

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der  
Ludwig-Maximilian-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Klaus Friese

Aus der Neonatologie der Kinderklinik am Perinatalzentrum  
der LMU-München Grosshadern

Leiter: Prof. Dr. Andreas Schulze

Die Bedeutung von Interleukin-8 und  
Nerve Growth Factor sowie derer Zielrezeptoren  
CXCR1, CXCR2 und TrkA für die Entwicklung  
beatmungsinduzierter Lungenschädigung des  
Frühgeborenen



Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der  
Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

**Björn Müller-Edenborn**

aus Freiburg im Breisgau

2011

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Andreas W. Flemmer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Adelbert Roscher, Priv. Doz. Dr. Joachim Groh,  
Prof. Dr. Frank Christ

Mitbetreuung: PD Dr. Andreas Flemmer

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 27.01.2011

*gewidmet meiner Familie.*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1	Entwicklung der kindlichen Lunge . . . . .	7
1.2	Beatmungs-induzierte Lungenverletzung . . . . .	8
1.3	Pathophysiologische Grundlagen beatmungs-induzierter Lungenverletzungen . . . . .	8
1.3.1	Volutrauma . . . . .	8
1.3.2	Atelectrauma . . . . .	9
1.3.3	Sauerstoff-Toxizität . . . . .	9
1.3.4	lokale und systemische entzündliche Reaktionen . . . . .	10
1.4	Entzündung und Immunantwort – beteiligte Zelltypen . . . . .	11
1.4.1	Zellen des unspezifischen Immunsystems – Phagozyten . . . . .	11
1.4.2	Zellen des spezifischen Immunsystems – Lymphozyten . . . . .	14
1.5	Entzündung und Immunantwort – zelluläre Mechanismen . . . . .	16
1.5.1	Interleukin-8 und seine Rezeptoren CXCR 1 + 2 . . . . .	16
1.5.2	NGF und TrkA . . . . .	21
1.6	Zielsetzung . . . . .	25
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>27</b>
2.1	Probanden . . . . .	27
2.2	Sekretgewinnung und Verarbeitung . . . . .	27
2.3	FACS-Analyse . . . . .	29
2.3.1	Durchführung . . . . .	30
2.3.2	Auswertung . . . . .	31
2.4	Anfertigung und Auswertung der Ausstriche . . . . .	34
2.5	Quantitative Bestimmung der Zytokine . . . . .	34
2.6	Dokumentation . . . . .	37

2.7	Statistische Auswertung . . . . .	38
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
3.1	Patienten . . . . .	39
3.2	Interleukin-8 und seine Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 . . .	43
3.2.1	Interleukin-8 . . . . .	43
3.2.2	CXCR1 . . . . .	46
3.2.3	CXCR2 . . . . .	48
3.3	NGF und TrkA . . . . .	51
3.3.1	NGF . . . . .	51
3.3.2	TrkA . . . . .	55
3.4	Zelluläre Zusammensetzung des Trachealsekrets . . . . .	57
3.4.1	Übersicht . . . . .	57
3.4.2	Neutrophile Granulozyten . . . . .	57
3.4.3	Alveolarmakrophagen . . . . .	59
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>62</b>
4.1	Zusammenfassung . . . . .	62
4.2	Methoden . . . . .	64
4.2.1	Trachealsekret . . . . .	64
4.2.2	FACS . . . . .	65
4.2.3	Ausstriche . . . . .	67
4.3	Ergebnisse . . . . .	67
4.3.1	Die Bedeutung von Interleukin-8 und seinen Zielrezeptoren CXCR1 und CXCR2 für die Entwicklung beatmungsinduzierter Lungenverletzung . . . . .	67

4.3.2	Die Bedeutung von NGF und seinem Zielrezeptoren TrkA für die Entwicklung beatmungsinduzierter Lun- genverletzung . . . . .	72
4.3.3	Ausblick . . . . .	77
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>79</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>82</b>
6.1	Abkürzungsverzeichnis . . . . .	82
6.2	Danksagung . . . . .	83
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>84</b>

*“Given that mechanical ventilation with a rate of 30 breaths per minute will distend the lungs more than 40,000 times per day, it is surprising that mechanical ventilation is not more harmful.”*

Reese H. Clark

# 1 Einleitung

In einem ersten Abschnitt soll in dieser Einleitung auf die embryonale Entwicklung und auf Besonderheiten der kindlichen Lunge eingegangen werden, die eine pulmonale Schädigung, insbesondere bei unreifen Neugeborenen in der Peri- und Postnatalperiode begünstigen. Es werden die pathophysiologischen Grundlagen der beatmungs-induzierten Lungenschädigung erörtert und die beteiligten Zelltypen vorgestellt. Anschließend soll in diesem Zusammenhang die Bedeutung von Interleukin-8 und NGF sowie der entsprechenden Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 bzw. TrkA dargestellt werden.

## 1.1 Entwicklung der kindlichen Lunge

Die Entwicklung der kindlichen Lunge beginnt in der vierten Schwangerschaftswoche mit der Ausbildung der Lungenknospe aus dem Vorderdarm. Bis zur 24. Schwangerschaftswoche hat sich die Lunge soweit entwickelt, dass erste Bronchioli respiratorii vorhanden sind. Diese Bronchioli respiratorii ermöglichen bereits in dieser frühen Schwangerschaftswoche einen gewissen respiratorischen Gasaustausch. Da aber zum Einen die Vaskularisierung der Lunge noch nicht abgeschlossen ist und zum Anderen die Lungenepithelzellen weder ausreichend Surfactant bilden können, noch in der Lage sind effektiv alveoläre Flüssigkeit zu resorbieren, müssen Frühgeborene dieser Schwangerschaftswoche in der Regel maschinell beatmet werden. Die weitere Entwicklung der Lunge und dichotome Aufteilung der Bronchiolen setzt sich noch bis in das achte Lebensjahr fort [80].



## **1.2 Beatmungs-induzierte Lungenverletzung**

Die Notwendigkeit der maschinellen Beatmung zur Aufrechterhaltung des Gasaustausches und die häufigen pulmonalen und systemischen Infektionen Frühgeborener sowie die Exposition der Lunge gegenüber Sauerstoffradikalen bahnen den Weg für einen beatmungs-induzierten Lungenschaden (engl. VILI = ventilator-induced lung injury). In der Folge entwickelt sich eine chronische Lungenerkrankung, die Bronchopulmonale Dysplasie (BPD), welche durch Sauerstoffbedarf nach der 36. postkonzeptionellen Schwangerschaftswoche gekennzeichnet ist [3, 29]. In Folge der BPD kann sich der Gasaustausch in der Lunge soweit verschlechtern, dass auch mit maximaler Beatmungstherapie keine ausreichende Oxygenierung und Ventilation mehr erreicht werden kann.

## **1.3 Pathophysiologische Grundlagen beatmungs-induzierter Lungenverletzungen**

### **1.3.1 Volutrauma**

Die Bronchopulmonale Dysplasie wurde zum ersten Mal 1967 von Northway et al. bei 13 maschinell beatmeten Kindern der 30. – 39. Schwangerschaftswoche beschrieben [85]. Obgleich die BPD als Krankheit multifaktorieller Genese betrachtet wird, ist nach neueren Studien an Kindern mit einem Geburtsgewicht von unter 1250g der Einsatz von maschineller Beatmung einer der größten Risikofaktoren für die Entwicklung einer BPD [121, 129]. Dabei scheint besonders dem Atemzugvolumen eine große Bedeutung zuzukommen. In Tiermodellen konnten durch hohe Atemzugvolumina pulmonale Mikrotraumen und eine erhöhte Kapillarpermeabilität provoziert werden [124, 28]. Dies führte zum verstärkten Einstrom von Blut, Flüssigkeit und Proteinen

in die Lunge und infolgedessen zu einer Beeinträchtigung der Lungenfunktion durch Inaktivierung von Surfactant und inflammatorische Prozesse in der Lunge [112]. Darüberhinaus kann eine regionale Minderbelüftung bei sehr unreifen Frühgeborenen zu Überblähung der belüfteten Lungenareale führen, was wiederum zur Zerstörung pulmonaler Ultrastrukturen führen kann [122]. Diesen pathophysiologischen Mechanismen entspricht das sogenannte Volutrauma, welches unter mechanischer Beatmung auftreten kann.

### **1.3.2 Atelectrauma**

Lungenerkrankungen wie ARDS (acute respiratory distress syndrome) oder RDS (respiratory distress syndrome) können zu Atelektasen einzelner Lungenabschnitte und so zu einer Reduktion der funktionellen Lungenkapazität führen. Dabei kann der Kollaps von Alveolarenheiten einerseits die Folge der Lungenschädigung sein, andererseits schädigen die ständige Rekrutierung und „De-Rekrutierung“ von Alveolarenheiten durch hohe Atemzugvolumina die Lunge [83]. Eine Erhöhung der funktionellen Residualkapazität vermindert diesen Vorgang und reduziert das Risiko für VILI [17].

### **1.3.3 Sauerstoff-Toxizität**

1975 vermuteten Philip et al., dass Sauerstoff, PPV-Beatmung (=positive pressure ventilation) und Dauer der Beatmung ursächlich für das Entstehen einer BPD verantwortlich sind [92]. In Tiermodellen wurde der toxische Effekt von Sauerstoff bestätigt. Maschinelle Beatmung mit hochprozentigem Sauerstoff stört über die Bildung von Sauerstoffradikalen, Superoxiden und Hydroxylionen die Alveolarisierung [94, 116]. Die Entwicklung der Lunge Frühgeborener ist gegenüber Sauerstoffradikalen besonders gefährdet, da sich die antioxidativen Schutzsysteme erst im dritten Trimenon entwickeln [17].

### 1.3.4 lokale und systemische entzündliche Reaktionen

In der Vergangenheit wurden beatmungs-induzierte Lungenverletzungen zu meist als direkte Folge von Volu- bzw. Barotraumen der Lunge aufgefasst. In den letzten Jahren rückt zunehmend die indirekt durch die Beatmung bedingte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und die darauf folgende neutrophile Infiltration der Lunge in den Mittelpunkt des Interesses. So konnten Warner et al. 1998 in einem Mäusemodell nach 28-tägiger Beatmung mit einem FiO<sub>2</sub> von 0,85 (entspricht einem inspiratorischen Sauerstoff-Gehalt von 85%) einen starken Anstieg pro-inflammatorischer Zytokine bei gleichzeitig verringerter Aleolisierung und verringerter Gesamtoberfläche der Lunge feststellen [123]. Schultz et al. untersuchten 2003 in einer klinischen Studie an 20 maschinell beatmeteten Frühgeborenen während der ersten zwei Lebenswochen pro- und antiinflammatorische Zytokine. Hier kam es zu einer vermehrten Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-8, ENA-78 und Elastase [109].

