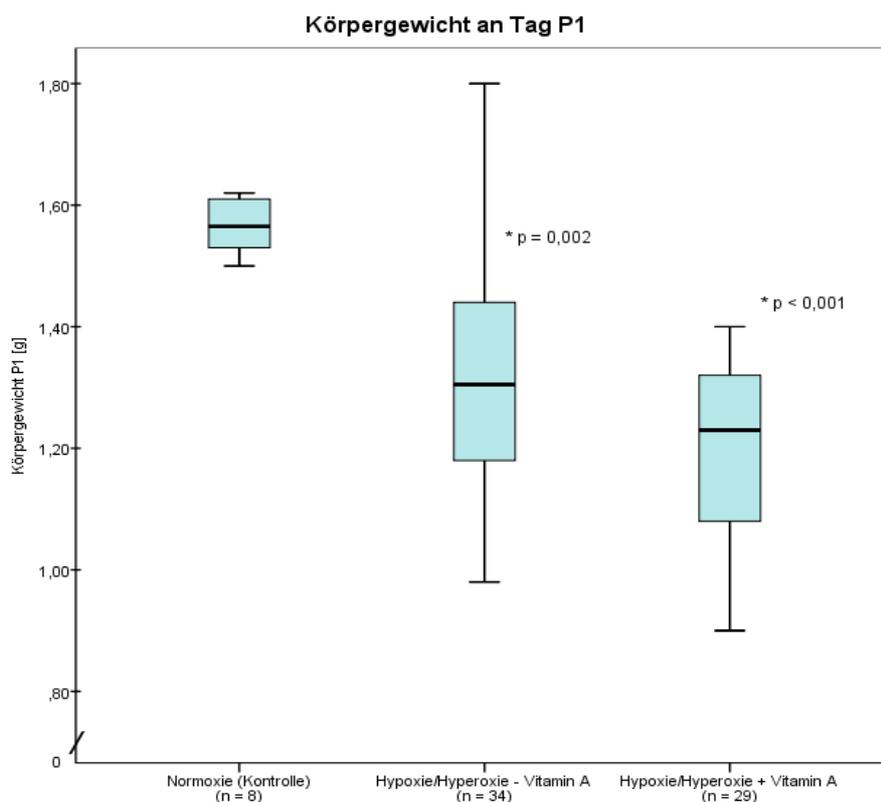


Abbildung Nr. 1: Schematische Darstellung des Körpergewichts an P1 der Normoxie- sowie der behandelten und unbehandelten Double-Hit-Gruppe

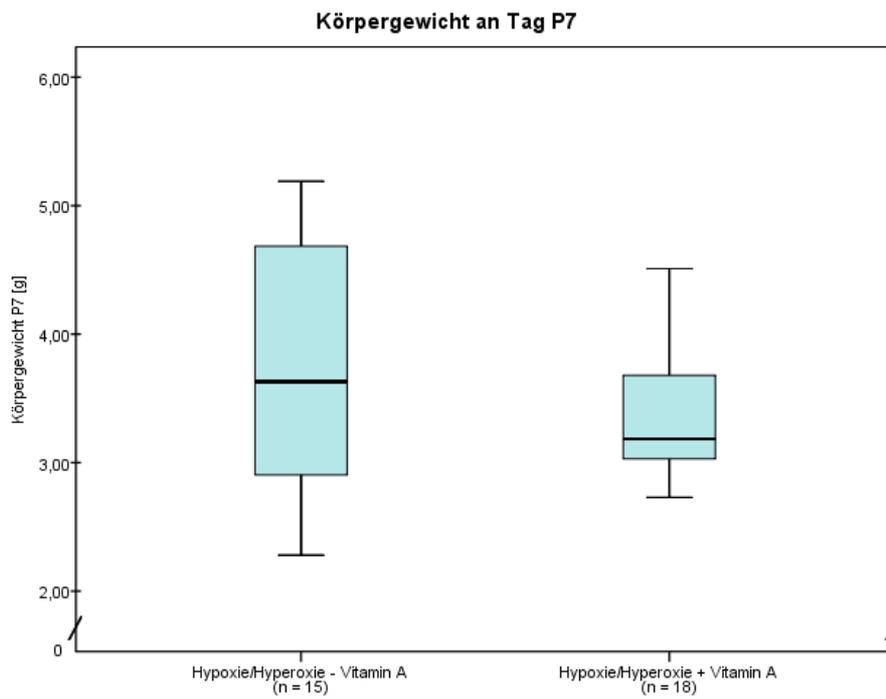


Abbildung Nr. 2: Schematische Darstellung des Körpergewichts an P7 der behandelten und unbehandelten Double-Hit-Gruppe

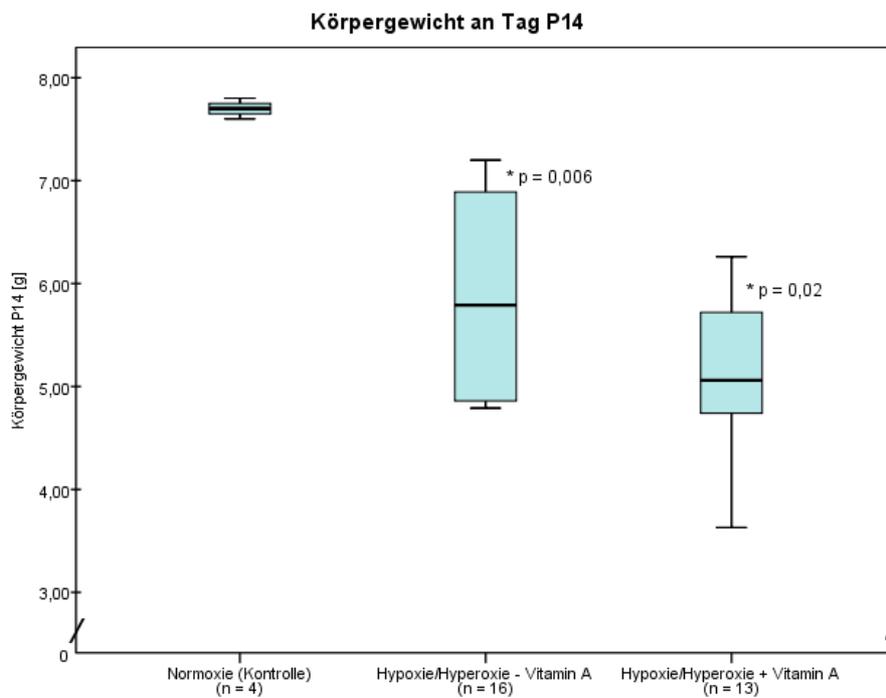


Abbildung Nr. 3: Schematische Darstellung des Körpergewichts an P14 der Normoxie- sowie der behandelten und unbehandelten Double-Hit-Gruppe

4.1.2 Körperlänge

Die Körperlänge wurde im postnatalen Stadium P1 und P14 vermessen. Für Gruppe 0 wurde die Körperlänge nur an P14 bemessen und ergab einen Mittelwert von 41,85 mm ($n = 4$). Für die Gruppe 1 ergab sich an P1 ein Wert von 26,11 mm ($n = 3$) und an P14 ein Wert von 37,70 mm ($n = 15$). In der Gruppe 2 wurde an P1 eine mittlere Körperlänge von 24,75 mm ($n = 4$) und an P14 eine Länge von 34,31 mm ($n = 13$) vermessen. Die mittlere Körperlängendifferenz an P1 zwischen Gruppe 1 und 2 belief sich auf 1,35 mm ($p = 0,356$).

Für die mittlere Körperlängendifferenz zwischen den jeweiligen Gruppen im postnatalen Stadium P14 ergab sich kein signifikanter Unterschied: Zwischen Gruppe 0 und 1 betrug die mittlere Körperlängendifferenz 4,15 mm ($p = 0,819$) – zwischen Gruppe 0 und 2 waren es 7,54 mm ($p = 0,166$) und zwischen Gruppe 1 und 2 waren es 3,39 mm ($p = 0,56$).

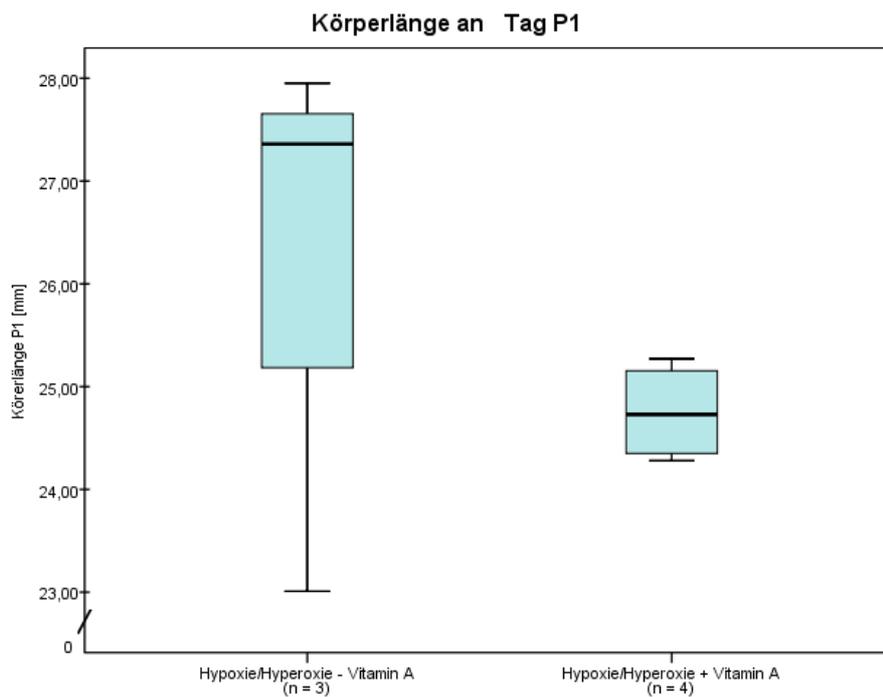


Abbildung Nr. 4: Schematische Darstellung der Körperlänge an P1 der behandelten und unbehandelten Double-Hit-Gruppe

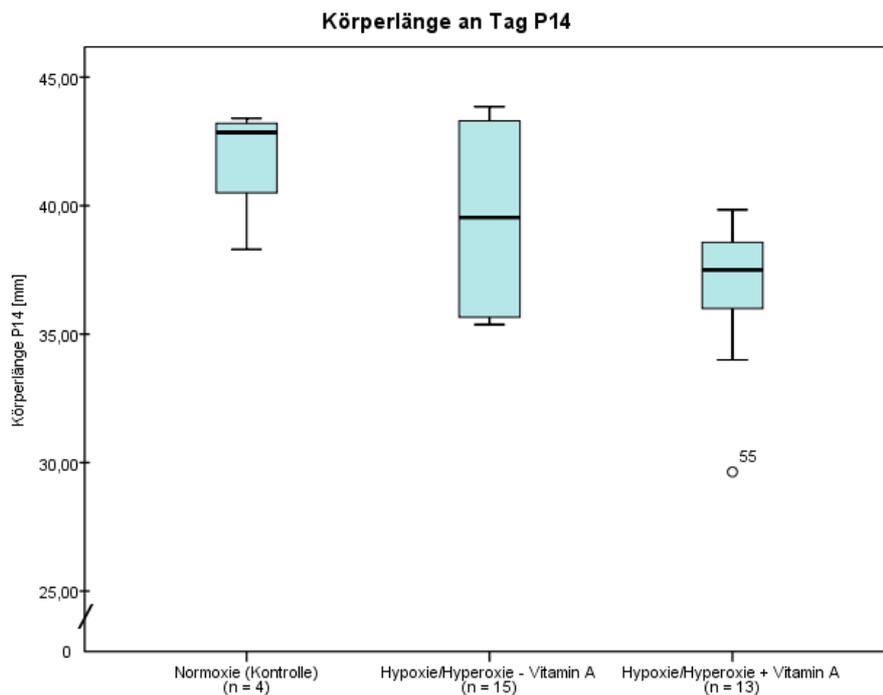


Abbildung Nr. 5: Schematische Darstellung der Körperlänge an P14 der Normoxie- sowie der behandelten und unbehandelten Double-Hit-Gruppe

4.1.3 Fronto-okzipitaler Durchmesser

Auch die Kopflänge wurde im postnatalen Stadium P1 und P14 bestimmt. Für Gruppe 0 wurde die Kopflänge wie auch die Körperlänge nur an Tag P14 vermessen und ergab einen Mittelwert von 18,80 mm ($n = 4$). Für die Gruppe 1 wurde an P1 ein Wert von 10,54 mm ($n = 3$) und an P14 ein Wert von 17,76 mm ($n = 15$) ermittelt. Für die Gruppe 2 war für P1 ein Wert von 10,63 mm ($n = 4$) und für P14 ein Wert von 17,55 mm ($n = 11$) bestimmt worden. Die mittlere Kopflängendifferenz an P1 war nicht signifikant verändert und ergab bei der Gruppe 1 und 2 einen Wert von 1,35 mm ($p = 0,356$). Im postnatalen Stadium P14 konnte für die mittlere Kopflängendifferenz der einzelnen Gruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Zwischen Gruppe 0 und 1 wurde eine mittlere Kopflängendifferenz von 1,04 mm ($p = 1,0$) ermittelt. Zwischen Gruppe 0 und 2 lag der Wert bei 1,25 mm ($p = 0,81$). Zwischen Gruppe 1 und 2 wurde eine mittlere Differenz von 0,21 mm bestimmt ($p = 1,0$).