Nach Uhlig et al. führt maschinelle Beatmung über verschiedene Mechanismen zur Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren:

- I. Hohe Beatmungsdrücke und fehlender positiver endexpiratorischer Druck (PEEP) können zu einer Zerstörung der Alveolarmembran sowie endothelialer und epithelialer Barrieren führen. Infolgedessen kommt es zur Nekrose der Alveolarmembran und Freisetzung Entzündungsmediatoren sowie zur Aktivierung noch intakter Entzündungszellen.
- II. Der Zusammenbruch der Barrieren führt zu einem Verlust der Kompartimentierung und zum Ausschwemmen von Zytokinen und Bakterien.
- III. Weniger invasive Beatmungsstrategien, welche nicht zu Gewebsver-

letzung führen, können die Ausschüttung von Zytokinen über andere Mechanismen induzieren, vermutlich über Dehnungs-aktivierte Signalkaskaden (Mechanotransduktion).

- IV. Beatmung mit steigendem positivem Druck führt zu pulmonalem Hypertonus und damit einhergehend zu erhöhter Scherspannung, beides bekannte Stimuli welche die Zytokinproduktion durch Endothelzellen fördern [119].

Die vermehrte Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren ist von besonderem Interesse, da sie bei der Pathogenese verschiedener neonataler Krankheitsbilder wie zum Beispiel BPD, aber auch interventrikulärer Hämorrhagie, nekrotisierender Enterokolitis und periventrikulärer Leukomalazie eine wichtige Rolle spielen [18, 39].

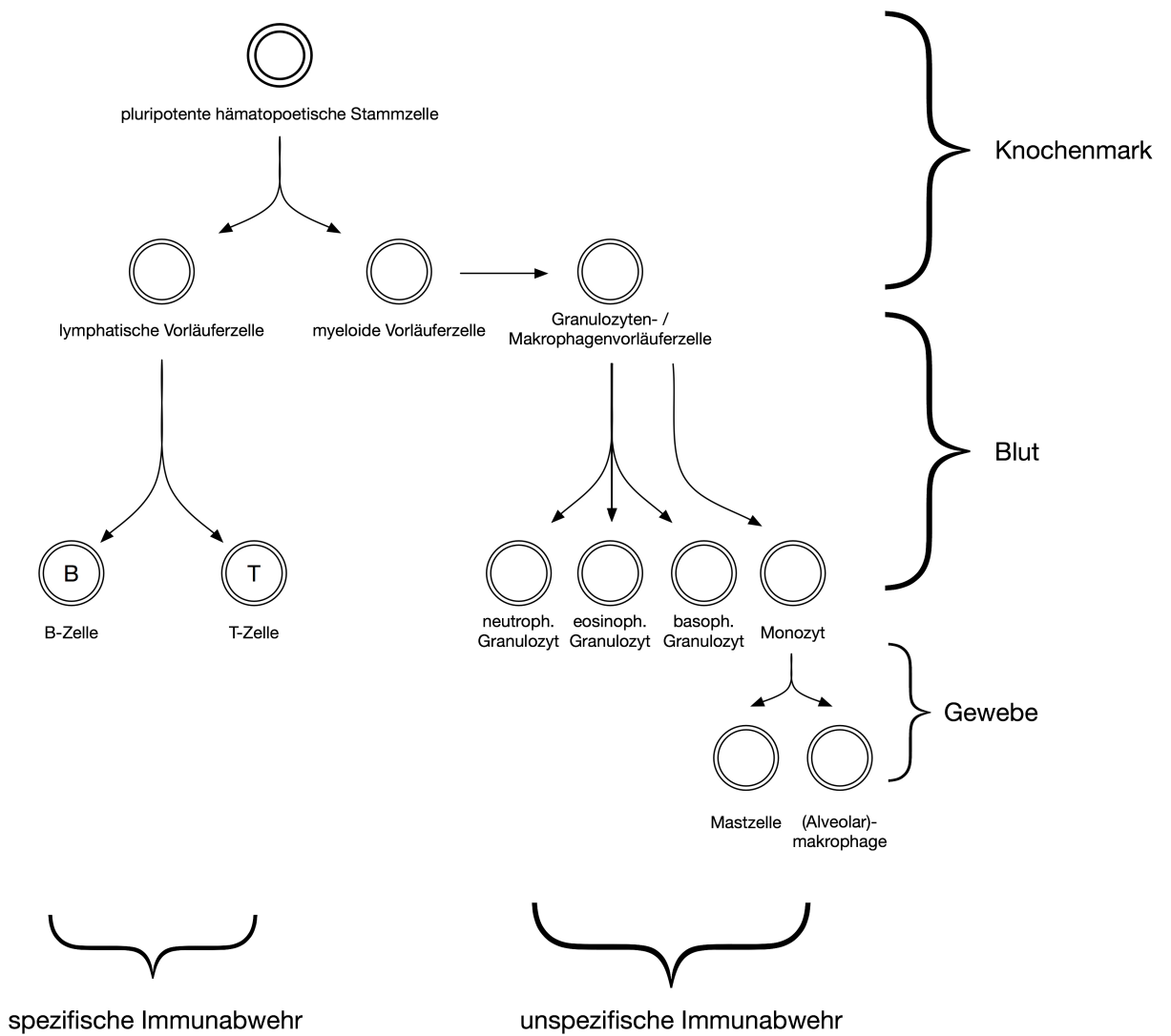
## **1.4 Entzündung und Immunantwort – beteiligte Zelltypen**

Die Immunabwehr des Menschen beginnt mit der pluripotenten Stammzelle. Aus diesen pluripotenten Zellen können sich lymphatische Vorläuferzellen oder myeloide Vorläuferzellen entwickeln (s. Abb. 1). Aus den lymphatischen Vorläuferzellen entwickelt sich das spezifische Immunsystem, die B- und T-Lymphozyten. Die myeloiden Vorläuferzellen entwickeln sich weiter zu den verschiedenen Granulozyten und Monozyten. Diese Zelltypen stellen das unspezifische Immunsystem dar.

### **1.4.1 Zellen des unspezifischen Immunsystems – Phagozyten**

Zu den Phagozyten gehören Makrophagen, neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen. Phagozyten erzeugen eine Reihe bakterien-toxischer Sub-

Abbildung 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ZELLEN DES IMMUNSYSTEMS



stanzen, u.a. Wasserstoffperoxid und Stickstoffoxid. In diesem als „Respiratory Burst“ bezeichneten Vorgang werden über die Aktivierung einer NADPH-Oxidase bakteriotoxische Superoxide gebildet.

Es ist bekannt, dass maschinelle Beatmung zu einem Einstrom von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in die Lunge führt und damit zur Entstehung von BPD beiträgt [114]. Im Folgenden sollen die wichtigsten Arbeiten hierzu kurz umrissen werden.

**Makrophagen** übernehmen die unspezifische Erstabwehr und locken chemotaktisch neutrophile Granulozyten an. Monozyten aus dem Blut differenzieren sich kontinuierlich bei dem Durchtritt durch das Endothel ins Gewebe zu Makrophagen. Diese kommen in großer Zahl in der Lunge, Leber und der Milz vor. Aktuelle Studien lassen vermuten, dass Alveolarmakrophagen in der Entstehung von VILI direkt und indirekt über die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten eine Rolle spielen. Franz et al. konnten zeigen, dass hohe Tidalvolumina und niedrige end-expiratorische Drücke zur Abnahme der Alveolarmakrophagen in der BAL führen, vermutlich als Folge vermehrter Aktivierung und Adhäsion. Durch Hemmung der Alveolarmakrophagen konnten die Neutrophilenzahlen in der Lunge reduziert und beatmungsinduzierte Lungenverletzungen verringert werden [33].

**Neutrophile Granulozyten** stellen die wichtigste Komponente der zellulären Immunantwort dar. Erbliche Fehlfunktionen der neutrophilen Granulozyten führen zu lebensbedrohlichen bakteriellen Infektionen. Die Fähigkeit neutrophiler Granulozyten, sich dem Gefäßendothel anzulagern und es zu durchwandern, ist elementar für ihre Funktion in der Immunabwehr [74]. Bis zu einem Drittel aller neutrophilen Granulozyten außerhalb des Knochenmarks befinden sich in der Lunge. Durch diesen großen Anteil kann die Lunge die Zahl im Organismus zirkulierender neutrophiler Granulozyten potentiell

stark beeinflussen [17].

Dabei scheinen neutrophile Granulozyten in der Entwicklung verschiedener Lungenerkrankungen mit inflammatorischer Komponente wie BPD oder VILI eine zentrale Rolle zu spielen. Es konnte gezeigt werden, dass es infolge maschineller Beatmung zu einer neutrophilen Infiltration der Lunge kommt [17]. In Tiermodellen führte maschinelle Beatmung zur Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren, gefolgt vom Einstrom neutrophiler Granulozyten in die Lunge [114]. Eine Verringerung des neutrophilen Einstromes, z.B. im Tiermodell mit granulozyten-armen Hasen, zeigte weit weniger pathologische Veränderungen der Lungenfunktion infolge maschineller Beatmung [56]. Auch eine Blockade des Interleukin-8-Rezeptors CXCR2 führte zur Reduktion des neutrophilen Einstroms und zu verminderten Komplikationen maschineller Beatmung [4, 56]. Die pathophysiologische Bedeutung der Interleukin-8-Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 in diesem Zusammenhang wird im entsprechenden Abschnitt weiter unten detaillierter dargestellt.

#### **1.4.2 Zellen des spezifischen Immunsystems – Lymphozyten**

Es gibt B- und T-Lymphozyten, die sich in ihren Antigenrezeptoren und dem Ort ihrer Differenzierung unterscheiden: T-Lymphozyten im Thymus und B-Lymphozyten im Knochenmark. T-Lymphozyten differenzieren sich nach Antigen-Kontakt zu T-Effektorzellen mit verschiedenen Funktionen. B-Lymphozyten differenzieren sich nach Kontakt mit einem Antigen zu antikörper-produzierenden Plasmazellen. Eine Sonderstellung nehmen die natürlichen Killerzellen ein, die zwar aus derselben lymphatischen Vorläuferzelle entstehen, aber keine Antigen-spezifität besitzen.

Wie weiter oben bereits erwähnt gehen Lungenerkrankungen wie VILI oder BPD mit einer inflammatorischen Komponente einher. Im Rahmen die-

ser entzündlichen Reaktion kommt es zum Einstrom von Entzündungszellen wie neutrophilen Granulozyten und Makrophagen sowie zu einer vermehrten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine. Neben Granulozyten und Makrophagen sind auch Lymphozyten in chronischen Entzündungsprozessen involviert [2]. Mehrere Studien untersuchten die Lymphozytenzahl frühgeborener Kinder. Dabei konnten bei unreifen Kindern, bzw. bei Kinder welche in der Folge BPD entwickelten, erniedrigte Lymphozytenzahlen festgestellt werden [2, 14]. Diese erniedrigte Lymphozytenzahl könnte zu der in dieser Patientengruppe beobachtete Infektneigung beitragen [127].



## 1.5 Entzündung und Immunantwort – zelluläre Mechanismen

### 1.5.1 Interleukin-8 und seine Rezeptoren CXCR 1 + 2

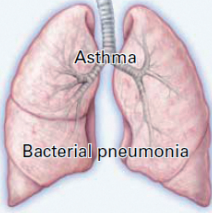
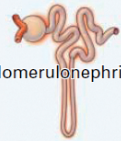

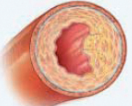

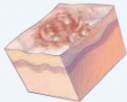
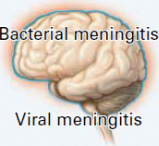
**Interleukin-8** Interleukin-8 gehört zu den Chemokinen. Chemokine sind „chemoattractant cytokines“, Zytokine, die andere Zellgruppen chemotaktisch anlocken können. Chemokine werden in vier Gruppen eingeteilt, abhängig von den Cysteinresten am NH<sub>2</sub>-Ende des Moleküls

- CC-Chemokinen mit zwei benachbarten Cysteine
- CXC-Chemokinen, in denen eine weitere Aminosäure die beiden Cysteine voneinander trennt
- CX<sub>3</sub>C-Chemokinen, bei denen die beiden Cysteine durch drei Aminosäuren getrennt sind und
- die XC-Chemokine, von denen bisher nur eines bekannt ist, mit nur einem Cystein am NH<sub>2</sub>-terminalen Ende [73]

Chemokine spielen bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen eine wichtige Rolle (Abb. 2) [72].

Abbildung 2: CHEMOKINE BEI ENTZÜNDLICHEN ERKRANKUNGEN

[72]

Inflammatory Disease	Infiltrate	Chemokine
 <p>Acute respiratory distress syndrome</p> <p>Asthma</p> <p>Bacterial pneumonia</p> <p>Sarcoidosis</p>	Neutrophil	Interleukin-8; GRO- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ ; ENA-78
	Eosinophil, T cell, monocyte, basophil	MCP-1, -4; MIP-1 $\alpha$ ; eotaxin; RANTES
	Neutrophil	Interleukin-8, ENA-78
	T cell, monocyte	IP-10
 <p>Glomerulonephritis</p>	Monocyte, T cell, neutrophil	MCP-1, RANTES, IP-10
 <p>Rheumatoid arthritis</p> <p>Osteoarthritis</p>	Monocyte, neutrophil	MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, interleukin-8, ENA-78
		MIP-1 $\beta$
 <p>Atherosclerosis</p>	T cell, monocyte	MCP-1, -4; IP-10
 <p>Inflammatory bowel disease</p>	Monocyte, neutrophil, T cell, eosinophil	MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , eotaxin, IP-10, interleukin-8
 <p>Psoriasis</p>	T cell, neutrophil	MCP-1, IP-10, MIG, GRO- $\beta$ , interleukin-8
 <p>Bacterial meningitis</p> <p>Viral meningitis</p>	Neutrophil, monocyte	Interleukin-8; GRO- $\alpha$ ; MCP-1; MIP-1 $\alpha$ , -1 $\beta$
	T cell, monocyte	MCP-1, IP-10

Die Produktion proinflammatorischer Chemokine kann durch gezielte Beatmung mit niedrigen Tidalvolumina und PEEP reduziert werden. Dies lässt vermuten, dass invasive Beatmung über einen Anstieg proinflammatorischer Chemokine zur Entstehung von VILI beiträgt [33].

Interleukin-8 gehört zur Familie der CXC-Chemokine. CXC-Chemokinen wirken an CXC-Rezeptoren, von denen aktuell fünf verschiedene Typen bekannt sind (CXCR 1-5). Interleukin-8 bindet an die CXC-Rezeptoren 1 und 2 (CXCR1 + CXCR2), auf die im Weiteren genauer eingegangen wird. Einen Überblick über die bekannten CXC-Chemokine und deren Rezeptoren bietet Tab. 1.

Tabelle 1: CXC-CHEMOKINE UND DEREN REZEPTOREN

<b>CXC-Chemokin</b>	<b>Rezeptor</b>
IL-8	CXCR1 / CXCR2
PBP	CXCR2
$\beta$ -TG	CXCR2
NAP-2	CXCR2
GRO a,b,g	CXCR2
IP-10	CXCR3
SDF-1	CXCR4
BLC	CXCR5

Interleukin-8 wird in der Lunge u.a. von Alveolarmakrophagen und Monozyten produziert. Es wirkt stark chemotaktisch und aktivierend auf neutrophile Granulozyten [13]. Weiter wirkt Interleukin-8 proinflammatorisch [77] und hat Einfluss auf die Angiogenese [64]. Donnelly et al. entdeckten Interleukin-8 als prognostischen Faktor für die Entwicklung eines akuten Atemnotsyndroms (ARDS). Bei Patienten, welche im Verlauf an ARDS erkrankten, konnte initial eine signifikante höhere Interleukin-8-Konzentration im BALF gemessen werden im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne ARDS [25].

Obgleich eine große Anzahl Studien die pathophysiologische Bedeutung von Interleukin-8 beim Erwachsenen untersuchten, sind nur wenige Daten über Interleukin-8 beim Kind, speziell beim Neugeborenen, verfügbar. Eine der wenigen Arbeiten mit Frühgeborenen stammte von Munshi et al.. Sie beobachteten bei 25 vor der 32. Schwangerschaftswoche geborenen Kindern, die später eine BPD entwickelten, einen Anstieg von Interleukin-8 in den ersten Lebenstagen, gefolgt von einer Erhöhung der Neutrophilen-Zahl am 5. und 7. Lebenstag [81]. Eine inflammatorische Komponente bei der Entstehung der BPD lässt auch eine Studie von Kotecha et al. vermuten. Neugeborene, die später BPD entwickelten, hatten am zehnten Lebenstag signifikant höhere Interleukin-8-Werte und Neutrophilen-Zahlen im BALF als Neugeborene, die keine BPD entwickelten [59].

Beim Menschen kommt Interleukin-8 sowohl in gelöster Form im Blut als auch gebunden an Endothelzellen der Blutgefäße vor. Sowohl in gelöster als auch gebundener Form scheint Interleukin-8 ein Aktivator der  $\beta 2$  - Integrin - vermittelten Zelladhäsion neutrophiler Granulozyten zu sein. Neutrophile Granulozyten, welche an der Gefäßwand entlangrollen, werden durch Interleukin-8 gestoppt und binden an das Endothelium [24]. Luu et al. zeigten, dass Interleukin-8 auch bei der Transmigration der neutrophilen Granulozyten durch das Endothel ins Gewebe benötigt wird [74]. Die Adhäsion und Transmigration von neutrophilen Granulozyten aus der Blutbahn in das Gewebe ist von großer Bedeutung bei der unspezifischen Immunabwehr. Ähnliche Wirkung hat Interleukin-8 auf Monozyten, auch hier wird die feste Adhäsion der Monozyten an der Gefäßwand gefördert [37].

Durch die Initiierung und Unterhaltung einer inflammatorischen Kaskade scheint Interleukin-8 eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der VILI zu spielen.

**Interleukin-8 Rezeptoren CXCR1 + CXCR2** Zielrezeptoren für Interleukin-8 sind CXCR1 und CXCR2 [105], beides G-Protein gekoppelte Rezeptoren [110]. Beide Rezeptoren sind auf neutrophilen Granulozyten im Blut stark exprimiert [49, 16]. Auch andere Zellen des Immunsystems exprimieren CXCR1 und CXCR2, darunter Mastzellen [71], eosinophile Granulozyten [91], basophile Granulozyten [61], T-Lymphozyten und Monozyten [66]. Die Akkumulation von neutrophilen Granulozyten in der Lunge, getriggert unter anderem durch maschinelle Beatmung, spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung von BPD [114, 17]. Diese Akkumulation muss als dynamischer Prozess betrachtet werden, bestehend aus neutrophiler Migration in die Lunge einerseits und kontrollierter Apoptose neutrophiler Granulozyten in der Lunge andererseits. CXCR1 und CXCR2 scheinen regulierend in diesen Prozess einzugreifen.

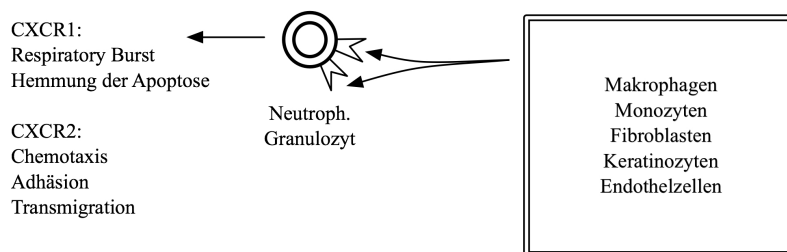
Dabei legen Studien von White et al. sowie Samanta et al. den Schluss nahe, dass CXCR2 vor allem bei der Migration von neutrophilen Granulozyten eine wichtige Rolle spielt [125, 106]. Spätere Studien bestätigten dies und zeigten weiter, dass eine selektive Blockade von CXCR2 sowohl die Transmigration als auch die Zelladhäsion von neutrophilen Granulozyten massiv behindert [74]. Auch zeigten granulozyten-arme Kaninchen weit weniger pathologische Veränderungen der Lungenfunktion bei Beatmung [56].

Der Einstrom von neutrophilen Granulozyten in das Lungengewebe konnte durch eine Blockade von CXCR2 verringert und die beatmungs-induzierten Veränderungen abgeschwächt werden [4].

Die Aktivierung von CXCR1 scheint Einfluss auf die neutrophile Apoptoserate zu haben. Interleukin-8 führt *in vitro* zu einer Abnahme der neutrophilen Apoptoserate [27]. Die zeitgleiche Gabe von Interleukin-8 und einem spezifischen Anti-CXCR1-Antikörper hatte eine Normalisierung der neutro-

philen Apoptoserate zur Folge verglichen mit neutrophilen Granulozyten, welche mit Interleukin-8 allein inkubiert wurden [67]. Neben seiner Funktion in der Regulation der Apoptoserate führt CXCR1 bei hohen Interleukin-8-Konzentrationen zu einer Aktivierung des Respiratory Burst [53], einem wichtigen Mechanismus bei der Bekämpfung bakterieller Infektionen. Eine Übersicht hierzu bietet Abb. 3.