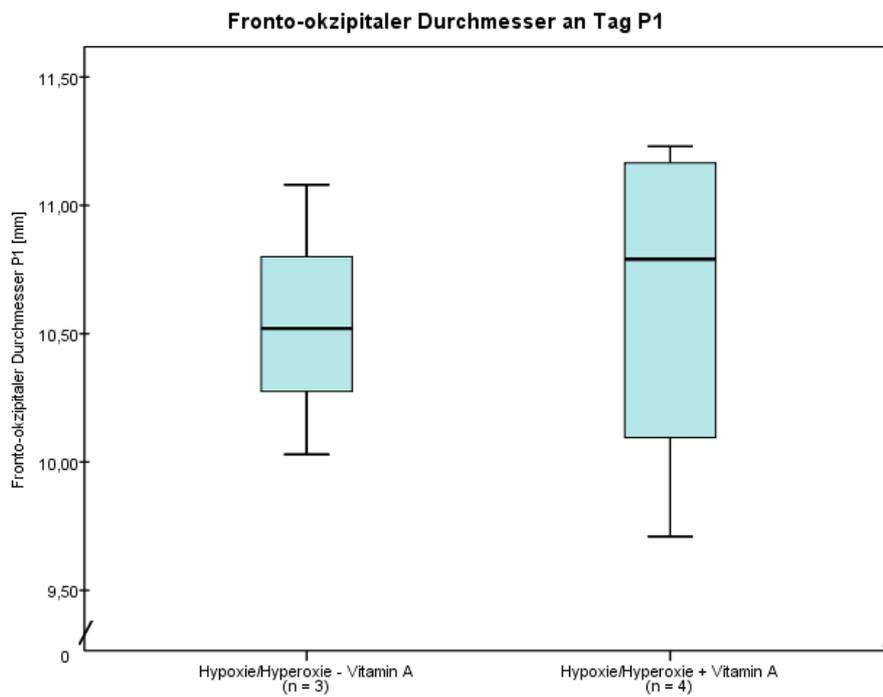


Abbildung Nr. 6: Schematische Darstellung des frontookzipitalen Durchmessers an P1 der behandelten und unbehandelten Double-Hit-Gruppe

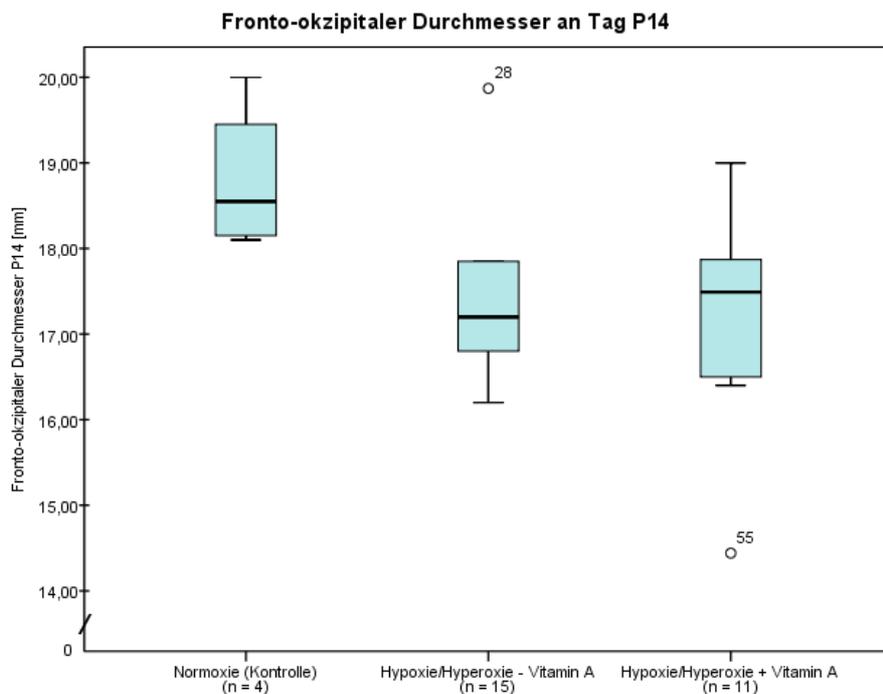


Abbildung Nr. 7: Schematische Darstellung des frontookzipitalen Durchmessers an P14 der Normoxie- sowie der behandelten und unbehandelten Double-Hit-Gruppe

4.1.4 Lungengewicht

Das Lungengewicht wurde im postnatalen Stadium P1 und P14 bestimmt. Für Gruppe 0 wurde das Lungengewicht nur an P14 identifiziert und ergab einen Mittelwert von 0,12 g ($n = 4$). Für die Gruppe 1 wurde an P1 ein Wert von 0,036 g ($n = 3$) und an P14 ein Wert von 0,088 g ($n = 6$) gemessen. Für die Gruppe 2 ergab sich für P1 ein Wert von 0,033 g ($n = 4$) und für P14 ein Wert von 0,079 g ($n = 11$). Die mittlere Lungengewichtsdifferenz an P1 lag zwischen Gruppe 1 und 2 bei 0,0038 g ($p = 0,457$). Im postnatalen Stadium P14 wurde für die mittlere Lungengewichtsdifferenz für die Gruppe 1 und 2 im Vergleich zur Gruppe 0 ein signifikanter Unterschied festgestellt. Zwischen der behandelten Gruppe 2 und der unbehandelten Gruppe 1 zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Lungengewicht. So wurde für Gruppe 0 und 1 eine mittlere Lungengewichtsdifferenz von 0,029 g ($p = 0,01$) bestimmt. Zwischen Gruppe 0 und 2 lag der Wert bei 0,0385 g ($p < 0,001$). Zwischen Gruppe 1 und 2 wurde eine mittlere Differenz von 0,0096 g ($p = 0,514$) registriert.

An P1 und P14 wurde das Lungengewicht zusätzlich ins Verhältnis zum Körpergewicht gesetzt. An P1 machte in Gruppe 1 das Lungengewicht 2,38 % des Körpergewichts aus. In Gruppe 2 waren es 2,71 % des Körpergewichts. Zwischen den Gruppen wurde keine Signifikanz erreicht ($p = 0,566$).

An P14 machte in Gruppe 0 das Lungengewicht 1,52 % des Körpergewichts aus. In Gruppe 1 waren es 1,50 % des Körpergewichts und in Gruppe 2 war das Lungengewicht 1,64 % des Körpergewichts. Zwischen den einzelnen Gruppen konnte keine Signifikanz festgestellt werden ($p = 1,0$ für Gruppe 0 und 1, $p = 0,858$ für Gruppe 0 und 2 und $p = 0,449$ für Gruppe 1 und 2)

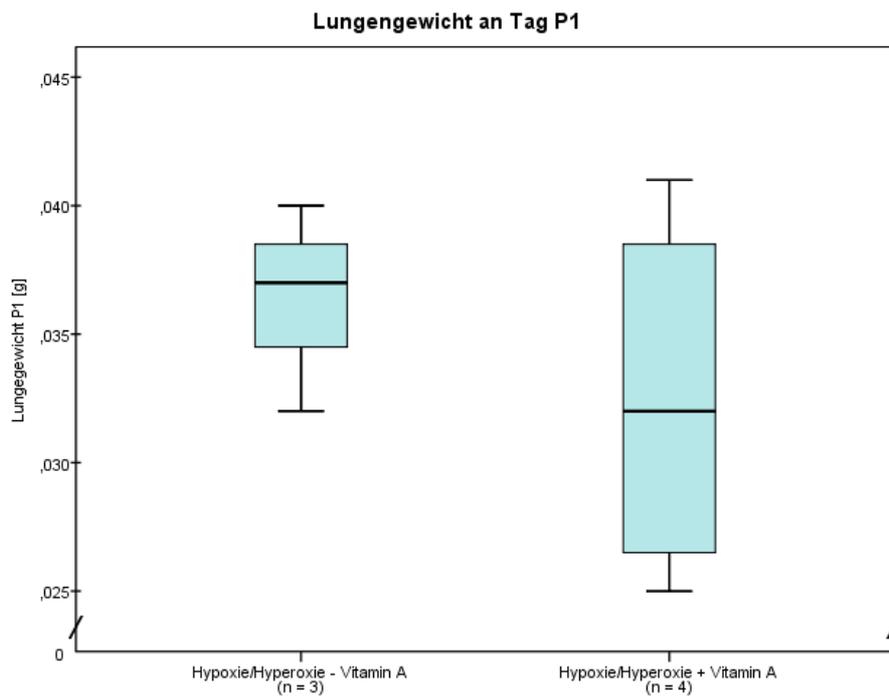


Abbildung Nr. 8: Schematische Darstellung des Lungengewichts an P1 der behandelten und unbehandelten Double-Hit-Gruppe

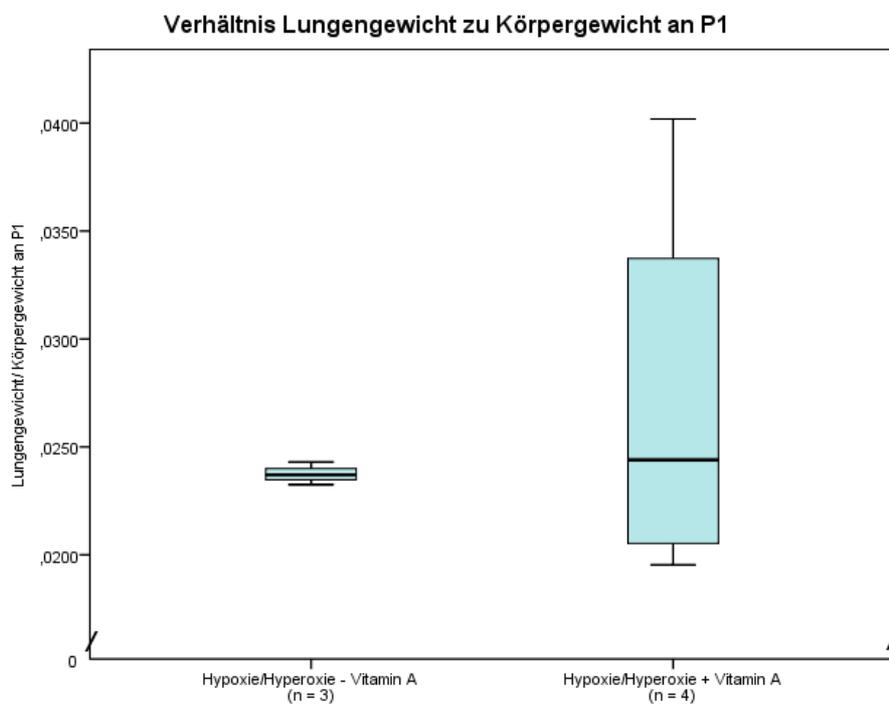


Abbildung Nr. 9: Schematische Darstellung des Verhältnis des Lungengewichts zum Körpergewicht an P1 der Normoxie-Gruppe sowie der behandelten und unbehandelten Double-Hit-Gruppe

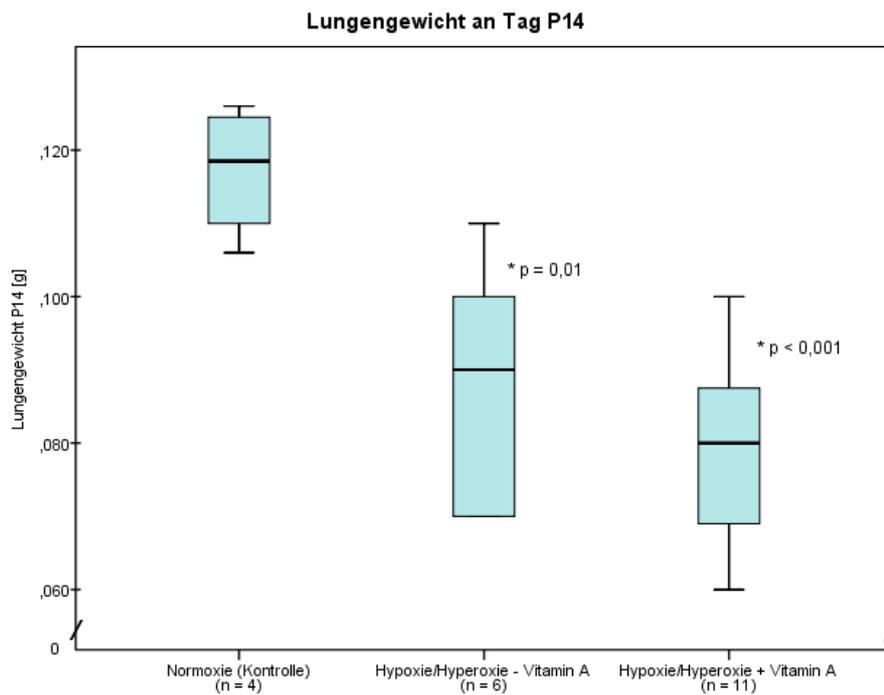


Abbildung Nr. 10: Schematische Darstellung des Lungengewichts an P14 der Normoxie-Gruppe sowie der behandelten und unbehandelten Double-Hit-Gruppe

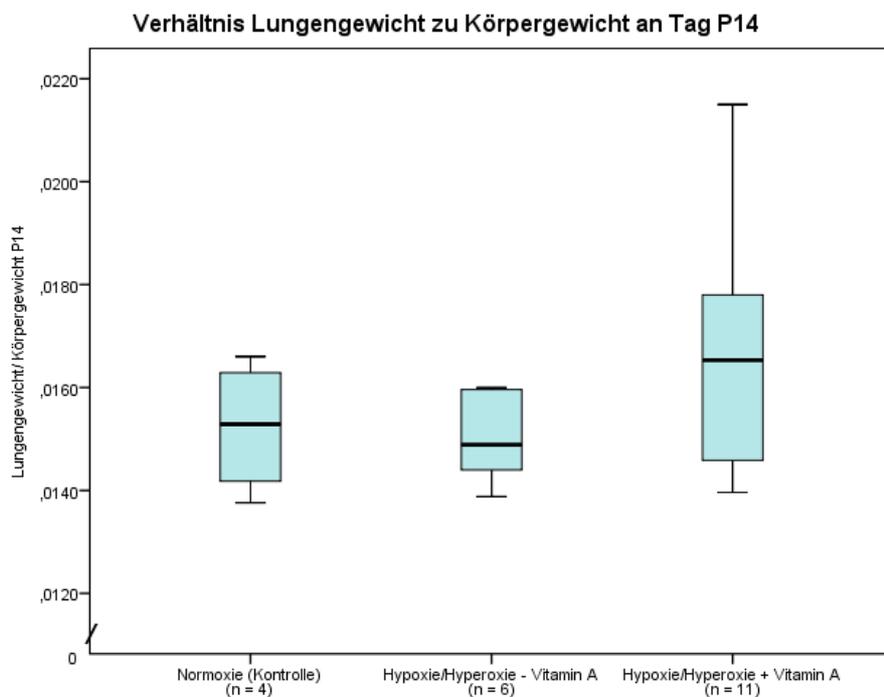


Abbildung Nr. 11: Schematische Darstellung des Verhältnis des Lungengewichts zum Körpergewicht an P14 der Normoxie-Gruppe sowie der behandelten und unbehandelten Double-Hit-Gruppe

4.2 Versuch 2: *Einfluss von Vitamin-A auf die relative Genexpression verschiedener Gene an P14 im Double-Hit-Mausmodell.*

In diesem Versuch wurden verschiedene Gene untersucht, die für die Lungenentwicklung von Bedeutung sind. Die Tabelle Nr. 3 zeigt die relative Expression der Zielgene der Double-Hit-Gruppen 1 (Hypoxie/Hyperoxie – Vitamin-A) und 2 (Hypoxie/Hyperoxie + Vitamin-A) an P14. Die relative Expression wurde mit der ddCT-Methode berechnet und in Relation zu den Lungen der Normoxie-Kontrolle an P14 gesetzt. Die mRNA-Expression der Gene IGF-1, TGF- β 1 und TGF- β 2 zeigte im Vergleich zur Normoxie-Kontrolle in beiden Hypoxie-/Hyperoxie-Gruppen eine Heraufregulation. Die Expression von IGF-1 in Gruppe 1 war im Vergleich zur Normoxie-Gruppe um das 4,95-fache erhöht ($p < 0,001$), in Gruppe 2 um das 5,17-fache ($p < 0,001$). Zwischen Gruppe 1 und 2 konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0,94$).

Die TGF- β 1-Expression war in Gruppe 1 um das 3,74-fache ($p = 0,0089$) im Vergleich zur Normoxie-Gruppe und in der Gruppe 2 um das 2,63-fache ($p = 0,0037$) erhöht. Auch hier gab es zwischen Gruppe 1 und 2 keinen signifikanten Unterschied in der Genexpression ($p = 0,76$).