Abbildung 3: Interleukin-8 – PRODUKTION UND FUNKTION



### 1.5.2 NGF und TrkA

**NGF** NGF wurde als erstes Mitglied der Familie der Neurotrophine, welche auch Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), Neurotrophin-3 (NT-3) und Neurotrophin-4/5 (NT-4/5) beinhaltet, vor mehr als fünf Jahrzehnten von Rita Levi-Montalcini identifiziert (s. Abb. 4) [68, 70]. 1986 erhielt sie zusammen mit Stanley Cohen den Nobelpreis für Medizin für ihre Arbeiten zu NGF. Neurotrophine spielen bei der Entwicklung, dem Wachstum und der Instandhaltung des Nervensystems eine wichtige Rolle sowohl in der Embryogenese

Abbildung 4: RITA LEVI-MONTALCINI



als auch postnatal [70]. In den letzten Jahren wurden Neurotrophine auch in nicht-neuronalem Gewebe wie Lunge, Nieren und Darm nachgewiesen [100, 41, 40, 96].

Die unterschiedlichsten Zelltypen synthetisieren NGF in vitro. Dazu gehören Zellen des Immunsystems, d.h. Mastzellen [65, 84, 128], eosinophile Granulozyten [113, 57], Lymphozyten [107, 63], Monozyten [30] und Makrophagen [75, 9]. Daneben produzieren auch Fibroblasten, Epithelzellen und Glatte Muskelzellen NGF [82, 118, 31, 93, 86, 34]. Einen Überblick über NGF-produzierende Zellen und NGF-Zielzellen beim Menschen gibt Tab. 2 [7].

Tabelle 2: NGF – PRODUZIERENDE UND SENSIBLE ZELLEN

Zellen	NGF-prod.	NGF-Zielzellen
Mastzellen	+	+
B-Lymphos	+	+
T-Zellen	+	+
CD4+Th1	+/-	-
CD4+Th2	+	-
Neutrophile	-	+
Eosinophile	+	+
Basophile	-	+
Epithelzellen	+	+
Fibroblasten	+	+

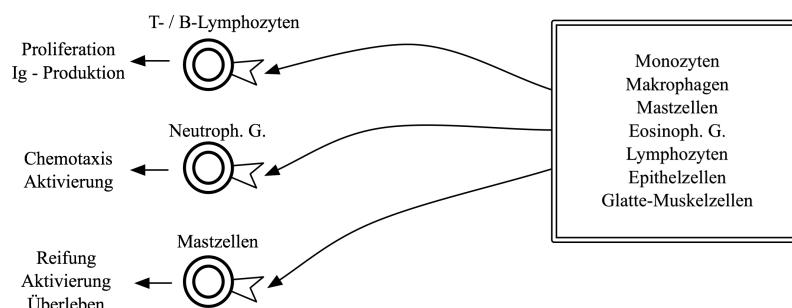
---

"-" = noch keine Studie verfügbar

Studien der letzten Jahre legen den Schluss nahe, dass NGF auch bei entzündlichen Reaktionen eine Schlüsselrolle als Entzündungsmediator einnimmt. NGF beeinflusst die Proliferation von B- und T-Lymphozyten, die Produktion von Immunglobulinen und wirkt chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten in vitro und in vivo [87, 36, 8]. Bei Mastzellen stimuliert NGF Reifung, Überleben und Aktivierung (s. Abb. 5) [69, 1].

In der Lunge gehen erhöhte NGF-Spiegel mit bronchialer Hyperreakti-

Abbildung 5: NGF-PRODUKTION UND FUNKTION



vität und Asthma einher [48, 6]. Friberg et al. konnten im Tiermodell eine Hyperreaktivität und eine verstärkte bronchiale Obstruktion auf Histamingabe nach vorheriger intravenöser NGF-Gabe feststellen [35]. Hoyle et al. kombinierten bei Mäusen das NGF-codierende Gen mit dem Promotor des lungenspezifischen Clara-Zell sekretorischen Proteins mit dem Resultat einer spezifisch NGF überproduzierenden Maus. Diese Mäuse zeigten eine erhöhte Sensitivität auf Reizung mit Capsaicin und einen in Folge erhöhten Atemwiderstand [52].

NGF scheint eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Unterhaltung bronchialer Hyperreaktivität zu spielen. Auch Frühgeborene können bei langer maschineller Beatmung eine bronchiale Hyperreaktivität entwickeln [102]. Über den Entstehungsmechanismus von bronchialer Hyperreaktivität bei beatmeten Frühgeborenen und die Rolle von NGF bei diesem Vorgang ist allerdings noch nichts bekannt.

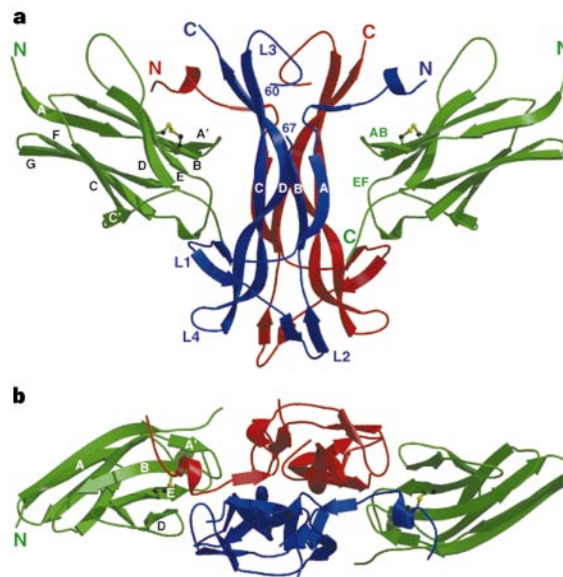


**TrkA–Rezeptor für NGF** Neurotrophine binden an zwei Rezeptortypen auf der Zelloberfläche:

- Rezeptoren mit instrinsischer Tyrosin-Kinase-Aktivität, den sogenannten Trk-Rezeptoren
- p75-Rezeptoren aus der Familie der Tumor Nekrose Faktor-Rezeptoren [88]

NGF bindet spezifisch mit hoher Affinität an TrkA-Rezeptoren und mit niedriger Affinität an den p75-Rezeptor [126].

Abbildung 6: TrkA + NGF



TrkA besteht aus fünf extrazellulären Domänen, wobei NGF nur an eine dieser Domänen, der Trk-d5-Domäne, andockt. Der TrkA-Rezeptor wird durch Dimerisation aktiviert, was zu einer Autophosphorylierung intrazellulärer Tyrosin-Reste führt. Dieser Effekt triggert die weitere Signaltransduktionskaskade [120]. Abb. 6 zeigt die Struktur der TrkA-d5-Domäne (grün) mit andocktem NGF (blau und rot) [126].

TrkA-Rezeptoren wurden auf unterschiedlichen Zelltypen nachgewiesen, darunter Zellen des Nervensystems, des Immun- und endokrinen Systems [87, 79, 89]. In der Lunge konnte TrkA auf Makrophagen, bronchialen glatten Muskelzellen, Alveolen, auf lymphoidem Gewebe der Bronchien und auf Zellen der glatten Arterienmuskulatur nachgewiesen werden [100]. Inflammatorische Zellen wie z.B. Monozyten oder B- und T-Lymphozyten exprimieren TrkA und werden über NGF sowohl autokrin als auch parakrin reguliert [63, 117, 30]. Auch auf neutrophilen Granulozyten wurde TrkA nachgewiesen. Hier scheint es Einfluss auf die neutrophile Überlebenszeit und auf verschiedener Abwehrfunktionen wie der Produktion von Superoxiden oder der Phagozytose zu haben [55]

## 1.6 Zielsetzung

**Interleukin-8** Langzeit-beatmete Frühgeborene sind einem hohen Risiko bezüglich der Entstehung von VILI ausgesetzt. Zahlreiche Studien berichten über hohe Konzentrationen des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-8 im BALF dieser Kinder. Dennoch ist bisher wenig über die Expression der Interleukin-8-Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 und deren biologische Relevanz auf Entzündungszellen der Lunge bei diesen Patienten bekannt.

Unser Ziel war die klinisch-experimentelle Untersuchung der Interleukin-8-Rezeptor-Interaktion und deren Auswirkung auf die Akkumulation von Entzündungszellen in der Lunge beatmeter Frühgeborener longitudinal über die gesamte Beatmungsdauer darzustellen.

**NGF** NGF konnte in den letzten Jahren als immunomodulatorischer Faktor in chronischen Atemwegserkrankungen wie Asthma bronchiale oder bronchialer Hyperreaktivität identifiziert werden. Die Freisetzung von NGF wird

durch proinflammatorische Zytokine (IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), welche auch bei langzeitbeatmeten Frühgeborenen erhöht sind, stimuliert. Uns interessierte ob NGF auch im Trachealsekret Frühgeborener nachgewiesen werden kann, und falls ja, ob die NGF-Konzentration von Beatmungsdauer oder anderen klinischen Variablen abhängig ist. Daneben wurde die Expression des hoch-affinen NGF-Rezeptors TrkA auf pulmonalen Entzündungszellen untersucht.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Probanden**

Diese prospektive Longitudinalstudie begann im Mai 2004, nachdem die Ethikkommission ihr Einverständnis gegeben hatte. Es wurden alle intubiert beatmeten Neugeborenen, unabhängig von Gestationsalter und Geburtsgewicht, eingeschlossen. Ausschlusskriterien waren die Diagnose von Mekonium-Aspirations-Syndrom sowie große Fehlbildungen. Die Kinder wurden im Zeitraum von Mai 2004 bis Januar 2005 im Universitätsklinikum Grosshadern der Ludwig-Maximilian-Universität München (29 Kinder) bzw. der Universitätsfrauenklinik der Ludwig-Maximilian-Universität München (2 Kinder) geboren. Die Eltern der Kinder gaben ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie.

Insgesamt wurden 31 Kinder in die Studie eingeschlossen. Von diesen 31 Kindern verstarben zwei extrem unreife Kinder (Gestationsalter 25+0 SSW bzw. 24+2 SSW) während der Studie.

Für die Untersuchung des Trachealsekretes wurden die Kinder 6x pro Woche, von Montag bis Samstag, mit Hilfe des Trachcare-Systems (Habel Medizintechnik, Wien, Österreich) abgesaugt, bis zur Extubation oder dem Ausschluss aus der Studie. Die Kinder wurden morgens zwischen 8 Uhr und 10 Uhr abgesaugt. Nach Surfactant-Gabe wurden die Kinder für mindestens 6 Stunden nicht abgesaugt.