Die Expression von TGF- β 2 war im Vergleich zur Normoxie-Gruppe bei Gruppe 1 um das 2,88-fache erhöht ($p = 0,0089$) und in der Gruppe 2 um das 2,93-fache ($p < 0,001$). Zwischen Gruppe 1 und 2 zeigte sich für die TGF- β 2-Expression kein signifikanter Unterschied ($p = 0,946$).

Die Genexpression von TGF- β 3 war in Gruppe 1 um das 1,55-fache erhöht, wies aber keinen signifikanten Unterschied zur Normoxie-Gruppe auf ($p = 0,1323$). Gruppe 2 zeigte im Vergleich zur Normoxie-Gruppe eine 1,64-fache Erhöhung und offenbarte damit eine signifikante Heraufregulation der TGF- β 3-Genexpression ($p = 0,0216$). Zwischen Gruppe 1 und 2 konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden ($p = 0,9466$).

Die mRNA-Expression von mTOR in Gruppe 1 ergab im Vergleich zur Normoxie-Gruppe eine 2,13-fache Erhöhung ($p = 0,1274$) und somit keine signifikante Veränderung. Auch Gruppe 2 ließ mit einer 1,17-fachen Erhöhung keine signifikante Änderung zur Normoxie-Gruppe erkennen ($p = 0,6297$). Zwischen Gruppe 1 und 2 zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,76$).

Die VEGF-Genexpression ergab in Gruppe 1 im Vergleich zur Normoxie-Gruppe eine 1,49-fache Erhöhung ($p = 0,2356$), die nicht signifikant war. Bei Gruppe 2 wurde eine 1,04-fache, nicht signifikante Erhöhung beobachtet ($p = 0,8367$). Unter Vitamin-A-Behandlung ergab sich zwar eine Verminderung der VEGF-Expression, für die allerdings keine Signifikanz ermittelt werden konnte ($p = 0,76$).

Für Foxp3 wurde in der unbehandelten Gruppe eine 1,05-fache Erhöhung ($p = 0,9236$) und in der behandelten Gruppe eine 1,41-fache Erhöhung ($p = 0,3144$) beobachtet. Es ergab sich kein

signifikanter Unterschied zur Normoxie-Gruppe. Hier zeigte sich unter Vitamin-A-Behandlung ein leichter Anstieg der Genexpression von Foxp3. Eine Signifikanz konnte auch hier nicht identifiziert werden.

Die Genexpression von TTF-1 zeigte keinen Unterschied in den Double-Hit-Gruppen. Bei Gruppe 1 ergab sich zur Normoxie-Gruppe eine Erniedrigung auf das 0,86-fache ($p = 0,2663$) und in Gruppe 2 auf das 0,90-fache ($p = 0,573$). Zwischen Gruppe 1 und 2 ließ sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der TTF-1-Expression erkennen ($p = 0,94$).

Tabelle Nr. 3: Vergleich der relativen Genexpression unten genannter Gene der Double-Hit-Gruppen im Bezug auf die Genexpression der Normoxie-Gruppe, errechnet mittels ddCT-Methode der Mäuse an Tag P14 (* $p < 0,05$), ermittelt mit DataAssist.

Gene	Hypoxie – Vitamin-A	p-Wert	Regulation	Hypoxie + Vitamin-A	p-Wert	Regulation
IGF-1 (s)	4,95*	< 0,001	↑	5,17*	< 0,001	↑
TGF-β1 (s)	3,74*	0,0089	↑	2,63*	0,0037	↑
TGF-β2 (s)	2,88*	0,0089	↑	2,93*	< 0,001	↑
TGF-β3 (s)	1,55	0,1323	↔	1,64*	0,0216	↑
VEGF	1,49	0,2356	↔	1,04	0,8367	↔
mTOR	2,13	0,1274	↔	1,17	0,6297	↔
TTF-1	0,86	0,2663	↔	0,90	0,573	↔
Foxp3	1,05	0,9236	↔	1,41	0,3144	↔

4.3 Versuch 3: Einfluss von Vitamin-A auf die Zytokinexpression an Lebenstag P14 im Double-Hit-Mausmodell

Zur Bestimmung der Proteinmenge der Zytokine wurden Fragmente der einzelnen Lungen der Normoxie-Gruppe ($n = 4$), der Gruppe 1 ($n = 6$) und der Gruppe 2 ($n = 9$) verarbeitet (siehe Material und Methoden) und mit der Multiplex-Methode Luminex analysiert. Dargestellt werden konnten die Werte für IL-2, IL-1β und VEGF. Die Daten wurden erst auf Normalverteilung getestet und dann über die einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Post-hoc-Analyse ausgewertet. Für TNF-α, IL-6 und IL-10 lagen die ermittelten Werte zum größten Teil unterhalb der Nachweisgrenze, sodass keine aussagekräftige Statistik getroffen werden konnte.

Für IL-2 ergab sich in der Gruppe 0 ein Median von 4,33 pg/ml. In der Gruppe 1 wurde ein Median von 5,60 pg/ml und in der Gruppe 2 ein Median von 7,14 pg/ml erhoben. Zwischen den jeweiligen Gruppen ließ sich kein signifikanter Unterschied in der Expression von IL-2 erkennen ($p = 0,981$).

für die Gruppe 0 und 1; $p = 0,557$ für die Gruppe 1 und 2; $p = 0,099$ für die Gruppe 0 und 2).

Für IL-1 β wurde für die Normoxie-Gruppe ein Median von 28,70 pg/ml berechnet. Für die Gruppe 1 lag der Median bei 7,55 pg/ml. Der Wert für die Gruppe 2 war bei 19,24 pg/ml. Auch hier ergab sich keine Signifikanz ($p = 0,069$ für die Gruppe 0 und 1; $p = 0,199$ für Gruppe 1 und 2; $p = 1,0$ für die Normoxie-Gruppe und Gruppe 2). Gleichwohl könnte hier zwischen Gruppe 0 und 1 eine tendenzielle Verringerung gesehen werden.

Für VEGF fand man bei der Normoxie-Gruppe einen Median von 342,07 pg/ml. In der Gruppe 1 wurde ein Median von 375,51 pg/ml berechnet. Die Gruppe 2 ergab einen Wert von 371,21 pg/ml. Innerhalb der Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied in der VEGF-Expression festgestellt werden ($p = 1,0$ für die Normoxie-Gruppe und Gruppe 1; $p = 1,0$ für die Gruppe 1 und 2; $p = 1,0$ für die Normoxie-Gruppe und Gruppe 2).

Tabelle Nr. 4: Zytokinkonzentrationen (pg/ml) aus dem Gewebelysat der Lungen von Mäusejungtieren an P14 im Double-Hit-Modell. Die Werte sind angegeben als Median (Minimum-Maximum)

Zytokine	Normoxie	Hypoxie – Vitamin-A	Hypoxie + Vitamin-A
VEGF	342,07 (289,96-521,26)	375,51 (228,16-527,62)	371,21 (263,17-453,21)
TNF- α	n.d.	n.d.	n.d.
IL-1 β	28,70 (21,02-46,31)	7,55 (2,49-10,91)	19,24 (2,30-53,91)
IL-2	4,33 (3,72-57440)	5,60 (35052-85761)	7,14 (3,36-10,84)
IL-6	n.d.	n.d.	n.d.
IL-10	n.d.	n.d.	n.d.

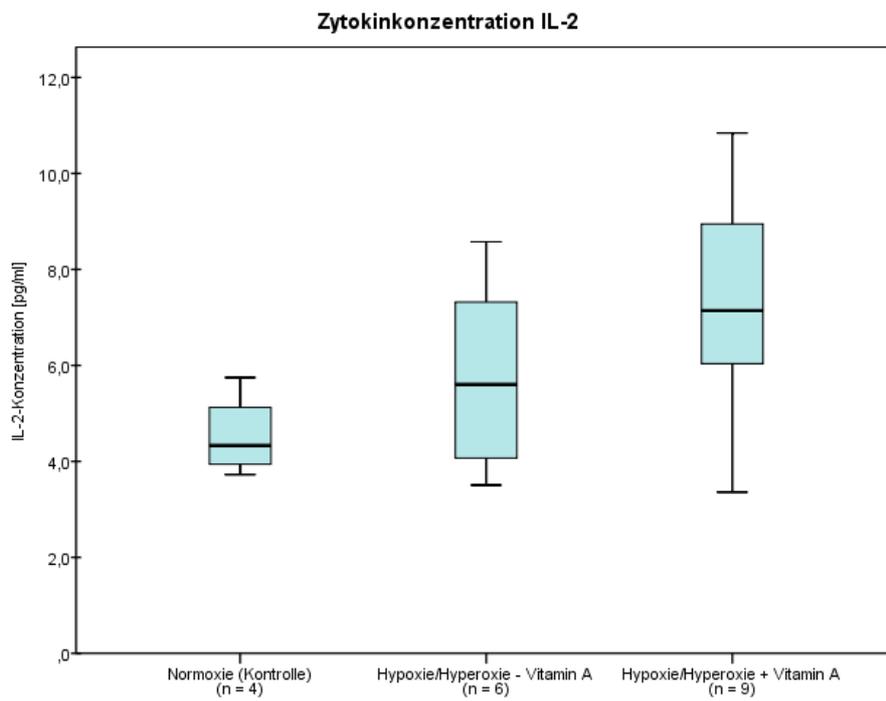


Abbildung Nr. 12: Schematische Darstellung der Zytokinexpression von IL-2 an P14 der Normoxie-Gruppe sowie der behandelten und unbehandelten Double-Hit-Gruppen

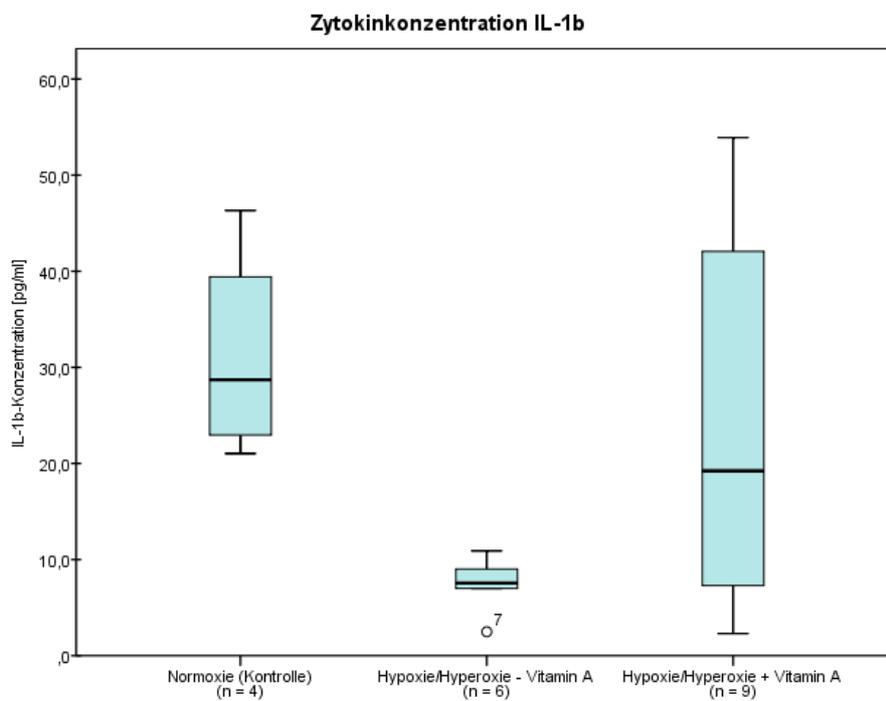


Abbildung Nr. 13: Schematische Darstellung der Zytokinexpression von IL-1 β an P14 der Normoxie-Gruppe sowie der behandelten und unbehandelten Double-Hit-Gruppen

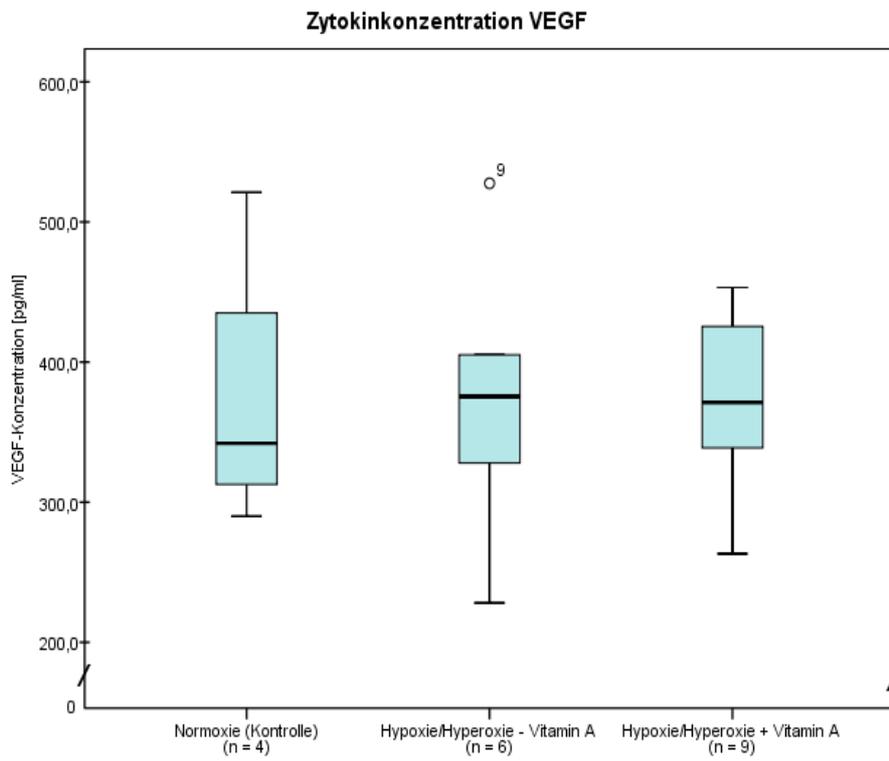


Abbildung Nr. 14: Schematische Darstellung der Zytokinexpression von VEGF an P14 der Normoxie-Gruppe sowie der behandelten und unbehandelten Double-Hit-Gruppen

5 Diskussion

5.1 Diskussion Mausmodell

Das Krankheitsbild der BPD wurde bereits in zahlreichen Studien mit unterschiedlichen Säugetierspezies nachgestellt (Gras-Le Guen et al., 2008; Bland et al., 2003; Warner et al., 1998; Coalson, Winter & deLemos, 1995; Manzano et al., 2014; Berger & Bhandari, 2014). Ein Großteil der Untersuchungen basieren auf Kleintiermodellen mit Mäusen oder Ratten. Das resultiert aufgrund der guten Haltungsmöglichkeiten dieser Tiere, der damit vergleichsweise leichten Realisation größerer Stichprobenzahlen und nicht zuletzt moderater Kosten (Berger & Bhandari, 2014).

Für die Nachstellung eines experimentellen Mausmodells spricht, dass die Entwicklungsabfolgen der Lungen bei Mäusen im Wesentlichen den Phasen der menschlichen Lungenentwicklung gleichen (Bäckström et al., 2011; Meller & Bhandari, 2012; Berger & Bhandari 2014). Doch folgende Unterschiede müssen beachtet werden: Bei Geburt befinden sich die Lungen der Mäuse im Unterschied zum Menschen (Schafen/Pavianen) in der sakkulären Entwicklungsphase, welche bis fünf Tage nach Geburt andauert (Amy et al., 1977; Bäckström et al., 2011; Gortner et al., 2013). Alveolen sind hier noch nicht vorhanden (Amy et al. 1977). Während die Lungen menschlicher Frühgeborener in dieser Entwicklungsphase aufgrund ihrer Unreife oft große gesundheitliche Probleme bereiten, erweisen sich die Lungen der Mäuse in diesem Stadium als voll funktionsfähig (Amy et al., 1977; Velten et al., 2010; Meller & Bhandari, 2012). Diese Differenzen im Ablauf der Lungenentwicklung zwischen Mensch und Maus gilt es in der experimentellen Nachstellung des Krankheitsbildes der BPD bei Mäusen zu beachten (Berger & Bhandari, 2014).

Neuere Befunde zu Kleintiermodellen zeigen, dass die alleinige Applikation postnataler Hyperoxie bei den Tieren zwar eine Lungenschädigung erzeugt, der komplexe pathophysiologische Entstehungsmechanismus der BPD hinsichtlich Frühgeburtlichkeit, Wachstumsrestriktion, Unreife der Lunge, Inflammationsreaktionen und schädigenden Therapiestrategien (mechanische Beatmung) auf diese Weise jedoch nur unzureichend reproduziert werden kann (Gortner et al., 2013; Hadchouel, Franco-Montoya & Delacourt 2014; Berger & Bhandari, 2014). Aufgrund dessen sind Modellmodifikationen konzipiert worden, die postnatale Hyperoxie mit einer pränatalen Schädigungskomponente kombinieren. Mittels der sogenannten „Second-“ oder „Double-Hit-Modelle“ werden Inflammationsreaktionen bzw. Schädigungen der Lunge noch im Mutterleib der

Tiere nachgestellt (Velten et al., 2010; Berger & Bhandari, 2014).

Die angemessenere Konzeptualisierung der multifaktoriellen Pathogenese der „neuen“ BPD durch ein Double-Hit-Modell wurde auch für die vorliegende Studie gewählt: Hier wurde die Applikation postnataler Hyperoxie mit einer Phase pränataler Hypoxie kombiniert. Der Vorteil des Double-Hit-Modells liegt darin, dass die BPD öfter bei Kindern auftritt, deren Mütter während der Schwangerschaft an Präeklampsie oder an plazentarer Dysfunktion erkrankten bzw. rauchten. Dies kann hypoxische Zustände hervorrufen, welche bei Frühgeborenen mit Wachstumsrestriktion, Lungenschädigung und erhöhtem Risiko für BPD einhergehen (Baker & Abman, 2013; Gortner et al., 2013; Gortner et al., 2005). In vorhergehenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die durch pränatale Hypoxiezustände beeinträchtigten Mäuse anfälliger auf postnatale Hyperoxie reagierten als Mäuse, die zuvor keiner pränatalen Schädigung ausgesetzt waren (Gortner et al., 2005; Gortner et al., 2013).

Im Rahmen dieser Arbeit zeigten sich bei den behandelten und unbehandelten Double-Hit-Mäusen systematische Auswirkungen im Sinne einer reduzierten körperlichen Gewichtsentwicklung. So waren die Tiere an P1 im Durchschnitt 20 % leichter und im Alter von zwei Wochen 34 % leichter als die Normoxie-Gruppe. Die Lungengewichtsentwicklung ergab an P1 keine signifikante Veränderung bei den Double-Hit-Tieren. Nach zwei Wochen konnte jedoch eine signifikante Gewichtsabnahme von ca. 14 % registriert werden. Das Körper- sowie Lungengewicht war ebenfalls in einer früheren Studie am Double-Hit-Modell unserer Arbeitsgruppe reduziert (Monz et al., 2013). Im Unterschied zur damaligen Versuchsreihe fällt in der jetzigen Untersuchung eine erhöhte Gewichts Differenz von Körper- und Lungengewicht der Double-Hit-Tiere zu der Normoxie-Gruppe im Alter von zwei Wochen auf. Untersuchungsbefunde zu menschlichen Frühgeborenen zeigen den Weg für eine mögliche Erklärung dieser Differenz: So ist bekannt, dass frühgeborene Kinder im Vergleich zu normalgeborenen Kindern über weniger Körperfettreserven verfügen, jedoch zudem einen erhöhten Energieverbrauch aufweisen. Eine suffiziente Ernährung dieser Kinder ist häufig nicht möglich (Abrams, 2001).

In unserer Versuchsreihe war die Ernährung der Jungtiere immer gegeben, da die Trennung von den Muttertieren einen zu starken Stressfaktor darstellte. Es ist somit anzunehmen, dass die Tiere nach Geburt durch die pränatale artifiziell erzeugte Lungenschädigung unter den erhöhten Sauerstoffkonzentrationen eine vermehrte Atemarbeit leisten mussten und damit einem erhöhten Energieverbrauch unterlagen. Dies konnte so in einer Studie an BPD erkrankten Säuglingen gezeigt werden: Im Vergleich zu anderen Frühgeborenen wiesen sie durch erhöhte Atemfrequenzen einen

um 20% erhöhten Energieverbrauch auf (de Meer et al., 1997).

Im Unterschied zur Gewichtsentwicklung wurden weder bei der Körperlänge noch bei der Kopflänge der Jungtiere in der vorliegenden Studie signifikante Änderungen zu den Normoxie-Mäusen gefunden. Dies widerspricht zunächst den Ergebnissen der vorhergehenden Studie unserer Arbeitsgruppe und den in der Literatur gefundenen Ergebnissen (Monz et al., 2013; Abrams, 2001). Mögliche Erklärungen dafür können Unterschiede im Versuchsablauf, Differenzen der verwendeten Sauerstoffkonzentration, Behandlung der Tiere mit Vitamin A sowie die Anzahl an Stichproben sein.

Festzuhalten ist, dass dies die erste Studie zu Vitamin-A Behandlung im Double-Hit-Modell ist. Das Modell bietet daher die Möglichkeit viele noch unverstandene Pathomechanismen im Rahmen der BPD zu untersuchen und therapeutische Strategien zu entwickeln.

5.1.1 Annahmen zur Vitamin-A-Therapie im Rahmen des Double-Hit Mausmodells

Ein Zusammenhang mit der Entstehung der BPD und geringen Vitamin-A-Plasmakonzentrationen bei frühgeborenen Kindern wird angenommen: Sowohl eine maternale Vitamin-A-Defizienz als auch eine verminderte Speicherfähigkeit von Vitamin-A aufgrund geringer Fettdepots bei frühgeborenen Kindern können maßgeblich zu einer verschlechterten Lungenfunktion beitragen (Shenai, Chytil & Stahlman, 1985; Mactier & Weaver, 2005; Spears et al., 2004, Chabra et al., 2013, Agostoni et al., 2010). Frühgeborene sind deshalb auf eine kontinuierliche externe Zufuhr des Vitamins angewiesen (Shenai, Chytil & Stahlman, 1985; Mactier & Weaver, 2005; Chabra et al., 2013). Die aktuellen Leitlinien empfehlen eine tägliche Dosis von 400-1000 µg/kg/KG (= 1320 – 3300 IU/kg/KG) (Agostoni et al., 2010). Das heißt, bezüglich der Dosis ist eine Schwankungsbreite zu verzeichnen. Des Weiteren existiert keine einheitliche Lehrmeinung zum richtigen Zeitpunkt, der Art und Weise und der Form der Vitamin-A-Supplementation bei Frühgeborenen, obwohl heute diese Behandlungsweise auf den meisten neonatologischen Stationen erfolgt (Mactier & Weaver, 2005; Pierce et al., 2007; Darlow & Graham, 2011; Chabra et al., 2013). Die orale Applikation kann, sobald die enterale Ernährung möglich ist, erfolgen und wird aktuell bevorzugt durchgeführt (Wardle et al., 2001; Mactier & Weaver, 2005). Bei den extrem kleinen Frühgeborenen (ELBW Kindern) ist dies jedoch aufgrund deren Unreife mit Schwierigkeiten verbunden und konnte bisher nicht die gewünschten positiven Therapieeffekte zeigen (Wardle et al., 2001; Mactier & Weaver, 2005). Eine Studie zur hochdosierten oralen Vitamin-A-Supplementation bei extrem kleinen Frühgeborenen (ELBW Kindern) ist noch ausstehend (Meyer & Gortner, 2014). Bisher wird Vitamin-A bei diesen Kindern meist intramuskulär verabreicht (Mactier & Weaver, 2005). Trotz

guter therapeutischer Ergebnisse wird die intramuskuläre Supplementation aufgrund der wiederholten schmerzhaften Injektionen nicht routinemäßig angewendet (Tyson et al., 1999; Wardle et al., 2001; Darlow & Graham 2011; Meyer & Gortner, 2014). Andere Studien gehen noch weiter und empfehlen die Supplementation von Vitamin-A bereits bei schwangeren Müttern, um so eine genügend hohe Anreicherung mit Vitamin-A im Nabelschnurblut zu erzielen. Auch hier besteht die Option schon pränatal einen möglichen Einfluss auf die Lungenentwicklung zu haben (Mactier & Weaver, 2005; Doi, Sugimoto & Puri, 2009; Babu & Sharmila, 2010; Guimarães et al., 2012). Zu beachten ist jedoch, dass sehr hohe Vitamin-A-Plasmaspiegel während der Schwangerschaft mit einer erhöhten Rate an Fehlbildungen bzw. Fehlgeburten einhergehen kann (Miller et al., 1998). Eine Anwendung von Vitamin-A in der Spätschwangerschaft scheint jedoch kein teratogenes Potenzial zu besitzen (Babu & Sharmila, 2010).

Der bisherige Forschungsstand zur pränatalen Verabreichung von Vitamin-A ist noch sehr limitiert. In der vorliegenden Arbeit wurde die hochdosierte (25.000 IU) pränatale intraperitoneale Zufuhr von Vitamin-A bei schwangeren Muttertieren gewählt. Untersucht wurden die Auswirkungen des Vitamins im Double-Hit-Modell. Dies wurde anhand von auxologischen Messungen sowie Genexpressionsanalysen und Zytokinlevel in den Lungen der Jungtiere untersucht. Im Folgenden werden die Auswirkungen von Vitamin-A auf die einzelnen Variablen detaillierter beschrieben.

5.1.2 Mäuseauxologie

Die intraperitoneale pränatale Verabreichung von 25.000 IU Vitamin-A an die trächtigen Mäuse ergab bei den Jungtieren eine Abnahme der Zielgrößen Körpergewicht im postnatalen Stadium P1 sowie eine Abnahme des Lungengewichts im postnatalen Stadium P14. Hinsichtlich der anderen Variablen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen zur unbehandelten Vergleichsgruppe. Bisherige Resultate zur pränatalen Vitamin-A-Applikation bei der BPD deuteten auf kurative Therapieaussichten hin (Doi, Sugimoto & Puri, 2009; Rutenstock et al., 2011). Das anderslautende Ergebnis der vorliegenden Studie ist daher einer kritischen Prüfung zu unterziehen. Bis dato war noch keine Studie zur Vitamin-A-Applikation im Double-Hit-Modell durchgeführt worden.

Eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse könnten die Dosierung sowie die zeitliche Verabreichung des Vitamin-A liefern. In drei Studien zur pränatalen Vitamin-A-Applikation am Nitrofen-induzierten CDH-Modell an Ratten wurde den Tieren eine Dosis von je 5 mg/kg/KG (umgerechnet etwa 8.300 IU/kg/KG) an drei aufeinanderfolgenden Tagen (E18, E19, E20) injiziert (Sugimoto et al., 2008; Doi, Sugimoto & Puri, 2009; Rutenstock et al., 2011). Möglicherweise wird dadurch eine bessere Resorption sowie Verteilung des Vitamins erreicht als in einer einmaligen

hochdosierten Verabreichungsform, wie sie in unserem Modell stattgefunden hat. Hier ist die Frage nach dem Grenzwert aufgeworfen, ab wann und in welcher Form eine sehr hohe Dosis an Vitamin-A zu Intoxikationserscheinungen bei Mäusen führen kann. Dergleichen zeigte sich beim Menschen durch einen erhöhten Hirndruck im Sinne einer hervortretenden Fontanelle, Kopfschmerzen, Schwindel, Erbrechen, Anorexie, Müdigkeit, Hautläsionen, Diplopie, Knochenschmerzen und erhöhten Leberwerte (Meyer & Gortner, 2014). Bei weiteren Forschungen sollte mitbedacht werden, ob eine einmalige hohe Dosis von Vitamin-A nicht als ein zusätzlicher Stressfaktor bei den Muttertieren erachtet werden kann.

Anders als in unserer Versuchsreihe wurde in den drei Studien das Vitamin-A sehr kurz vor der durch Kaiserschnitt induzierten Schwangerschaftsunterbrechung (an E21) verabreicht. Ob die frühe einmalige hochdosierte Verabreichung des Vitamin-A eine schädigende Wirkung auf die Feten im Mutterleib hat, muss nach unseren Ergebnissen in Erwägung gezogen werden.

Über die Gewichtsentwicklung der behandelten Tiere ist in den drei genannten Studien keine Aussage getroffen worden, sodass ein tiefergehender Vergleich mit der vorliegenden Untersuchung nicht unternommen werden kann. Hervorzuheben bleibt, dass es unter der hochdosierten pränatalen Verabreichung von Vitamin-A zu einer reduzierten somatischen Entwicklung der Jungtiere kam.

5.2 Veränderungen der Genexpression im Double-Hit-Modell

5.2.1 TGF- β 1-3

Für TGF- β 1 und 2 wurde eine signifikante Heraufregulation in der behandelten und unbehandelten Double-Hit-Gruppe im Vergleich zur Normoxie-Gruppe festgestellt. Diese Veränderungen sind analog zu den Ergebnissen, die bisher in experimentellen Modellen der BPD gefunden wurden (Bartram & Speer, 2004; Vicencio et al., 2004). Erhöhte TGF- β -Level führen zu fibroblastischen Umbaumechanismen der Lunge, welche vor allem eine Beeinträchtigung der Alveolarentwicklung darstellen und damit den pathologischen Zuständen der BPD sehr ähnlich sind (Vicencio et al., 2004; Bartram & Speer, 2004; Kwinta et al., 2008). Auch bei frühgeborenen Kindern mit BPD fand man sowohl im Bronchialaspirat als auch in peripheren Lungenabschnitten eine erhöhte TGF- β -Aktivität (Toti et al., 1997; Lecart et al., 2000).

Studien zur BPD zeigen, dass die exogene Zufuhr von Vitamin-A die TGF- β -Expression hemmt. (Redlich, Delisser & Elias 1995; Alejandre-Alcázar et al., 2007). Man hofft mittels einer solchen Applikation den Umbaumechanismen der Lunge entgegenwirken zu können, um die Ausbildung

einer BPD zu verhindern (Redlich, Delisser & Elias, 1995; Alejandre-Alcázar et al., 2007).