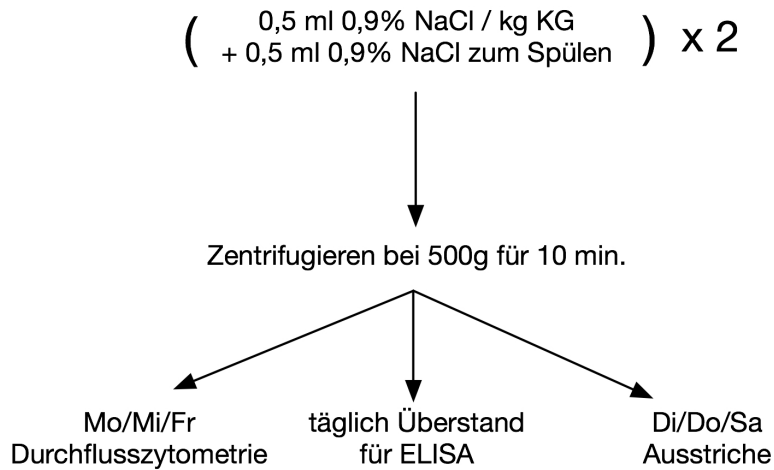
### **2.2 Sekretgewinnung und Verarbeitung**

Für die Gewinnung des Sekretes wurden 0,5 ml pro Kilogramm Körpergewicht sterile Kochsalzlösung (NaCl 0,9%), auf Körpertemperatur vorgewärmt, durch den Absaugkatheter in den endotrachealen Tubus eingespritzt und

anschließend zusammen mit dem Sekret des Kindes abgesaugt. Der Absaugdruck betrug je nach Größe des Kindes maximal 0,2 mbar. Der Katheter wurde mit 0,5 ml Kochsalzlösung gespült und das herausgespülte Sekret ebenfalls gesammelt. Die gesamte Prozedur wurde einmal wiederholt.

Das Sekret wurde anschließend bei +4° Celsius gelagert und innerhalb von drei Stunden weiterverarbeitet. Makroskopisch blutige Sekrete wurden verworfen. Das Sekret wurde bei 500 g bzw. 1500 rpm bei +4° Celsius für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Ablauf der 10 Minuten ließen wir die Zentrifuge ohne Einsatz der Bremsfunktion ausrotieren. Der Überstand des Sekretes wurde abpipetiert und bei -72° Celsius für die spätere Zytokin - Bestimmung eingefroren. Das Pellet wurde abhängig von dem Wochentag auf verschiedene Weise weiterverarbeitet (s. Abb. 7).

Abbildung 7: TAGESSCHEMA FÜR DIE WEITERVERARBEITUNG  
DES TRACHEALSEKRETES



## 2.3 FACS-Analyse

Die FACS-Analyse stellt eine Erweiterung der klassischen Durchflusszytometrie dar. Sie ermöglicht eine schnelle Analyse verschiedener Parameter in Flüssigkeit gelöster Zellen. Ein Laser tastet die Zellen einzeln ab und emittiert dabei ein durch Zellgröße und Granularität der Zelle beeinflusstes Streulicht. Die Beugung des Laserlichts wird als Vorwärtsstreulicht (engl. FSC=Forward Scatter) bezeichnet und erlaubt Rückschlüsse auf die Zellgröße; die Brechung des Laserlichts wird als Seitwärtsstreulicht (engl. SSC=Side Scatter) bezeichnet und ist ein Maß für die Granularität einer Zelle.

Zudem können die Zellproben mit fluoreszierenden Antikörpern gegen die gewünschten Oberflächenmarker beimpft werden. Die Antikörper tragen verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe, am häufigsten verwendet werden FITC (Fluorescein Isothiocyanate) oder PE (Pycocerythrin), die je ein unterschiedliches Lichtrückemissionsmaximum haben. Daneben verwendeten wir auch APC- (Allophycocyanin) bzw. Cy5- (Cyanine-5) gefärbte Antikörper (s. Tab. 3).

Je nach vorhandenem Durchflusszytometer lassen sich mit verschiedenfarbigen Lasern bis zu einem Dutzend verschiedener Oberflächenmarker auf einer Zelle untersuchen. Auf diese Weise lässt sich beispielsweise die Expression mehrerer Rezeptortypen auf einzelnen Zellpopulationen beobachten.

Tabelle 3: VERWENDETE FLUORESZENZFARBSTOFFE

<b>Fluorochrom</b>	<b>max. Anregung</b>	<b>Rückemission</b>	<b>Farbe</b>
FITC	488nm	520nm	grün
APC	595nm	660nm	rot
Cy5	488nm	670nm	rot
PE	488nm	575nm	rot-orange

### 2.3.1 Durchführung

An den Tagen Montag, Mittwoch und Freitag wurden je 250 µl Pellet, aufgeteilt auf fünf Eppendorf-Röhrchen zu je 50 µl, für die Analyse von Oberflächenmarkern mit Hilfe eines Durchflusszytometers wie folgt vorbereitet. Mit Ausnahme von TrkA waren alle Antikörper direkt fluoreszenz-markiert. TrkA wurde indirekt fluoreszenz-markiert, d.h. ein zweiter fluoreszenz-markierter Antikörper bindet an den ersten spezifischen Antikörper. Die drei Röhrchen wurden nach unten gezeigtem Schema mit verschiedenen Antikörpern gefärbt (s. Tab. 4, CXCR1: CD181, Klon 5A12, Cy5; CXCR2: CD182, Klon 6C6, APC; CD15: Klon MMA, FITC; alle Antikörper von BD Biosciences, San Jose, USA. TrkA: Oncogene Research Products, Cambridge, USA).

Tabelle 4: ANTIKÖRPER-FÄRBESCHEMA

<b>Tube</b>	<b>Nr. 1</b>	<b>Nr. 2</b>	<b>Nr. 3</b>
<b>Färbung</b>			
<b>FITC</b>	CD15	CD15	CD15
<b>PE</b>		TRKa	IgG
<b>CY5</b>	CXCR1		IgG
<b>APC</b>	CXCR2		IgG

#### **Verdünnungen in PBS**

CD15	1:2
CXCR1	1:2
CXCR2	1:2
IgG	1:2
TRKa	1:2

1. Von jedem Antikörper wurden 5 µl pipetiert. Die Antikörper wurden im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt. Pro Röhrchen war jede Färbung (FITC, PE, CY5, APC) nur einmal enthalten.

2. Die Proben wurden anschließend für 20 Minuten bei +4° Celsius im Dunkeln inkubiert.
3. Nach Zugabe von 250 µl PBS in jedes Röhrchen wurde die FACS-Analyse durchgeführt.
4. Röhrchen Nr. 2 wurde indirekt fluoreszenz-gefärbt. Nach Zugabe des TRKa-Antikörpers und Inkubation wie beschrieben wurden 300 µl PBS zugegeben und bei 3000 rpm zentrifugiert. 250 µl Überstand wurden abpipetiert und danach 5 µl Goat-Antikörper zu dem Pellet gegeben und 20 Minuten wie o.g. inkubiert. Danach wurden 250 µl PBS hinzugegeben und durchflusszytometrisch analysiert.

Jede Probe wurde für 3 Minuten gemessen bzw. bis zum Erreichen einer Zellzahl von 1 Million, je nachdem was zuerst eintrat.

### **2.3.2 Auswertung**

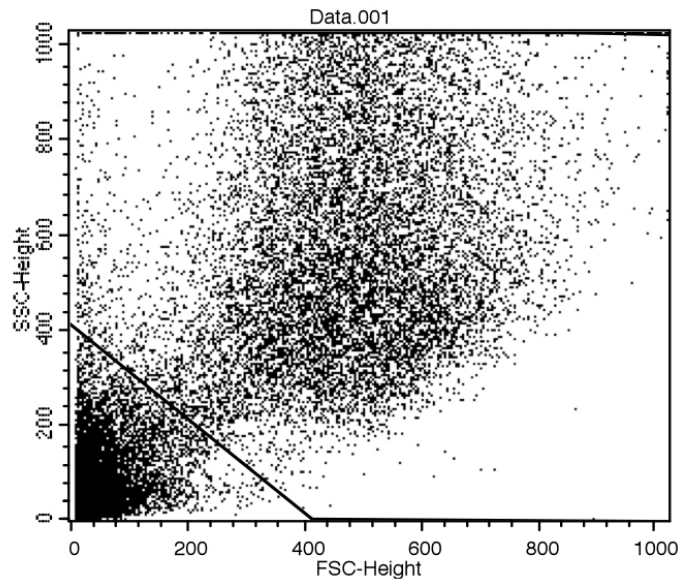
Die Analyse und Auswertung der Proben erfolgte auf einem FACS-Calibur mit dem Programm „Cellquest Pro“ Version 4.0.2 (BD Biosciences, San Jose, USA). In einem Dot-Plot-Schaubild wurden die Zellen nach Größe und Granularität geordnet dargestellt (s. Abb. 8).

In einem ersten Arbeitsschritt wurden Zelldetritus und tote Zellen von der weiteren Analyse anhand ihrer charakteristischen sehr geringen Größe und Granularität ausgeschlossen. Bei den verbleibenden Zellen wurde die Expression von CXCR1 (% CXCR1+), CXCR2 (% CXCR2+) und TrkA (% TrkA+) gemessen. Aufgrund der möglichen Autofluoreszenz der Zellen wurde bei jeder Messung zusätzlich ein Kontrollantikörper (=Isotyp-Kontrolle) verwendet. Um die unspezifische Antikörperbindung bei der Berechnung der Expressionswerte zu berücksichtigen, wurde stets anhand dieser



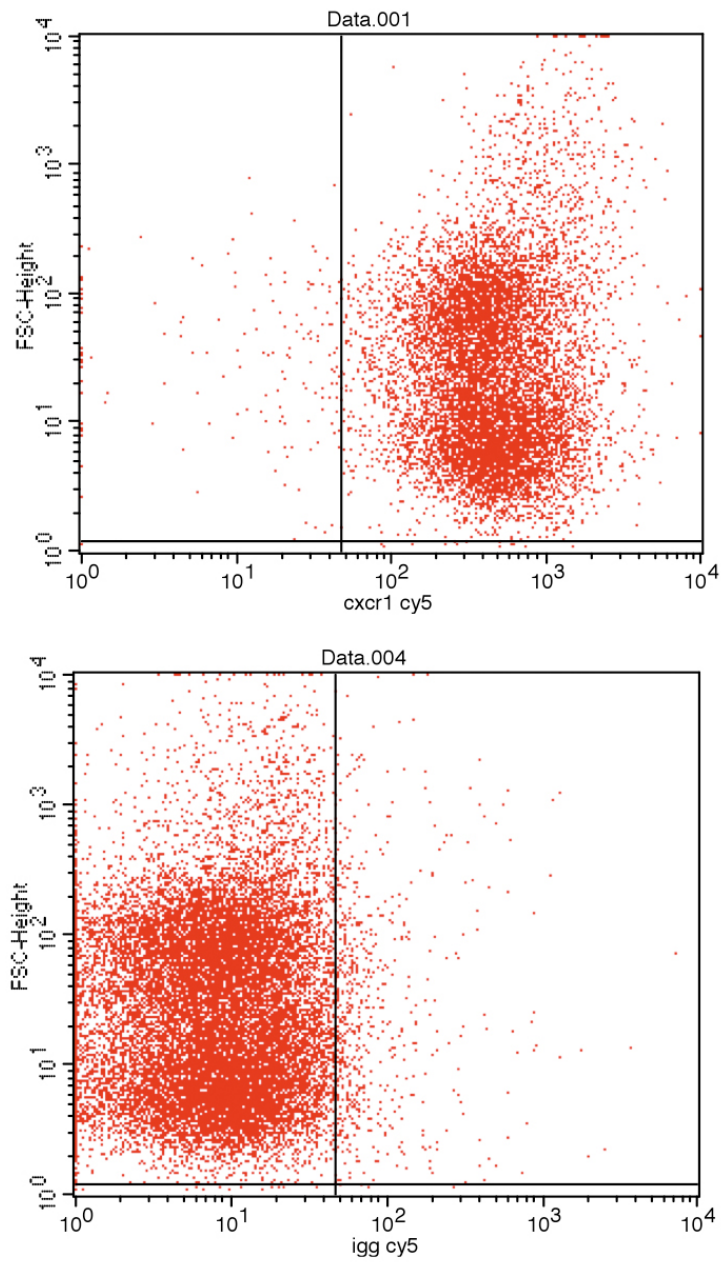
Isotyp-Kontrolle ein Cut-Off-Wert definiert (Abb. 9).

Abbildung 8: SSC-FSC GESAMTPOPULATION



Typische Darstellung der Gesamtpopulation aller Zellen des Trachealsekretes eines Kindes. Die Y-Achse (= Side-Scatter, SSC) zeigt die Granularität einer Zelle, die X-Achse (= Forward-Scatter, FSC) ist ein Maß für die Größe einer Zelle. Es lässt sich klar eine Population von Zellen mit niedrigem FSC und niedrigem SSC abgrenzen. Diese Zellen sind also sehr klein und haben kaum granuläre Zellstrukturen. Hierbei handelt es sich um Zelldetritus. Diese Zelltrümmer wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Abbildung 9: ANALYSE DER SUBPOPULATION AUS ABB. 8



Nachdem Zelldetritus im FSC-SCC-Schaubild ausgeschlossen werden konnten (s. Abb. 8) wurden die verbleibenden Zellen auf die Expression unserer Rezeptoren hin untersucht. Beispielhaft ist hier die Analyse auf CXCR1 gezeigt. Das obere Schaubild zeigt beispielhaft die Expression von CXCR1 in einem unserer Patienten. Die passende Isotyp-Kontrolle ist unten dargestellt. Aus der Differenz zwischen CXCR1-Expression und unspezifischer Bindung des Isotyps berechnet sich die tatsächliche Expression von CXCR1.

## 2.4 Anfertigung und Auswertung der Ausstriche

Zu dem aus der Zentrifugation des Trachealsekretes (siehe Abb. 7) gewonnenem Pellet wurden je 200 µl auf einem handelsüblichen Objektträger verstrichen; die Ausstriche wurden unter einem Handfön bei Kaltluft getrocknet und nach der Pappenheimmethode (May Grünwald + Giemsa) gefärbt. Die Ausstriche wurden unter einem Lichtmikroskop auf Keime und Pilze untersucht. Es wurden 100 Zellen pro Ausstrich gezählt und der prozentuale Anteil an neutrophilen Granulozyten, unreifen Granulozyten, Lymphozyten, Alveolarmakrophagen, Monozyten, eosinophilen Granulozyten, basophilen Granulozyten und Mastzellen sowie das Vorhandensein von Pilzen und Bakterien notiert.

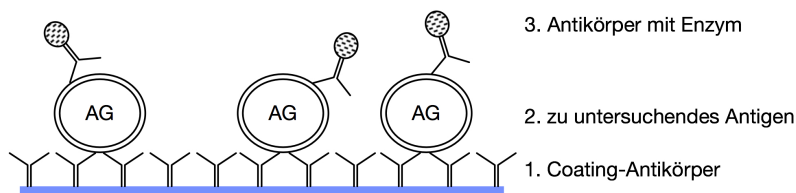
## 2.5 Quantitative Bestimmung der Zytokine

ELISA steht für Enzyme Linked Immunosorbent Assay und bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren auf Basis einer enzymatischen Farbreaktion.

Mit ELISA können kleinste Stoffkonzentrationen nachgewiesen werden. Der gesuchte Stoff dient dabei als Antigen für einen spezifischen Antikörper. Bei den von uns benutzten ELISAs handelt es sich um sogenannte Sandwich-ELISAs, die zwei Antikörper verwenden. Dabei binden beide Antikörper an verschiedene Strukturen desselben Antigens. Abb. 10 zeigt schematisch den Aufbau einer Sandwich-Elisa. Der erste Antikörper, der sog. Coating-Antikörper, wird an eine feste Phase gebunden (1). Das Antigen bindet an den Coating-Antikörper (2). Nicht-gebundenes Antigen wird abgewaschen. Der zweite Antikörper ist mit einem Enzym, meist alkalische Phosphatase, versehen und bindet an das Antigen (3). Das Enzym katalysiert eine Farb-

reaktion, die am Photometer verfolgt werden kann. Die Intensität der Farbe ist dabei proportional zur Konzentration des zu bestimmenden Antigens in der Probe.

Abbildung 10: AUFBAU EINER SANDWICH-ELISA



1. der Coating-Antikörper wird an eine feste Phase gebunden, in der Regel an die Wand des Wells.
2. Das Antigen bindet an den Coating-Antikörper. Nicht gebundenes Antigen wird abgewaschen.
3. Der zweite Antikörper bindet an das Antigen. Ein an den Antikörper gebundenes Enzym katalysiert eine Farbreaktion deren Intensität proportional zu der Antigenmenge ist.

**Durchführung** Es wurden die Mediatoren Interleukin-8 und NGF an den Tagen nach Intubation 0, 1, 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42 bzw. bis zum Ende der endotrachealen Beatmung bestimmt. Konnte an den genannten Tagen kein Trachealsekret gewonnen werden, so wurde das bis maximal 24h früher oder später gewonnene Sekret verwendet und der dazugehörige Intubationstag notiert.

**Korrekturfaktor für Trachealsekret** Das aspirierte Trachealsekret ist durch die bei der Gewinnung zugegebene Kochsalzlösung immer mehr oder weniger stark verdünnt. Die meist - diskutierten Korrekturfaktoren sind im

Folgenden dargestellt:

- *Albumin* ist einfach zu messen, aber starken Schwankungen bei pulmonalen Infektionen unterworfen.
- die *sekretorische Komponente von IgA (IgAsc)* ist besser als Korrekturfaktor geeignet als Albumin, allerdings teuer in der Messung und bei gleichzeitigen Lungeninfektionen unzuverlässig.
- *Harnstoff* ist kostengünstig zu messen, allerdings von der Dauer der Aspiration und der Gefäßpermeabilität abhängig [19].

Es ist somit zur Zeit kein valider, von Störgrößen wie Gestationsalter, pulmonalen Infekten etc. unabhängiger Korrekturfaktor bekannt. Entsprechend der Empfehlung von deBlic et al. und der *European Respiratory Society* haben wir auf die Bestimmung eines Korrekturfaktors bewusst verzichtet. Statt dessen wurde, wie von der *European Respiratory Society* empfohlen, ein strikt standardisiertes Protokoll bei der Aspiration befolgt, um vergleichbare Resultate zu erzielen [21].

**Interleukin-8** Für die Bestimmung von Interleukin-8 wurde ein Instant-ELISA-Kit benutzt (Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative detection of soluble human Interleukin-8, Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria). Musste die Probe aufgrund zu geringen Materials oder außerhalb der Messbereichs des Tests liegenden Wertes verdünnt werden, so wurde die mitgelieferte Verdünnungslösung benutzt. Die ELISA wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt und nach Inkubation mit einem ELISA-Reader bei 450 nm gemessen.

**NGF** Für die Bestimmung von NGF wurde ein NGF-ELISA-Kit gewählt (NGF Emax Immunoassay System, Promega Corporation, Madison, USA).

Die ELISA wurde nach dem mitgelieferten Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Proben wurden vor der Messung wie im Protokoll des Herstellers empfohlen angesäuert bis zu einem pH von  $\sim 2,6$  und anschließend neutralisiert (pH  $\sim 7,6$ ). Dieses Procedere bewirkt eine Proteolyse und Umwandlung der nicht-messbaren 7s-Form des NGF-Moleküls in die messbare 2s-Form; des Weiteren wird NGF von löslichen Rezeptoren gelöst. Beide Effekte führen zu einer verbesserten Nachweisbarkeit des NGF-Moleküls.

## 2.6 Dokumentation

Die gesamte Datenerhebung orientierte sich an der persönlichen 24h-Periodik des Kindes. Die ersten 24h ab Geburt wurden als Tag 0 definiert, die zweiten 24h als Tag 1 etc.. Ist im Folgenden von „Tagen“ die Rede, bezeichnet dies also nicht Kalendertage, sondern die ersten, zweiten, dritten etc. 24h ab Geburt. Unter Umständen erforderte der Gesundheitszustand der Patienten eine leichte Abweichung von den geplanten Untersuchungstagen. Statistisch ausgewertete Tage und tatsächliche Untersuchungstage wurden wie folgt standardisiert:

- Tag 1 entspricht tatsächlichem Untersuchungstag 0 oder 1
- Tag 3 entspricht tatsächlichem Untersuchungstag  $\pm 1$  Tag
- Tag 7 etc. entspricht tatsächlichem Untersuchungstag  $\pm 2$  Tage

Von der Geburt an wurde die klinische Situation unserer Patienten umfangreich dokumentiert. Perinatal wichtige Daten wie Geschlecht, Mehrlingschwangerschaft, Geburtsgewicht, Gestationsalter, Entbindungsmodus (vaginal, primäre Sectio caesarea, sekundäre Sectio caesarea), Intubationszeitpunkt, Amnioninfektionssyndrom, mütterliche Infektion, mütterliche Medikation, mütterlicher Gestationsdiabetes, APGAR-Score nach 1min, 5min,

10min, CRIB-Score, Blutgaswerte im Nabelschnurblut, eventuelle Gabe von Surfactant und Zeitpunkt des Blasensprungs wurden bei Geburt erhoben.