Im Rahmen unserer Untersuchung wurde unter der pränatalen Vitamin-A-Behandlung im Vergleich zur Normoxie-Gruppe jedoch eine Heraufregulation festgestellt. Hierbei zeigte sich kein Unterschied zur unbehandelten Double-Hit-Gruppe. Die gewünschte therapeutische Wirkung, die dem Vitamin-A zugeschrieben wird, konnte in diesem Fall nicht beobachtet werden.

Die TGF- β 3 Expression zeigte in der unbehandelten Double-Hit-Gruppe keine signifikante Veränderung. In einer vorhergehenden Studie am Double-Hit-Modell unserer Arbeitsgruppe wurden vergleichbare Ergebnisse gefunden (Monz et al., 2013). Unsere Resultate stimmen mit der Tatsache überein, dass TGF- β 1 im Rahmen von fibrotischen Umbaumechanismen der Lunge hochreguliert wird, während das TGF- β 3 in diesen Regionen entweder nicht vorkommt oder zumindest keine erhöhten Konzentrationen auftreten (Khalil et al., 1996; Coker et al., 2001; Bartram & Speer, 2004). Unter pränataler Vitamin-A-Behandlung ergab sich bei der TGF- β 3-Expression eine signifikante Heraufregulation. Als mögliche Erklärungen kommen in Betracht:

(1) Es ist bekannt, dass die drei Isoformen des TGF- β während der Entwicklung der Lunge in utero und auch postnatal in unterschiedlichen Bereichen der Lunge, sowie zu unterschiedlichen Zeiten herauf- und herabreguliert werden (Bartram & Speer, 2004; Schmid et al., 1991; Qiu et al., 2011). TGF- β 3 scheint sehr wichtig für die Alveolarentwicklung und die Surfactantproduktion zu sein: TGF- β 3-Null-Mutanten sind charakterisiert durch alveoläre Hypoplasie und verminderte Expression des Surfactant Proteins C (Kaartinen et al., 1995). Auch Vitamin-A ist wichtig für Septierungsvorgänge, die Alveolarisation und die Produktion der Surfactant Proteine (Chytil, 1996; Maden & Hind, 2004; Jobe & Bancalari, 2001; Massaro & Massaro, 2010). Eine regulatorische Komponente der TGF- β 3-Expression durch Vitamin-A wäre hier nicht auszuschließen.

(2) Des Weiteren wird TGF- β 3 eine mögliche Rolle in Gewebeheilungsprozessen zugeschrieben: Eine erhöhte Expression von TGF- β 3 in Lungen von Ratten erzeugte ein transientes, aber nicht progressives Fibrosierungsmuster. Anders als unter TGF β -1 konnte in diesem Fall eine Gewebeheilung beobachtet werden, die nicht in einem fibrotischen Umbau umliegender Strukturen resultierte (Ask et al., 2008). In einer weiteren Studie konnte TGF- β 3 die Progression von strahlungsinduzierter Fibrose hemmen (Xu et al., 2014).

Diese Hinweise sind auch für unser Modell relevant und sollten in weiteren Studien geprüft werden. Festzuhalten bleibt, dass Vitamin-A die Heraufregulation von TGF- β 3 zu fördern scheint.

5.2.2 IGF-1

Im Double-Hit-Mausmodell konnte eine signifikante Heraufregulation der IGF-1-Genexpression bei unbehandelter und behandelter Gruppe gezeigt werden. Dies entspricht den Ergebnissen, die in bisherigen experimentellen Modellen der BPD zur IGF-1-Expression gefunden wurden (Chetty et al., 2004; Capoluongo, Ameglio & Zuppi 2008; Kim et al., 2012; Monz et al., 2013). Während der Lungenentwicklung ist der IGF-1 Signalweg sowohl pränatal wie postnatal für alveoläre und vaskuläre Bildungsprozesse entscheidend (Schuller et al., 1995; Chetty et al., 2004; Nagata et al., 2007; Ruttenstock et al., 2011). IGF-1 gilt als wichtiger Mediator in der Pathogenese der BPD und vor allem inflammatorische Prozesse sowie Phasen der Hyperoxie fördern die Expression von IGF-1 in der Lunge (Chetty et al., 2004; Narasaraju et al., 2006; Kim et al., 2012). Als Reaktion auf Schädigungen der Lunge soll IGF-1 hier vor allem die Kollagen- und Fibroblasten-Produktion stimulieren (Chetty et al., 2004).

Die Behandlung mit Vitamin-A zeigte, wie schon beschrieben, eine Heraufregulation von IGF-1, jedoch keinen Unterschied zur unbehandelten Vergleichsgruppe. Recht vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich Auswirkung von Vitamin-A auf die IGF-1-Expression im Rahmen von Lungenerkrankungen wurden in konzeptionell wie methodisch differenten Studien festgestellt (Wong et al., 2006; Chetty & Nielsen, 2002). Man nimmt an, dass die antiproliferative Wirkung, die dem Vitamin-A zugeschrieben wird, auch einen Effekt auf die IGF-1-Expression hat (Wong et al., 2006; Chetty & Nielsen, 2002). So ergab eine Studie von Chetty und Nielsen am Hyperoxie-induzierten Lungenmodell der BPD eine Herabregulation der IGF-1-Expression durch die Therapie von Vitamin-A (Chetty & Nielsen, 2002). In einer weiteren Studie am Nitrofen-induzierten hypoplastischen Lungen-Modell der CDH (congenitale, diaphragmale Hernie) hatte die pränatale Gabe von Vitamin-A eine Heraufregulation der IGF-1-Expression zur Folge (Ruttenstock et al., 2011). Wie gesagt, es handelt sich um sehr verschiedene Modelle und – das muss betont werden – um unterschiedliche Erkrankungen der Lunge. In unserer Studie konnte dagegen nicht belegt werden, dass das Vitamin A die gewünschte therapeutische Wirkung zeigte. Die Ergebnislage zur Vitamin-A Therapie und IGF-1-Expression ist aktuell immer noch widersprüchlich und unzureichend, sodass weitere Forschungsinitiativen sinnvoll erscheinen.

5.2.3 mTOR

Im Rahmen unserer Versuchsreihe konnte kein signifikanter Unterschied der mTOR-Expression im Double-Hit-Modell gezeigt werden. Eine vorhergehende Studie unserer Arbeitsgruppe zum Double-

Hit Modell zeigte eine Herabregulation der mTOR-Expression bei den Double-Hit Tieren (Monz et al., 2013). Die Ergebnisse unserer Studie weichen ab von den bereits gefundenen (Monz et al., 2013). Es ist jedoch zu beachten, dass die genauen Mechanismen der mTOR-Regulation im Zusammenhang mit Lungenerkrankungen noch nicht vollständig aufgedeckt sind (Goncharova, 2013). Es gibt Hinweise dafür, dass mTOR über pulmonale Gefäßneubildungs- und Gefäßumbauprozesse in der Entstehung der pulmonalen Hypertonie eine wichtige Rolle spielt (Krymskaya et al., 2011; Goncharova, 2013). Chronische Hypoxie scheint im Rahmen dieses Krankheitsbildes den mTOR-Signalweg maßgeblich zu beeinflussen: Durch Heraufregulation der mTOR-Expression wird die Proliferation glatter Muskelzellen und Fibroblasten in den kleinen Lungengefäßen gefördert, welche wiederum für die erhöhten Druckbedingungen im Lungenkreislauf sorgen (Wang et al., 2014; Tan & Hagen, 2013; Goncharova, 2013). Die Forschungsarbeiten zur mTOR-Regulation im Zusammenhang mit Lungenerkrankungen konzentrieren sich hauptsächlich auf das Krankheitsbild der pulmonalen Hypertonie (Krymskaya et al., 2011; Goncharova, 2013; Wang et al., 2014). Dennoch entwickeln circa 18% der Kinder mit BPD im weiteren Verlauf ihrer Erkrankung eine pulmonale Hypertonie. Nur sehr wenige der erkrankten Kinder (6%) zeigen Zeichen der pulmonalen Hypertonie schon von Geburt an (Bhat et al., 2012). Mit unserem Modell sind aufgrund des kurzen Beobachtungszeitraums von zwei Wochen die chronische Entwicklung und die Spätkomplikationen, welche mit der BPD einhergehen, kaum erfassbar. Eventuell wäre ein längerer Beobachtungszeitraum erforderlich, um diese Auswirkungen zu erkennen und therapeutische Strategien zu entwickeln. Therapeutische Ansatzpunkte zielen darauf ab mTOR zu hemmen bzw. herunterzuregulieren (Goncharov et al., 2014; Wang et al., 2015; Kudryashova et al., 2015). Es existieren sehr wenige Studien, die einen Einfluss von Vitamin-A auf den mTOR-Signalweg untersucht haben: Eine Studie an embryogenen Stammzellen von Mäusen beschreibt einen Einfluss des Vitamins auf die beiden Sub-Komplexe von mTOR: mTORC1 und mTORC2 (Chen & Khillan, 2010). Inwieweit dies Konsequenzen für zukünftige therapeutische Aussichten haben könnte, bleibt abzuwarten. Im Rahmen unserer Studie konnte keine Auswirkung von Vitamin-A auf die mTOR Expression im Double-Hit-Modell festgestellt werden.

5.2.4 TTF-1

Die Ergebnisse der TTF-1-Expression zeigten weder bei der behandelten noch bei der unbehandelten Gruppe der Double-Hit-Mäuse eine signifikante Veränderung im Vergleich zur Normoxie-Gruppe.

Die Studienlage zur TTF-1-Expression im Zusammenhang mit der BPD ist äußerst begrenzt. Es gibt

erste Hinweise, dass die Expression von TTF-1 bei Frühgeborenen mit BPD in Regionen der Lunge fehlt, die durch epitheliale Schädigungsprozesse, wie akute Inflammationsreaktionen oder kollabierte Alveolen charakterisiert sind. Interessant ist, dass sich in regenerierenden Bereichen der Lunge wieder eine erhöhte TTF-1-Expression zeigt (Stahlman, Gray & Whitsett, 1996). Wert und Mitarbeiter vermuten, dass TTF-1 hier in komplexe Aktivierungs- bzw. Regulationsprozessen von Chemokinen und Zytokinen involviert ist, die die Reparaturprozesse in der Lunge steuern (Wert et al., 2002). Eine Herabregulation der TTF-1-Expression wurde auch im Hyperoxie-induzierten Maus-Modell der BPD gefunden (Chen et al., 2012). Unsere Ergebnisse zeigen in eine andere Richtung, als die in der Literatur berichteten. Aufgrund der insgesamt geringfügigen Datenlage kann eine Interpretation der uneinheitlichen Befunde zum aktuellen Zeitpunkt nur mit Vorsicht erfolgen: Wie auch schon im Abschnitt „Zytokine“ und „Foxp3“ diskutiert, könnte dies daran liegen, dass unser Modell weniger durch Inflammationsreaktionen auffällt und hier keine Auswirkung auf die TTF-1-Expression auftrat. Therapeutische Aussichten zum Einfluss von Vitamin-A auf die TTF-1-Expression sollten nicht vorschnell ausgeschlossen werden.

Eine Studie dazu wurde im Rahmen der CDH am Nitrofen-induzierte Modell der hypoplastischen Lunge durchgeführt. Gezeigt werden konnte, dass die pränatale Gabe von Vitamin-A zu einer „reversiblen“ Heraufregulation von TTF-1 in den Lungen der untersuchten Ratten führte (Gonzalez-Reyes et al., 2006). Hier sind Zusammenhänge zu neonatalen Lungenerkrankungen angedeutet, die noch nicht genügend mit Befunden abgesichert sind.

5.2.5 VEGF

In unserer Studie wurde kein signifikanter Unterschied der VEGF-Expression zwischen unbehandelter und behandelter Gruppe im Vergleich zu den Normoxie-Mäusen ermittelt. Analoge Ergebnisse sind in einem Experiment unserer Arbeitsgruppe im Double-Hit-Modell erhoben worden (Monz et al., 2013).

In einer systematische Übersichtsarbeit verglichen Meller und Bhandari diverse Studien im Hinblick auf die VEGF-Spiegel im Krankheitsbild der BPD bei Tieren und Menschen: Dabei wurden sehr verschiedene und sich teilweise widersprechende Aussagen zur VEGF-Expression gefunden. Die Autoren resümieren die diversen Studienergebnisse so, dass die VEGF-Level bei Frühgeborenen mit BPD eher erniedrigt bis normal sind (Meller & Bhandari, 2012).

Auch in Kleintiermodellen der BPD wurde unter Hyperoxie eine Abnahme der VEGF-Expression beobachtet (Hosford & Olson, 2003; Wang et al., 2007; Meller & Bhandari, 2012).

Als Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse der Studien zur VEGF-Expression führen Meller

und Bhandari (2012) an, dass einmal die Bestimmung der VEGF-Spiegel zu unterschiedlichen Zeitpunkten postnatal sowie die Gewinnung von VEGF aus verschiedenen Untersuchungsmaterialien erfolgte (bei Frühgeborenen häufig aus Tracheal- oder Bronchialaspirat, bei Tieren häufig aus einem Lungenlysat). Für die bessere Vergleichbarkeit von Tiermodellen zu der BPD beim Menschen empfehlen Meller und Bhandari (2012) das VEGF bei Mäusen vor P4 zu bestimmen, da dies etwa dem sakkulären Stadium der Lungenentwicklung entspricht, mit dem auch frühgeborene Kinder zur Welt kommen. Im Hinblick auf unsere Versuchsreihe war es nicht möglich eine Auswirkung auf die VEGF-Expression zu zeigen. Obwohl die Lungen der Mäuse im Double-Hit Modell durch die pränatale Phase der Hypoxie einer Schädigungskomponente unterlagen und somit Frühgeburtlichkeit nachgestellt werden sollte, könnte man prüfen, ob der Zeitpunkt der VEGF Bestimmung an P14 eventuell zu spät gewählt wurde: VEGF scheint mit zunehmendem Gestationsalter anzusteigen (Meller & Bhandari, 2012) Ebenso geht auch eine vermehrte Surfactantproduktion mit erhöhten VEGF-Spiegeln einher (Tsao & Wei, 2013). Die oben genannten pathophysiologischen Veränderungen im Krankheitsbild der BPD, die im Zusammenhang mit der VEGF-Expression stehen, könnten durch den späten Bestimmungszeitpunkt und den damit relativ erhöhten VEGF-Spiegeln in unserem Modell „maskiert“ worden sein.

Die VEGF-Expression der behandelten Gruppe gibt außerdem keinen Hinweis auf regulatorische Fähigkeiten der pränatalen Vitamin-A-Therapie. Dem Vitamin-A wird eine wichtige Rolle während der Gefäßentwicklung zugeschrieben (Saito et al., 2007). Die Wirkung des Vitamins auf die VEGF-Expression scheint sehr gewebe- und krankheitsspezifisch zu sein und kann demnach recht unterschiedlich ausfallen (Schmidt et al., 2012). Zur pränatalen Vitamin-A-Supplementation liegt bisher nur eine Studie vor, die die Auswirkung auf die VEGF-Expression im Rahmen der hypoplastischen Lungenerkrankung am Nitrofen-induzierten CDH-Modell beschreibt: Unter Vitamin-A-Therapie kam es zu einer „reversiblen“ Heraufregulation der VEGF-Expression bei den CDH-Tieren (Schmidt et al., 2012). Die Vergleichbarkeit zum Double-Hit-Modell muss noch eingehender sondiert werden. Diese Aufgabenstellung und auch die Forschungsergebnisse anderer Studien lassen weitere Analysen zweckmäßig erscheinen.

5.2.6 Foxp3

Mit unserem Double-Hit-Mausmodell konnte keine signifikante Änderung der Foxp3-Expression bei den behandelten und unbehandelten Tieren gezeigt werden.

Wie einleitend beschrieben ist Foxp3 wichtig für die Entwicklung und Regulation von T(reg)-Zellen und kann als spezifischer Marker für deren Funktion genutzt werden (Ziegler, 2006; Kang et al.,

2007). Foxp3+T(reg)-Zellen wird eine antiinflammatorische und das Immunsystem modulierende Wirkung zugeschrieben: Zum Beispiel gehen Autoimmun- und Inflammationserkrankungen mit einer geringeren T(reg)-Zell-Zahl einher (Fontenot, Gavin & Rudensky, 2003). Es gibt kaum Studien, die Foxp3 im Zusammenhang mit dem Krankheitsbild der BPD untersucht haben. Lediglich Misra und Mitarbeiter fanden verminderte CD4+T-Zellen im Nabelschnurblut von frühgeborenen Kindern, die im Verlauf eine moderate BPD entwickelten. Der Anteil an Foxp3+T(reg)-Zellen war zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht signifikant erniedrigt (Misra et al., 2015). Für die bessere Vergleichbarkeit zu unserem Modell wäre in dieser Studie eine nochmalige Bestimmung der Foxp3+T(reg)-Zellen zum Zeitpunkt der Manifestation der BPD vonnöten gewesen. Es bleibt festzuhalten, dass unser Modell keine immunmodulatorische Auswirkung des Foxp3 zeigt. Ein möglicher Grund für diese Tatsache ist, wie im Abschnitt „Zytokine“ diskutiert, dass sich unsere Versuchsreihe weniger durch Inflammationsreaktionen auszeichnet. Gleiches konnte auch an einer vorhergehenden Studie am Double-Hit-Modell unserer Arbeitsgruppe festgestellt werden und unterstreicht die Aussage, dass bei der „neuen“ BPD Inflammationsreaktionen im Gegensatz zur „alten“ Form der BPD eher weniger die pathophysiologischen Zeichen des Krankheitsbildes ausmachen, sondern daneben weitere Faktoren eine Rolle spielen, die für die Pathogenese der BPD verantwortlich sind (Monz et al., 2013).

Diese Datenlage gibt erste Hinweise, warum Vitamin-A keine Auswirkung auf die Foxp3-Expression gezeigt hat.

Das Vitamin-A spielt jedoch eine große Rolle in folgendem Zusammenhang: So fördert es zum Beispiel die Konversion von naiven CD4+ T-Zellen in Foxp3+T(reg)-Zellen (Kang et al., 2007; Raverdeau & Mills, 2014). Coleman und Mitarbeiter konnten zeigen, dass auch alveolare Makrophagen in der Lunge über Vitamin-A in der Lage sind diese naiven CD4+ Zellen in Foxp3+T(reg)-Zellen umzuwandeln (Coleman et al., 2013). Vitamin-A wird dadurch eine wichtige immunmodulatorische Rolle zugeschrieben (Raverdeau & Mills, 2014). Weitere Studien werden benötigt, um genauere Erkenntnisse über die inflammatorisch regulierende Komponente von Vitamin-A im Rahmen der BPD sowie der zeitlichen Abfolgen zu erlangen.

5.3 Zytokine

Das Krankheitsbild der BPD geht mit einem Ungleichgewicht an proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen einher (Rocha et al., 2012). Bei betroffenen Frühgeborenen wurden häufig erhöhte Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α gefunden (Yoon et al., 1997; Rocha et al., 2012; Köksal et al., 2012). Die antiinflammatorischen Zytokine wie IL-10 wurden bei diesen Kindern entweder vermindert oder gar nicht gebildet (McGowan et al., 2009; Oei et al., 2002). VEGF-Level waren entweder vermindert oder erhöht exprimiert (Bhatt et al., 2001; Chetty et al., 2004). Auch in diversen Tiermodellen konnten diese Zytokinveränderungen beobachtet werden (Bry & Lappalainen, 2006; Coalson et al., 1999; Cannizzaro et al., 2008). Für die normale Lungenentwicklung scheint ein ausgewogenes Verhältnis zwischen inflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen wichtig zu sein (McGowan et al., 2009; Rocha et al., 2012).

Im Unterschied zu diesen geschilderten Befunden ergaben sich im Rahmen unserer Untersuchungen keine Veränderungen der Zytokinexpression von IL-1 β , IL-2 und VEGF im Double-Hit-Modell. Für IL-6 und IL-10 waren die erhaltenen Werte zu gering, sodass hier keine belastbaren Aussagen getroffen werden konnten. Zwar wurde in den Untersuchungen für IL-1 β eine verminderte Konzentration bei der unbehandelten Double-Hit-Gruppe gemessen, die zwar eine Tendenz erkennen lässt, die aber nicht signifikant ($p = 0,069$) getestet werden konnte. Die Ergebnisse finden sich im Einklang mit Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an einer vorausgehenden Studie am Double-Hit-Modell: In den zu untersuchenden Gruppen konnte keine Erhöhung der Zytokinlevel bestimmt werden. Interessant ist, dass in dieser Studie ebenfalls verminderte IL-1 β -Level in der unbehandelten Gruppe entdeckt worden sind (Monz et al., 2013). Worin diese Unterschiede zu den oben aufgeführten Studien liegen, bedarf weiterer Überlegungen. Eine Erklärung könnten die unterschiedlichen Rahmenbedingungen der einzelnen Studien sein. So wurde in den Untersuchungen an Kindern mit BPD das Material für die Bestimmung der Zytokinpiegel aus der bronchoalveolären Lavage, Nabelschnurblut, Fruchtwasser oder Plazentagewebe bei schwangeren Frauen bzw. Frühgeborenen gewonnen (Oei et al., 2002; McGowan et al., 2009; Yoon et al., 1997; Rocha et al., 2012; Köksal et al., 2012). Dies erfolgte meist pränatal oder direkt nach der Geburt. Es ist zu diskutieren, dass die Zytokinlevel des Untersuchungsmaterials zum einen nicht die genauen Zustände in der Lunge der Kinder widerspiegeln und zum anderen zu diesem Zeitpunkt eher das pathophysiologische Bild der Folge einer pränatalen Inflammationsreaktion (zum Beispiel der Chorioamnionitis) wiedergeben als das der BPD (Ambalavanan et al., 2009). In der Literatur wird kontrovers darüber diskutiert, ob pränatale Inflammationsreaktionen wie die Chorioamnionitis Risikofaktoren in der Entstehung einer BPD darstellen (Kent & Dahlstrom, 2004; Malek et al.,

2002; Lacaze-Masmonteil, 2014). Kent und Dahlstrom untersuchten 241 frühgeborene Kinder, fanden jedoch keine Assoziation zwischen Chorioamnionitis und der BPD (Kent & Dahlstrom, 2004). Eine systematische Übersichtsarbeit hierzu erbrachte, dass viele Studien Störfaktoren beinhalten und der Chorioamnionitis damit bisher zu viel Bedeutung im Rahmen der BPD entgegengebracht wurde (Lacaze-Masmonteil, 2014). Zwei weitere Studien berichteten sogar über ein vermindertes Risiko der Ausbildung einer BPD, wenn die Kinder zuvor einer Chorioamnionitis ausgesetzt waren. Dieses Risiko stieg jedoch an, sobald die Kinder postnatal zudem eine Sepsis entwickelten (Van Marter et al., 2002; Lahra, Beeby & Jeffery, 2009). Unser Double-Hit-Ansatz, der in der Forschung bislang relativ selten verwirklicht wurde, erschwert die Vergleichbarkeit zu den meisten – methodisch anders ausgerichteten – Studien an frühgeborenen Kindern. Vieles deutet darauf hin, dass eine postnatale Infektion oder zumindest das Zusammenspiel von pränatalen und postnatalen Inflammationsreaktionen bedeutsamer für die Entstehung einer BPD sind, als lediglich eine pränatale Infektion (Van Marter et al., 2002; Lahra, Beeby & Jeffery, 2009; Jensen & Schmidt, 2014).

In den Studien an Tiermodellen ist die Kompatibilität zu unserem Modell ähnlich diffizil, da diese sich zu unserem Versuchsaufbau doch sehr unterscheiden: Invasive Beatmung bei zwei Wochen alten Mäusen führte zu erhöhten IL-6-Level (Cannizzaro et al., 2008). Bei beatmeten Pavianen wurden erhöhte IL-6- und IL-8-Level gefunden, hier zeigte sich jedoch kein Anstieg der IL-1 β - und IL-10-Level (Coalson et al., 1999). Zwei Studien am Kleintiermodell fanden nach pränataler LPS-Injektion und postnataler Hyperoxie eine verstärkte IL-6-Expression (Kim et al. 2010; Lee et al. 2010). Bry und Lappalainen entwickelten ein transgenetisches Modell an Mäusen, die IL-1 β verstärkt exprimierten und fanden sehr ähnliche pathophysiologische Zustände wie sie im Krankheitsbild der BPD erhoben werden konnten (Bry & Lappalainen, 2006).

Die BPD zeichnet sich vor allem durch ihre multifaktorielle Genese aus. Ob die vermehrte Expression eines einzelnen Gens die Pathophysiologie der BPD adäquat nachstellen kann, bleibt fraglich (Berger & Bhandari, 2014). Ebenso bleibt offen, inwieweit Inflammationsreaktionen und Zytokinlevel die Pathogenese der BPD beeinflussen (Ambalavanan et al., 2009; Berger & Bhandari, 2014).

In Zusammenschau dieser Befunde zeichnet sich unser Modell weniger durch Inflammationsreaktionen aus und gibt Anlass zu Überlegungen, dass es Prozesse unabhängig von erhöhten Zytokinkonzentrationen geben muss, die für die Entstehung einer BPD verantwortlich sind (Monz et al., 2013).

Daraus ist abzuleiten, dass Vitamin-A in unserer Studie nicht die gewünschte therapeutische Wirkung auf die Zytokinproduktion zeigen konnte. Dem Vitamin-A wird, wie schon vorher beschrieben, unter anderem auch eine immunmodulatorische Rolle zugeteilt (Iwata et al., 2004; Raverdeau & Mills, 2014; Bry & Lappalainen 2006). Frühgeborene mit geringen Vitamin-A-Reserven gelten als anfällig für Inflammationskrankheiten (Ross & Stephensen, 1996). Eine Studie von James et al. (2013) am Hyperoxie-induzierten-Mausmodell fand, dass die postnatale Gabe von Vitamin-A eine erhöhte Zytokinproduktion von IL-1 β und IL-8 verhinderte. Diese immunmodulatorische Rolle durch Vitamin-A konnte in unserem Modell nicht festgestellt werden. Weitere Studien werden benötigt, um mögliche Auswirkungen von Vitamin-A im Krankheitsbild der BPD zu untersuchen.

5.4 Schlussfolgerung

Es bleibt festzuhalten, dass die Kombination von pränataler Hypoxie und postnataler Hyperoxie, wie wir sie in unserem Double-Hit-Modell implementierten, Auswirkungen hinsichtlich einer beeinträchtigten körperlichen Entwicklung zeigten. Ebenso konnten Veränderungen in der Expression einiger für die Lungenentwicklung wichtiger Gene festgestellt werden, die im Zusammenhang mit der Entwicklung der BPD stehen. Unser Modell zeichnet sich nur durch geringfügige Inflammationsreaktionen aus. Dies trifft ebenso für die Pathophysiologie der „neuen“ Form der BPD zu (Husain, Siddiqui & Stocker, 1998; Jobe, 1999; Monz et al., 2013).

Die ursprünglich angestrebten therapeutischen Ziele, die mit der pränatalen Gabe von Vitamin-A erreicht werden sollten, konnten nicht vollständig realisiert werden. Überdies scheint Vitamin-A einen negativen Effekt auf das Wachstum der Mäusejungen gehabt zu haben. Mögliche Änderungen in der Applikationsform und im gewählten Zeitpunkt wären für kommende Versuchsreihen zu berücksichtigen.

Die Auswirkung von Vitamin-A auf die Genexpression von TGF- β 3 weist auf therapeutische Ansatzpunkte im Rahmen der BPD hin. Die Heraufregulation des Gens durch Vitamin-A gibt Hinweise auf nicht-fibrotische Wundheilungsprozesse in der Lunge und könnte außerdem die Surfactantproduktion positiv beeinflussen (Kaartinen et al., 1995; Chytil, 1996; Ask et al., 2008; Massaro & Massaro, 2010). Weitere Studien sind angezeigt, um diese Auswirkungen zu analysieren. Das hier dargestellte Modell ist zur Überarbeitung und Prüfung der Hypothese als gut geeignet anzusehen.

6 Literaturverzeichnis

- Abman SH (2001) Bronchopulmonary dysplasia: "a vascular hypothesis". *Am J Respir Crit Care Med.* 164(10 Pt 1):1755-6.
- Abrams SA (2001) Chronic pulmonary insufficiency in children and its effects on growth and development. *J Nutr.* 131(3):938S-941S.
- Agostoni C, Buonocore G, Carnielli VP, et al. (2010) Enteral nutrient supply for preterm infants: commentary from the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 50(1):85-91.
- Alejandre-Alcázar MA, Kwapiszewska G, Reiss I, et al. (2007) Hyperoxia modulates TGF-beta/BMP signaling in a mouse model of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 292(2):L537-49.
- Ambalavanan N, Carlo WA, D'Angio CT, et al. (2009) Cytokines associated with bronchopulmonary dysplasia or death in extremely low birth weight infants. *Pediatrics.* 123(4):1132-41.
- Amy RW, Bowes D, Burri PH, Haines J, Thurlbeck WM (1977) Postnatal growth of the mouse lung. *J Anat.* 124(Pt 1):131-51.
- Ask K, Bonniaud P, Maass K, et al. (2008) Progressive pulmonary fibrosis is mediated by TGF-beta isoform 1 but not TGF-beta3. *Int J Biochem Cell Biol.* 40(3):484-95.
- Atkinson SA. (2001) Special nutritional needs of infants for prevention of and recovery from bronchopulmonary dysplasia. *J Nutr.* 131(3):942S-946S.
- Avery ME, Tooley WH, Keller JB, et al. (1987) Is chronic lung disease in low birth weight infants preventable? A survey of eight centers. *Pediatrics.* 79(1):26-30.
- Babu TA, Sharmila V (2010) Vitamin A supplementation in late pregnancy can decrease the incidence of bronchopulmonary dysplasia in newborns. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 23(12):1468-9.
- Bäckström E, Hogmalm A, Lappalainen U, Bry K (2011) Developmental stage is a major determinant of lung injury in a murine model of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Res.* 69(4):312-8.
- Baker CD, Abman SH (2013) Umbilical cord stem cell therapy for bronchopulmonary dysplasia: ready for prime time? *Thorax.* 68(5):402-4.
- Bancalari E, Abdenour GE, Feller R, Gannon J (1979) Bronchopulmonary dysplasia: clinical presentation. *J Pediatr.* 95(5 Pt 2):819-23.