## 2.7 Statistische Auswertung

Bei unseren Daten lag keine Normalverteilung vor. Es wurden somit nicht-parametrische Tests für die statistische Auswertung gewählt. Für Intergruppen-Analysen von Interleukin-8- und NGF-Konzentrationen sowie FACS-Daten verwendeten wir den *Mann-Whitney-U* Test. Als parameterfreies Maß für die Korrelation zwischen gewählten Variablen wurde der *Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman* berechnet. Ein  $\alpha$ -Fehler von 0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS, Version 15.0 für Windows. Soweit nicht anders angegeben sind die Werte als Median + Spannweite (Median[Spannweite]) dargestellt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Patienten

Insgesamt wurden 30 frühgeborene Kinder in diese Studie eingeschlossen. Die Kinder wurden anhand ihres Gestationsalter in zwei Gruppen eingeteilt:

- Gestationsaltergruppe I (**GA I**): Kinder der 23. - 28. Schwangerschaftswoche
- Gestationsaltergruppe II (**GA II**): Kinder der 29. - 40. Schwangerschaftswoche

Tab. 5 zeigt die wichtigsten perinatalen Daten unserer Patienten. Bezüglich des Geburtsmodus wird zwischen normaler (=vaginaler) Geburt sowie primärer bzw. sekundärer Sectio caesarea unterschieden. Dabei bezeichnet der Terminus „primäre Sectio caesarea“ den im Rahmen der Geburtsplanung schon vorzeitig geplanten Kaiserschnitt. Eine „sekundäre Sectio caesarea“ wird bei während der Geburt auftretenden ernsthaften kindlichen oder mütterlichen Komplikationen durchgeführt.

Das Geburtsgewicht des Kindes kann mit Hilfe der entsprechenden Perzentilenkurven in Relation zum entsprechend des Gestationsalters zu erwartenden Gewichtes gesetzt werden. Dabei bezeichnet „SGA“ (=small for gestational age) ein Geburtsgewicht unterhalb der 10. Perzentile. „LGA“ (=large for gestational age) entspricht einem Gewicht oberhalb der 90. Perzentile. Zwischen 10. und 90. Perzentile liegt das Normalgewicht „AGA“ (=appropriate for gestational age).



Tabelle 5: PERINATALE DATEN

n insgesamt	23. - 28. SSW (GA I)		29. - 40. SSW (GA II)	
	n	%	n	%
<b>Geschlecht</b>				
<i>m</i>	12	67%	1	8%
<i>f</i>	6	33%	11	92%
<b>Geburtsmodus</b>				
<i>vaginal</i>	2	12%	1	8%
<i>primäre Sectio</i>	8	44%	5	42%
<i>sekundäre Sectio</i>	8	44%	6	50%
<b>Mehrlingsgeburt</b>				
<i>Einlinge</i>	11	61%	6	50%
<i>Zwillinge</i>	4	22%	6	50%
<i>Drillinge</i>	3	17%	0	0%
<b>Geburtsgewicht</b>				
<i>SGA</i>	2	11%	1	8%
<i>AGA</i>	16	89%	11	92%
<i>LGA</i>	0	0%		
<b>RDS - Prophylaxe durchgeführt</b>	16	89%	11	92%
<b>Geburtsgewicht</b>				
<i>ELBW</i>	14	78%	1	8%
<i>VLBW</i>	4	22%	8	67%

Die Patientendaten sind in Abb. 6 dargestellt. 15 unserer Patienten waren ELBWI (=extreme low birth weight infants), d.h. Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht von <1000 g. Zwölf Babies waren VLBWI (=very low birth weight infants), d.h. sie wogen bei Geburt zwischen 1000 g und 1500 g.

13 unserer Patienten waren Mehrlingsgeburten. In elf dieser Fälle mussten beide, bzw. alle drei Kinder postnatal intubiert beatmet werden. In Tab. 6 sind die Mehrlingspaare mit geklammerten Buchstaben gekennzeichnet.

Zwei Kinder, Patient 4 und Patient 6, verstarben während der Studie. Patient 6 litt an einer viertgradigen intrakraniellen Blutung, progredientem posthämorrhagischem Hydrozephalus, angeborener Anämie durch fetalen Blutverlust und verstarb an respiratorischem Versagen. Pat. 4 verstarb ebenfalls an respiratorischem Versagen in Verbindung mit akutem Nierenversagen, Amnioninfektionssyndrom und Frühgeborenenanämie.

Tabelle 6: PATIENTENDATEN

Pat.*	Intubations- tage	Gestations- alter	Geschlecht	Geburts- gewicht	Mehrlings- gravidität	APGAR 1/5/10min
<b>&lt; 28+0 SSW</b>						
<b>1</b>	45	23 + 3	männlich	580 g	Einling	6/6/7
<b>2</b>	44	23 + 4	weiblich	621 g	Einling	4/7/9
<b>3(c)</b>	44	24 + 2	männlich	730 g	Zwilling	2/4/7
<b>4(c)†</b>	18	24 + 3	männlich	830 g	Zwilling	1/2/5
<b>5</b>	40	24 + 4	weiblich	670 g	Einling	4/9/9
<b>6†</b>	8	25 + 0	männlich	719 g	Einling	2/6/8
<b>7</b>	17	25 + 1	weiblich	630 g	Einling	6/9/9
<b>8(a)</b>	16	25 + 2	weiblich	860 g	Zwilling	4/7/9
<b>9(a)</b>	59	25 + 4	männlich	875 g	Zwilling	5/9/9
<b>10</b>	44	26 + 0	männlich	870 g	Einling	6/10/10
<b>11</b>	24	26 + 1	männlich	630 g	Einling	2/2/6
<b>12</b>	52	26 + 2	weiblich	660 g	Einling	3/5/7
<b>13</b>	3	26 + 3	männlich	815 g	Einling	5/9/9
<b>14</b>	3	27 + 2	männlich	805 g	Einling	4/3/6
<b>15</b>	1	27 + 4	männlich	1140 g	Einling	3/8/8
<b>16(e)</b>	8	27 + 6	männlich	1230 g	Drilling	7/8/9
<b>17(e)</b>	9	27 + 6	männlich	1200 g	Drilling	6/7/8
<b>18(e)</b>	5	27 + 6	weiblich	1240 g	Drilling	6/9/9
<b>&gt; 28 + 0 SSW</b>						
<b>19(b)</b>	2	28 + 2	weiblich	1150 g	Zwilling	6/9/9
<b>20(b)</b>	2	28 + 2	weiblich	1300 g	Zwilling	7/8/9
<b>21</b>	5	28 + 6	weiblich	1230 g	Zwilling	8/10/10
<b>22(d)</b>	7	28 + 6	weiblich	1050 g	Zwilling	3/7/7
<b>23(d)</b>	7	28 + 6	weiblich	1090 g	Zwilling	4/6/7
<b>24</b>	7	29 + 0	weiblich	1340 g	Einling	6/9/9
<b>25</b>	12	29 + 2	weiblich	830 g	Einling	7/7/7
<b>26</b>	4	29 + 6	weiblich	1390 g	Einling	6/9/9
<b>27</b>	5	30 + 5	weiblich	1370 g	Einling	3/9/9
<b>28</b>	7	33 + 0	weiblich	1730 g	Zwilling	8/10/10
<b>29</b>	2	34 + 2	weiblich	2360 g	Einling	6/8/8
<b>30</b>	6	35 + 5	männlich	2250 g	Einling	5/7/8

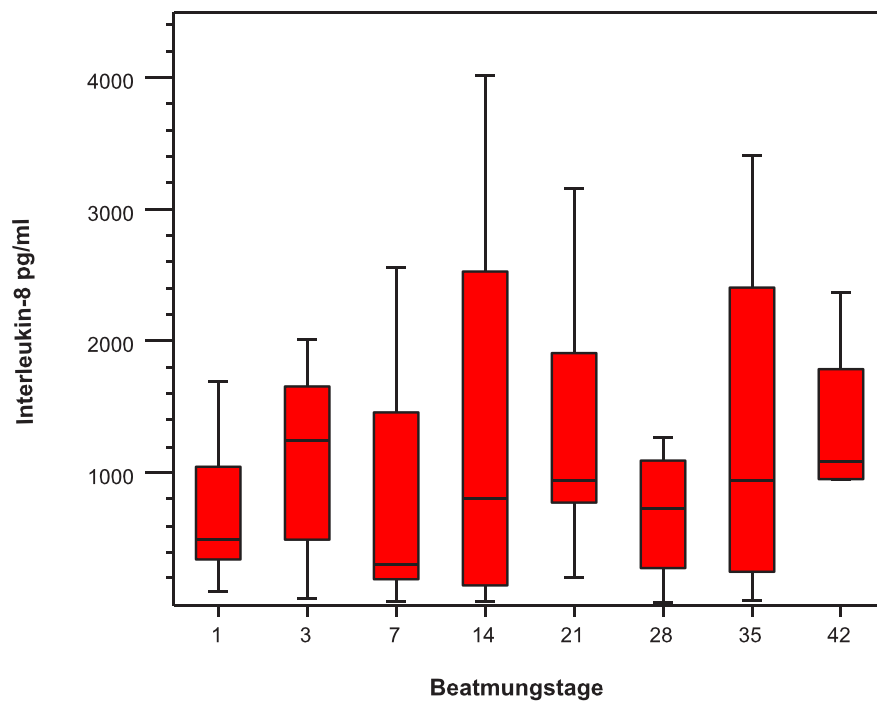
\*Buchstaben kennzeichnen Mehrlingspaare

## 3.2 Interleukin-8 und seine Rezeptoren CXCR1 und CXCR2

### 3.2.1 Interleukin-8

Interleukin-8 konnte in allen Trachealsekreten nachgewiesen werden. Abb. 11 zeigt die gefundenen Interleukin-8-Konzentrationen relativ zur Beatmungsdauer.