- Bancalari E, Claure N, Sosenko IRS (2003) Bronchopulmonary dysplasia: changes in pathogenesis, epidemiology and definition. *Semin Neonatol.* 8(1):63-71.
- Baraldi E, Filippone M (2007) Chronic lung disease after premature birth. *N Engl J Med.* 357(19):1946-55.
- Bartram U, Speer CP (2004) The role of transforming growth factor beta in lung development and disease. *Chest.* 125(2):754-65.
- Bell EF, Acarregui MJ (2008) Restricted versus liberal water intake for preventing morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane database Syst Rev.* (1):CD000503.
- Benitz WE (2012) Patent ductus arteriosus: to treat or not to treat? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 97(2):F80-2.
- Berger J, Bhandari V (2014) Animal models of bronchopulmonary dysplasia. i: the term mouse models. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 307 no. 12, L936-L947
- Berkelhamer SK, Mestan KK, Steinhorn RH (2013) Pulmonary hypertension in bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinatol.* 37(2):124-31.
- Bhat R, Salas AA, Foster C, Carlo WA, Ambalavanan N (2012) Prospective analysis of pulmonary hypertension in extremely low birth weight infants. *Pediatrics.* 129(3):e682-9.
- Bhatt AJ, Pryhuber GS, Huyck H, Watkins RH, Metlay LA, Maniscalco WM (2001) 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.* 164(10 Pt 1):1971-80.
- Bland RD, Albertine KH, Pierce RA, Starcher BC, Carlton DP (2003) Impaired alveolar development and abnormal lung elastin in preterm lambs with chronic lung injury: potential benefits of retinol treatment. *Biol Neonate.* 84(1):101-2.
- Brown ER, Stark A, Sosenko I, Lawson EE, Avery ME (1978) Bronchopulmonary dysplasia: possible relationship to pulmonary edema. *J Pediatr.* 92(6):982-4.
- Brun P-J, Yang KJZ, Lee S-A, Yuen JJ, Blaner WS (2013) Retinoids: Potent regulators of metabolism. *Biofactors.* 39(2):151-63.
- Bry K, Hogmalm A, Bäckström E (2010) Mechanisms of inflammatory lung injury in the neonate: lessons from a transgenic mouse model of bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinatol.* 34(3):211-21.
- Bry K, Lappalainen U (2006) Pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia: the role of interleukin 1beta in the regulation of inflammation-mediated pulmonary retinoic acid pathways in transgenic mice. *Semin Perinatol.* 30(3):121-8.

- Cannizzaro V, Zosky GR, Hantos Z, Turner DJ, Sly PD (2008). High tidal volume ventilation in infant mice. *Respir Physiol Neurobiol.* 162(1):93-9.
- Capoluongo E, Ameglio F, Zuppi C (2008) Insulin-like growth factor-I and complications of prematurity: a focus on bronchopulmonary dysplasia. *Clin Chem Lab Med.* 46(8):1061-6.
- Chabra S, Mayock DE, Zerzan J, Bittner R, Neufeld MD, Gleason CA (2013) Vitamin A status after prophylactic intramuscular vitamin A supplementation in extremely low birth weight infants. *Nutr Clin Pract.* 28(3):381-6.
- Chen K, Jiang P, Deng S, Wang N. (2012) [Expression of thyroid transcription factor-1 and vimentin in neonatal mice with bronchopulmonary dysplasia]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 32(8):1111-5.
- Chen L, Khillan JS (2010) A novel signaling by vitamin A/retinol promotes self renewal of mouse embryonic stem cells by activating PI3K/Akt signaling pathway via insulin-like growth factor-1 receptor. *Stem Cells.* 2010;28(1):57-63.
- Chetty A, Andersson S, Lassus P, Nielsen HC (2004) Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF-1 receptor (IGF-1R) expression in human lung in RDS and BPD. *Pediatr Pulmonol.* 37(2):128-36.
- Chetty A, Nielsen HC (2002) Regulation of cell proliferation by insulin-like growth factor 1 in hyperoxia-exposed neonatal rat lung. *Mol Genet Metab.* 75(3):265-75.
- Chock VY, Pun R, Oza A, et al. (2014) Predictors of bronchopulmonary dysplasia or death in premature infants with a patent ductus arteriosus. *Pediatr Res.* 75(4):570-5.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162(1):156-9.
- Chytil F (1996) Retinoids in lung development. *FASEB J.* 10(9):986-92.
- Coalson JJ, Winter V, deLemos RA (1995) Decreased alveolarization in baboon survivors with bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med.* 152(2):640-6.
- Coalson JJ, Winter VT, Siler-Khodr T, Yoder BA (1999) Neonatal chronic lung disease in extremely immature baboons. *Am J Respir Crit Care Med.* 160(4):1333-46.
- Coalson JJ (2006) Pathology of bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinatol.* 30(4):179-84.
- Coker RK, Laurent GJ, Jeffery PK, du Bois RM, Black CM, McAnulty RJ (2001) Localisation of transforming growth factor beta1 and beta3 mRNA transcripts in normal and fibrotic human lung. *Thorax.* 56(7):549-56.
- Coleman MM, Ruane D, Moran B, Dunne PJ, Keane J, Mills KHG (2013). Alveolar macrophages contribute to respiratory tolerance by inducing FoxP3 expression in naive T cells. *Am J*

Respir Cell Mol Biol. 48(6):773-80.

- Cornell TT, Wynn J, Shanley TP, Wheeler DS, Wong HR (2010) Mechanisms and regulation of the gene-expression response to sepsis. *Pediatrics.* 125(6):1248-58.
- Darlow BA, Graham PJ (2011) Vitamin A supplementation to prevent mortality and short- and long-term morbidity in very low birthweight infants. *Cochrane database Syst Rev.* (10):CD000501.
- de Meer K, Westerterp KR, Houwen RH, Brouwers HA, Berger R, Okken A (1997) Total energy expenditure in infants with bronchopulmonary dysplasia is associated with respiratory status. *Eur J Pediatr.* 156(4):299-304.
- Doi T, Sugimoto K, Puri P (2009) Prenatal retinoic acid up-regulates pulmonary gene expression of COUP-TFII, FOG2, and GATA4 in pulmonary hypoplasia. *J Pediatr Surg.* 44(10):1933-7.
- Dunbar S (2006) Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. *Clin Chim Acta* 363(1-2):71-82
- Ehrenkranz RA, Walsh MC, Vohr BR, et al. (2005) Validation of the National Institutes of Health consensus definition of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics.* 116(6):1353-60.
- Esteban-Pretel G, Marín MP, Renau-Piqueras J, Barber T, Timoneda J (2010) Vitamin A deficiency alters rat lung alveolar basement membrane: reversibility by retinoic acid. *J Nutr Biochem.* 21(3):227-36.
- Fanaroff AA, Stoll BJ, Wright LL, et al. (2007) Trends in neonatal morbidity and mortality for very low birthweight infants. *Am J Obstet Gynecol.* 196(2):147.e1-8.
- Farhath S, He Z, Nakhla T, et al. (2008) Pepsin, a marker of gastric contents, is increased in tracheal aspirates from preterm infants who develop bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics.* 121(2):e253-9.
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 4(4):330-6.
- Gadhia MM, Cutter GR, Abman SH, Kinsella JP (2014) Effects of early inhaled nitric oxide therapy and vitamin A supplementation on the risk for bronchopulmonary dysplasia in premature newborns with respiratory failure. *J Pediatr.* 164(4):744-8.
- Gallagher SR, Desjardins PR (2007) Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. *Curr Protoc Hum Genet.* Appendix 3:Appendix 3D.
- Gien J, Kinsella JP (2011) Pathogenesis and treatment of bronchopulmonary dysplasia. *Curr Opin Pediatr.* 23(3):305-13.
- Goncharov DA, Kudryashova T V, Ziai H, et al. (2014) Mammalian target of rapamycin complex 2

(mTORC2) coordinates pulmonary artery smooth muscle cell metabolism, proliferation, and survival in pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 129(8):864-74.

Goncharova EA (2013) mTOR and vascular remodeling in lung diseases: current challenges and therapeutic prospects. *FASEB J*. 27(5):1796-807.

Gonzalez-Reyes S, Martinez L, Martinez-Calonge W, Fernandez-Dumont V, Tovar JA (2006) Effects of antioxidant vitamins on molecular regulators involved in lung hypoplasia induced by nitrofen. *J Pediatr Surg*. 41(8):1446-52.

Gortner L, Hilgendorff A, Böhner T, Ebsen M, Reiss I, Rudloff S (2005) Hypoxia-induced intrauterine growth retardation: effects on pulmonary development and surfactant protein transcription. *Biol Neonate*. 88(2):129-35.

Gortner L, Misselwitz B, Milligan D, et al. (2011) Rates of bronchopulmonary dysplasia in very preterm neonates in Europe: results from the MOSAIC cohort. *Neonatology*. 99(2):112-7.

Gortner L, Monz D, Mildau C, et al. (2013) Bronchopulmonary dysplasia in a double-hit mouse model induced by intrauterine hypoxia and postnatal hyperoxia: closer to clinical features? *Ann Anat*. 195(4):351-8.

Gras-Le Guen C, Denis C, Franco-Montoya M-L, et al. (2008) Antenatal infection in the rabbit impairs post-natal growth and lung alveolarisation. *Eur Respir J*. 32(6):1520-8.

Guimarães H, Guedes MB, Rocha G, Tomé T, Albino-Teixeira A (2012) Vitamin A in prevention of bronchopulmonary dysplasia. *Curr Pharm Des*. 18(21):3101-13.

Hadchouel A, Franco-Montoya M-L, Delacourt C (2014) Altered lung development in bronchopulmonary dysplasia. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 100(3):158-67.

Halliday HL, Ehrenkranz RA, Doyle LW (2009) Late (>7 days) postnatal corticosteroids for chronic lung disease in preterm infants. *Cochrane database Syst Rev*. (1):CD001145.

Heinrich PC, Müller M, Graeve L (2014) Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9., überarbeitete und erweiterte Auflage. *SpringerLehrbuch*. Springer, Berlin Heidelberg

Hislop AA (2002). Airway and blood vessel interaction during lung development. *J Anat*. 201(4):325-34.

Horbar JD, Carpenter JH, Badger GJ, et al. (2012) Mortality and neonatal morbidity among infants 501 to 1500 grams from 2000 to 2009. *Pediatrics*. 129(6):1019-26.

Hosford GE, Olson DM (2003). Effects of hyperoxia on VEGF, its receptors, and HIF-2alpha in the newborn rat lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 285(1):L161-8.

Husain AN, Siddiqui NH, Stocker JT (1998) Pathology of arrested acinar development in postsurfactant bronchopulmonary dysplasia. *Hum Pathol*. 29(7):710-7.

- Hwang S-K, Kim H-H (2011) The functions of mTOR in ischemic diseases. *BMB Rep.* 44(8):506-11.
- Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y, Kagechika H, Kato C, Song S-Y (2004) Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity.* 21(4):527-38.
- Jain D, Bancalari E (2014) Bronchopulmonary dysplasia: clinical perspective. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 100(3):134-44.
- James ML, Ross AC, Nicola T, Steele C, Ambalavanan N (2013) VARA attenuates hyperoxia-induced impaired alveolar development and lung function in newborn mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 304(11):L803-12.
- Jensen EA, Schmidt B (2014) Epidemiology of bronchopulmonary dysplasia. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 100(3):145-57.
- Jobe AH, Bancalari E (2001) Bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med.* 163(7):1723-9.
- Jobe AH (2011) The new bronchopulmonary dysplasia. *Curr Opin Pediatr.* 23(2):167-72.
- Jobe AJ (1999) The new BPD: an arrest of lung development. *Pediatr Res.* 46(6):641-3.
- Kaartinen V, Voncken JW, Shuler C, et al. (1995) Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat Genet.* 11(4):415-21.
- Kang SG, Lim HW, Andrisani OM, Broxmeyer HE, Kim CH (2007) Vitamin A metabolites induce gut-homing FoxP3+ regulatory T cells. *J Immunol.* 179(6):3724-33.
- Kent A, Dahlstrom JE (2004) Chorioamnionitis/funisitis and the development of bronchopulmonary dysplasia. *J Paediatr Child Health.* 40(7):356-9.
- Khalil N, O'Connor RN, Flanders KC, Unruh H (1996) TGF-beta 1, but not TGF-beta 2 or TGF-beta 3, is differentially present in epithelial cells of advanced pulmonary fibrosis: an immunohistochemical study. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 14(2):131-8.
- Kim D-H, Choi CW, Kim E-K, et al. (2010) Association of increased pulmonary interleukin-6 with the priming effect of intra-amniotic lipopolysaccharide on hyperoxic lung injury in a rat model of bronchopulmonary dysplasia. *Neonatology.* 98(1):23-32.
- Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY (2007) Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol.* 8(2):191-7.
- Kim T-H, Chow Y-H, Gill SE, Schnapp LM (2012) Effect of insulin-like growth factor blockade on hyperoxia-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 47(3):372-8.

- Kinsella JP, Greenough A, Abman SH (2006) Bronchopulmonary dysplasia. *Lancet*. 367(9520):1421-31.
- Köksal N, Kayik B, Çetinkaya M, et al. (2012) Value of serum and bronchoalveolar fluid lavage pro- and anti-inflammatory cytokine levels for predicting bronchopulmonary dysplasia in premature infants. *Eur Cytokine Netw*. 23(2):29-35.
- Krymskaya VP, Snow J, Cesarone G, et al. (2011) mTOR is required for pulmonary arterial vascular smooth muscle cell proliferation under chronic hypoxia. *FASEB J*. 25(6):1922-33.
- Kudryashova T V, Goncharov DA, Pena A, et al. (2015) Profiling the role of mammalian target of rapamycin in the vascular smooth muscle metabolome in pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ*. 5(4):667-80.
- Kwinta P, Bik-Multanowski M, Mitkowska Z, Tomasik T, Legutko M, Pietrzyk JJ (2008) Genetic risk factors of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Res*. 64(6):682-8.
- Lacaze-Masmonteil T (2014) That chorioamnionitis is a risk factor for bronchopulmonary dysplasia--the case against. *Paediatr Respir Rev*. 15(1):53-5.
- Lahra MM, Beeby PJ, Jeffery HE (2009) Intrauterine inflammation, neonatal sepsis, and chronic lung disease: a 13-year hospital cohort study. *Pediatrics*. 123(5):1314-9.
- Lamarche-Vadel A, Blondel B, Truffer P, et al. (2004) Re-hospitalization in infants younger than 29 weeks' gestation in the EPIPAGE cohort. *Acta Paediatr*. 93(10):1340-5.
- Lassus P, Ristimäki A, Ylikorkala O, Viinikka L, Andersson S (1999). Vascular endothelial growth factor in human preterm lung. *Am J Respir Crit Care Med*. 159(5 Pt 1):1429-33.
- Lecart C, Cayabyab R, Buckley S, et al. (2000) Bioactive transforming growth factor-beta in the lungs of extremely low birthweight neonates predicts the need for home oxygen supplementation. *Biol Neonate*. 77(4):217-23.
- Lee HJ, Choi CW, Kim B Il, et al. (2010) Serial changes of lung morphology and biochemical profiles in a rat model of bronchopulmonary dysplasia induced by intra-amniotic lipopolysaccharide and postnatal hyperoxia. *J Perinat Med*. 38(6):675-81.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25(4):402-8.
- Londhe VA, Maisonet TM, Lopez B, Shin B-C, Huynh J, Devaskar SU (2013) Retinoic acid rescues alveolar hypoplasia in the calorie-restricted developing rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 48(2):179-87.
- Mactier H, Weaver LT (2005) Vitamin A and preterm infants: what we know, what we don't know, and what we need to know. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 90(2):F103-8.

- Maden M, Hind M (2004) Retinoic acid in alveolar development, maintenance and regeneration. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 359(1445):799-808.
- Malek TR, Yu A, Vincek V, Scibelli P, Kong L (2002) CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity.* 17(2):167-78.
- Manchester KL (1996) Use of UV methods for measurement of protein and nucleic acid concentrations. *Biotechniques.* 20(6):968-70.
- Manzano RM, Mascaretti RS, Carrer V, et al. (2014) A hyperoxic lung injury model in premature rabbits: the influence of different gestational ages and oxygen concentrations. *PLoS One.* 9(4):e95844.
- Massaro D, Massaro GD (2010) Lung development, lung function, and retinoids. *N Engl J Med.* 362(19):1829-31.
- Massaro GD, Massaro D (1996) Postnatal treatment with retinoic acid increases the number of pulmonary alveoli in rats. *Am J Physiol.* 270(2 Pt 1):L305-10.
- McGowan EC, Kostadinov S, McLean K, et al. (2009) Placental IL-10 dysregulation and association with bronchopulmonary dysplasia risk. *Pediatr Res.* 66(4):455-60.
- Meller S, Bhandari V (2012) VEGF levels in humans and animal models with RDS and BPD: temporal relationships. *Exp Lung Res.* 38(4):192-203.
- Meyer S, Gortner L (2014) Early postnatal additional high-dose oral vitamin A supplementation versus placebo for 28 days for preventing bronchopulmonary dysplasia or death in extremely low birth weight infants. *Neonatology.* 105(3):182-8.
- Miller RK, Hendrickx AG, Mills JL, Hummler H, Wiegand UW (1998) Periconceptual vitamin A use: how much is teratogenic? *Reprod Toxicol.* 12(1):75-88.
- Misra RS, Shah S, Fowell DJ, et al. (2015) Preterm cord blood CD4⁺ T cells exhibit increased IL-6 production in chorioamnionitis and decreased CD4⁺ T cells in bronchopulmonary dysplasia. *Hum Immunol.* 76(5):329-38.
- Monz D, Tutdibi E, Mildau C, et al. (2013) Human umbilical cord blood mononuclear cells in a double-hit model of bronchopulmonary dysplasia in neonatal mice. *PLoS One.* 8(9):e74740.
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-50.
- Nagata K, Masumoto K, Uesugi T, et al. (2007) Effect of insulin-like-growth factor and its receptors regarding lung development in fetal mice. *Pediatr Surg Int.* 23(10):953-9.

- Narasaraju TA, Chen H, Weng T, et al. (2006) Expression profile of IGF system during lung injury and recovery in rats exposed to hyperoxia: a possible role of IGF-1 in alveolar epithelial cell proliferation and differentiation. *J Cell Biochem.* 97(5):984-98.
- Northway WH, Rosan RC, Porter DY (1967) Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease. Bronchopulmonary dysplasia. *N Engl J Med.* 276(7):357-68.
- O'Brodovich HM, Mellins RB (1985) Bronchopulmonary dysplasia. Unresolved neonatal acute lung injury. *Am Rev Respir Dis.* 132(3):694-709. 2014.
- Oei J, Lui K, Wang H, Henry R (2002) Decreased interleukin-10 in tracheal aspirates from preterm infants developing chronic lung disease. *Acta Paediatr.* 91(11):1194-9.
- Otto M (2011) *Analytische Chemie.* 4. Aufl. Wiley-VCH Verlag, Weinheim
- Ozer EA, Kumral A, Ozer E, et al. (2005) Effect of retinoic acid on oxygen-induced lung injury in the newborn rat. *Pediatr Pulmonol.* 39(1):35-40.
- Parra E, Pérez-Gil J (2015) Composition, structure and mechanical properties define performance of pulmonary surfactant membranes and films. *Chem Phys Lipids.* 185:153-75.
- Peirson SN, Butler JN (2007) RNA extraction from mammalian tissues. *Methods Mol Biol.* 362:315-27.
- Pfaffl MW (2004) Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum.* 10(1):92-5.
- Pierce RA, Joyce B, Officer S, et al. (2007) Retinoids increase lung elastin expression but fail to alter morphology or angiogenesis genes in premature ventilated baboons. *Pediatr Res.* 61(6):703-9.
- Qiu L, Deng C, Fu Z, Guo C (2011) The role of transforming growth factors beta1 and beta3 in pre- and post-natal pulmonary surfactant development. *Cell Biol Int.* 35(3):287-92.
- Ramakers C, Ruijter JM, DePrez RHL, Moorman AFM (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett.* 339(1):62-6.
- Raverdeau M, Mills KHG (2014) Modulation of T cell and innate immune responses by retinoic Acid. *J Immunol.* 192(7):2953-8.
- Redlich CA, Delisser HM, Elias JA (1995) Retinoic acid inhibition of transforming growth factor-beta-induced collagen production by human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 12(3):287-95.
- Richter G (2003) *Praktische Biochemie: Grundlagen und Techniken ; 19 Tabellen.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart

- Rocha G, Proença E, Guedes A, et al. (2012) Cord blood levels of IL-6, IL-8 and IL-10 may be early predictors of bronchopulmonary dysplasia in preterm newborns small for gestational age. *Dis Markers*. 33(1):51-60.
- Ross AC, Stephensen CB (1996) Vitamin A and retinoids in antiviral responses. *FASEB J*. 10(9):979-85.
- Ruttenstock E, Doi T, Dingemann J, Puri P (2011) Prenatal administration of retinoic acid upregulates insulin-like growth factor receptors in the nitrofen-induced hypoplastic lung. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 92(2):148-51.
- Saito A, Sugawara A, Uruno A, et al. (2007) All-trans retinoic acid induces in vitro angiogenesis via retinoic acid receptor: possible involvement of paracrine effects of endogenous vascular endothelial growth factor signaling. *Endocrinology*. 148(3):1412-23.
- Saugstad OD, Aune D (2014) Optimal oxygenation of extremely low birth weight infants: a meta-analysis and systematic review of the oxygen saturation target studies. *Neonatology*. 105(1):55-63.
- Schild TA (o.J.) Einführung in die Real-Time Taq-Man PCR-Technologie. Verfügbar unter: <https://www.core-facility.uni-freiburg.de/lc480/lc480obj/sdsman>. Abgerufen am 25.02.2016.
- Schmid P, Cox D, Bilbe G, Maier R, McMaster GK (1991) Differential expression of TGF beta 1, beta 2 and beta 3 genes during mouse embryogenesis. *Development*. 111(1):117-30.
- Schmidt AF, Gonçalves FLL, Regis AC, Gallindo RM, Sbragia L (2012) Prenatal retinoic acid improves lung vascularization and VEGF expression in CDH rat. *Am J Obstet Gynecol*. 207(1):76.e25-32.
- Schuller AG, van Neck JW, Beukenholdt RW, Zwarthoff EC, Drop SL (1995) IGF, type I IGF receptor and IGF-binding protein mRNA expression in the developing mouse lung. *J Mol Endocrinol*. 14(3):349-55.
- Shenai JP, Chytil F, Stahlman MT (1985) Vitamin A status of neonates with bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Res*. 19(2):185-8.
- Shennan AT, Dunn MS, Ohlsson A, Lennox K, Hoskins EM (1988) Abnormal pulmonary outcomes in premature infants: prediction from oxygen requirement in the neonatal period. *Pediatrics*. 82(4):527-32.
- Smith VC, Zupancic JAF, McCormick MC, et al. (2005) Trends in severe bronchopulmonary dysplasia rates between 1994 and 2002. *J Pediatr*. 146(4):469-73.
- Spears K, Cheney C, Zerzan J (2004) Low plasma retinol concentrations increase the risk of developing bronchopulmonary dysplasia and long-term respiratory disability in very-low-birth-weight infants. *Am J Clin Nutr*. 80(6):1589-94.

- Stahlman MT, Gray ME, Whitsett JA (1996) Expression of thyroid transcription factor-1(TTF-1) in fetal and neonatal human lung. *J Histochem Cytochem.* 44(7):673-8.
- Stroustrup A, Trasande L (2010) Epidemiological characteristics and resource use in neonates with bronchopulmonary dysplasia: 1993-2006. *Pediatrics.* 126(2):291-7.
- Sugimoto K, Takayasu H, Nakazawa N, Montedonico S, Puri P (2008) Prenatal treatment with retinoic acid accelerates type 1 alveolar cell proliferation of the hypoplastic lung in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 43(2):367-72.
- Tan CY, Hagen T (2013) Post-translational regulation of mTOR complex 1 in hypoxia and reoxygenation. *Cell Signal.* 25(5):1235-44.
- Tang Q, Bluestone JA (2008) The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol.* 9(3):239-44.
- ter Horst SAJ, Walther FJ, Poorthuis BJHM, Hiemstra PS, Wagenaar GTM (2007) Inhaled nitric oxide attenuates pulmonary inflammation and fibrin deposition and prolongs survival in neonatal hyperoxic lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 293(1):L35-44.
- Thébaud B, Abman SH (2007) Bronchopulmonary dysplasia: where have all the vessels gone? Roles of angiogenic growth factors in chronic lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 175(10):978-85.
- Thomas W, Speer CP (2014). Chorioamnionitis is essential in the evolution of bronchopulmonary dysplasia--the case in favour. *Paediatr Respir Rev.* 15(1):49-52.
- Thomas W, Speer CP (2005) Management of infants with bronchopulmonary dysplasia in Germany. *Early Hum Dev.* 81(2):155-63.
- Toti P, Buonocore G, Tanganelli P, et al. (1997) Bronchopulmonary dysplasia of the premature baby: an immunohistochemical study. *Pediatr Pulmonol.* 24(1):22-8.
- Tsao P-N, Wei S-C (2013) Prenatal hypoxia downregulates the expression of pulmonary vascular endothelial growth factor and its receptors in fetal mice. *Neonatology.* 103(4):300-7.
- Tyson JE, Wright LL, Oh W, et al. (1999) Vitamin A supplementation for extremely-low-birth-weight infants. National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *N Engl J Med.* 340(25):1962-8.
- Van Marter LJ, Dammann O, Allred EN, et al. (2002) Chorioamnionitis, mechanical ventilation, and postnatal sepsis as modulators of chronic lung disease in preterm infants. *J Pediatr.* 140(2):171-6.
- Van Marter LJ. (2009) Epidemiology of bronchopulmonary dysplasia. *Semin Fetal Neonatal Med.* 14(6):358-66.

- Velten M, Heyob KM, Rogers LK, Welty SE (2010) Deficits in lung alveolarization and function after systemic maternal inflammation and neonatal hyperoxia exposure. *J Appl Physiol.* 108(5):1347-56.
- Vicencio AG, Lee CG, Cho SJ, et al. (2004) Conditional overexpression of bioactive transforming growth factor-beta1 in neonatal mouse lung: a new model for bronchopulmonary dysplasia? *Am J Respir Cell Mol Biol.* 31(6):650-6.
- Vogelsang A, van Lingen RA, Slootstra J, et al. (2009) Antioxidant role of plasma carotenoids in bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. *Int J Vitam Nutr Res Int Zeitschrift für Vitamin- und Ernährungsforschung J Int Vitaminol Nutr.* 79(5-6):288-96.
- Wang A, Li X, Yang Y, et al. (2015) A Critical Role of the mTOR/eIF2 α Pathway in Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension. *PLoS One.* 10(6):e0130806.
- Wang W, Liu J, Ma A, et al. (2014) mTORC1 Is Involved in Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension through the Activation of Notch3. *J Cell Physiol.* 10(6): e0130806. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4487252/> Abgerufen am:
- Wang W, Wei W, Ning Q, Luo X. (2007) [Effect of intra-amniotic endotoxin priming plus hyperoxic exposure on the expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in lungs of preterm newborn rats]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi.* 45(7):533-8.
- Wardle SP, Hughes A, Chen S, Shaw NJ (2001) Randomised controlled trial of oral vitamin A supplementation in preterm infants to prevent chronic lung disease. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 84(1):F9-F13.
- Warner BB, Stuart LA, Papes RA, Wispé JR (1998). Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice. *Am J Physiol.* 275(1 Pt 1):L110-7.
- Wert SE, Dey CR, Blair PA, Kimura S, Whitsett JA (2002) Increased expression of thyroid transcription factor-1 (TTF-1) in respiratory epithelial cells inhibits alveolarization and causes pulmonary inflammation. *Dev Biol.* 242(2):75-87.
- Wong CKM, Lai T, Holly JMP, Wheeler MH, Stewart CEH, Farndon JR (2006) The effects of retinoic acid on the insulin-like growth factor axis in primary tissue culture from hyperparathyroidism. *World J Surg.* 30(5):714-20.
- Xu L, Xiong S, Guo R, et al. (2014) Transforming growth factor β 3 attenuates the development of radiation-induced pulmonary fibrosis in mice by decreasing fibrocyte recruitment and regulating IFN- γ /IL-4 balance. *Immunol Lett.* 162(1 Pt A):27-33.
- Yoon BH, Romero R, Jun JK, et al. (1997) Amniotic fluid cytokines (interleukin-6, tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , and interleukin-8) and the risk for the development of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Obstet Gynecol.* 177(4):825-830.
- Zhang JD, Ruschhaupt M, Biczok R (2013) ddCt method for qRT-PCR data analysis. Verfügbar unter: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?> Abgerufen am: 18.05.2016

Ziegler SF (2006) FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol.* 24:209-26.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich ein herzliches Danke an alle richten, die mich während dieser Arbeit begleitet haben.

An meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. L. Gortner für die freundliche Überlassung des Themas und die damit verbundenen interessanten Einblicke in die pädiatrische Klinik.

An meinen Betreuer Herrn Dr. rer. nat. Dominik Monz. Ohne seine Unterstützung in allen Belangen dieser Arbeit, seine ständige Präsenz, Diskussions- und Hilfsbereitschaft wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

An Frau Ellen Maurer, die mich sehr gut in die Labortechniken eingewiesen und mich durch ihre fachliche Kompetenz beeindruckt hat.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, vor allem meinen Eltern, für den Rückhalt und uneingeschränkte Unterstützung in allen Belangen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei allen meinen Freunden und Freundinnen für ihre Zuwendungen und ihr allzeit offenes Ohr bedanken.

Meinen Kommilitonen und Kommilitoninnen sage ich Danke für die schöne und unvergessliche Zeit in Homburg.