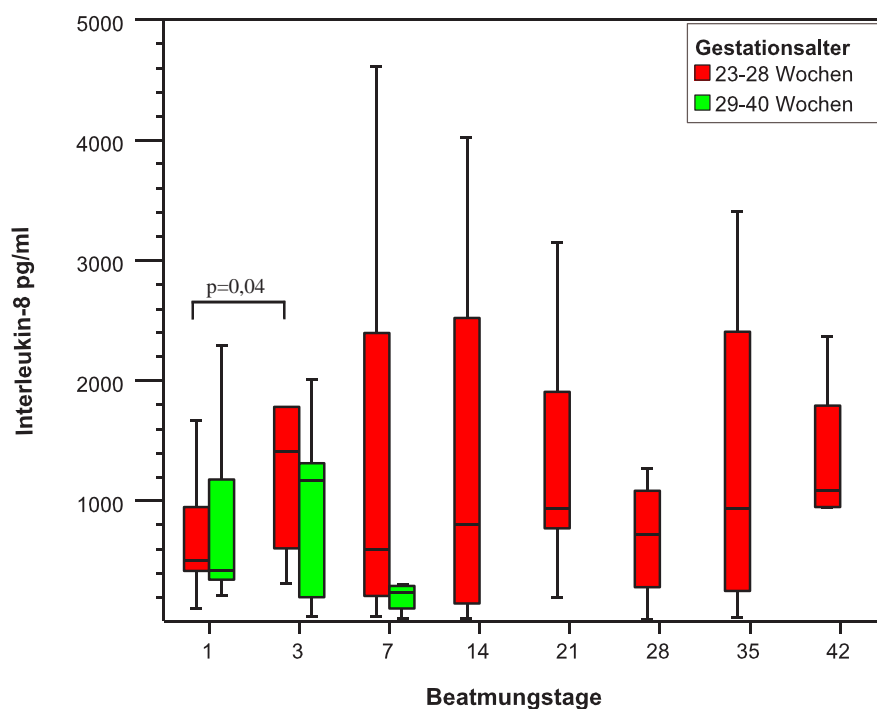
Abbildung 11: Interleukin-8 *Übersicht*



Die Interleukin-8-Konzentration lag zwischen 304,8 pg/ml und 1242,2 pg/ml (Median). Es konnte keine Korrelation zwischen Beatmungsdauer und

Interleukin-8-Konzentration festgestellt werden ( $\rho=0,057$ ;  $p=0,6$ ). Eine Analyse der Interleukin-8-Konzentrationen unter Beachtung des Gestationsalters zeigt Abb. 12.

Abbildung 12: Interleukin-8 *nach Gestationsalter*



Hier zeigt sich ein Trend zu höheren Interleukin-8-Werten in der ersten Beatmungswoche bei unreiferen Kindern gegenüber reiferen Kindern (GA I=689 pg/ml [10303 pg/ml] vs GA II=347 pg/ml [2270 pg/ml];  $p=0,07$ ). In GA I stieg Interleukin-8 von Tag 1 zu Tag 3 signifikant an (505.3 pg/ml [1567 pg/ml] an Tag 1; 1409.9 pg/ml [5307 pg/ml] an Tag 3;  $p=0,04$ ), ohne weiteren Anstieg bis Tag 7. Im weiteren Verlauf blieben die Interleukin-8-Konzentrationen

in einem Bereich zwischen 591.8 pg/ml und 1086.8 pg/ml. Im Gegensatz dazu konnten wir in GA II einen Abfall der Interleukin-8-Konzentration mit niedrigsten Werten unmittelbar vor der Extubation messen ( $\rho = -0,443$ ;  $p = 0,06$ ).

### 3.2.2 CXCR1

Wir beobachteten einen zunehmenden Anteil CXCR1+ Zellen während der Beatmung (s. Abb. 13). Die Zunahme CXCR1+ Zellen korrelierte hochsignifikant mit der Beatmungsdauer ( $\rho=0.48$ ;  $p=0,001$ ). Dabei konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Gestationsaltersgruppen GA I und GA II festgestellt werden.

Abbildung 13: CXCR1-Expression *Übersicht*

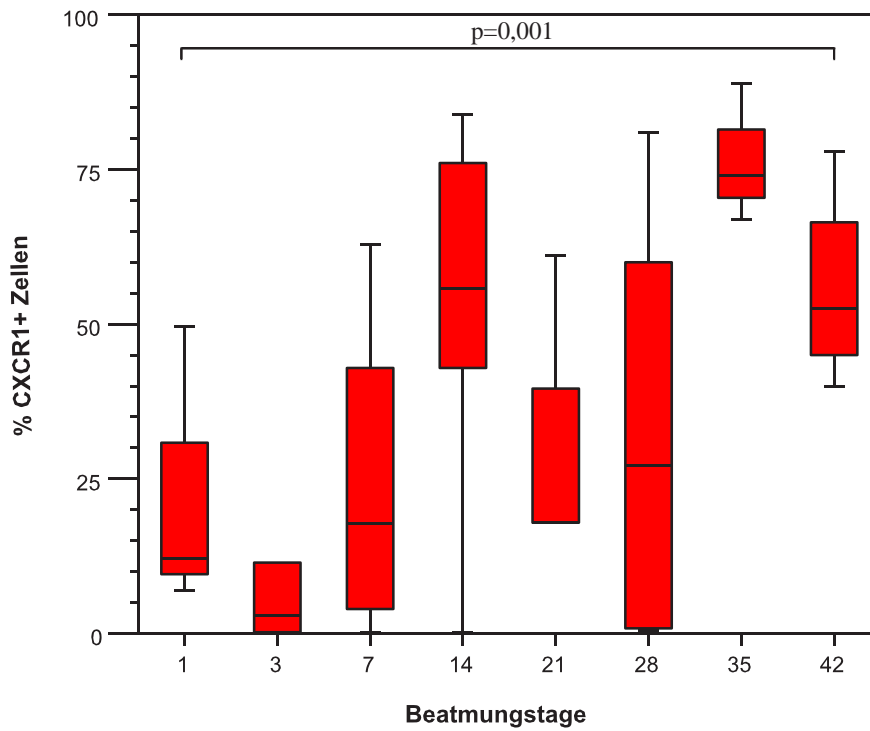
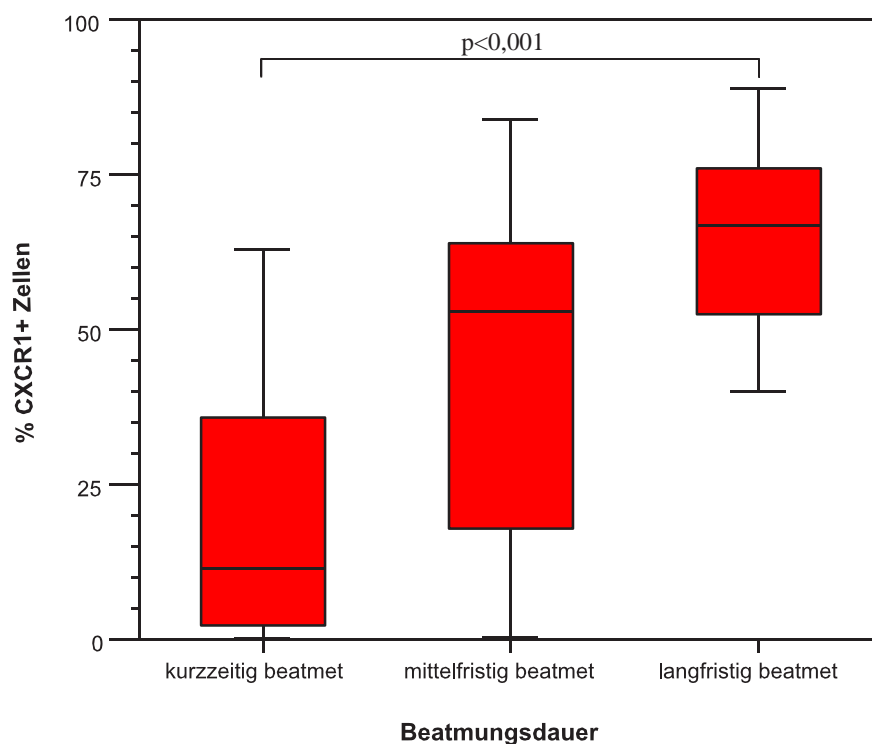


Abb. 14 zeigt den zeitlichen Verlauf CXCR1+ Zellen in Relation zur Beatmungsdauer, eingeteilt in drei Gruppen: Kurzzeitig beatmete Kinder (max.

1 Woche), mittelfristig beatmete Kinder (2-4 Wochen), langfristig beatmete Kinder (>4 Wochen). Auch hier zeigt sich eine hochsignifikante Zunahme der CXCR1-Expression bei steigender Beatmungsdauer ( $\rho=0,516$ ;  $p<0,001$ ).

Abbildung 14: CXCR1-Expression *nach Beatmungsgruppen*



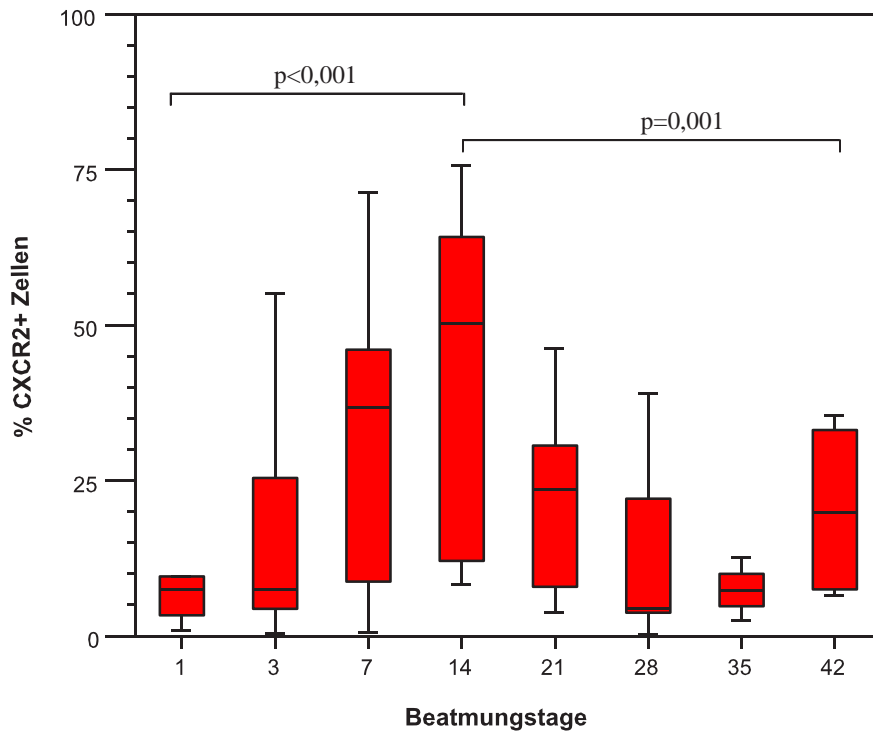
Während innerhalb der ersten Beatmungswoche nur 11,4% [62,8%] der Zellen im Trachealsekret CXCR1+ sind, steigt dieser Wert auf 53% [83,7%] nach zwei bis vier Wochen bzw. 67% [49%] nach mehr als vier Wochen maschineller Beatmung an.



### 3.2.3 CXCR2

Den zeitlichen Verlauf CXCR2+ Zellen zeigt Abb. 15.

Abbildung 15: CXCR2-Expression *Übersicht*

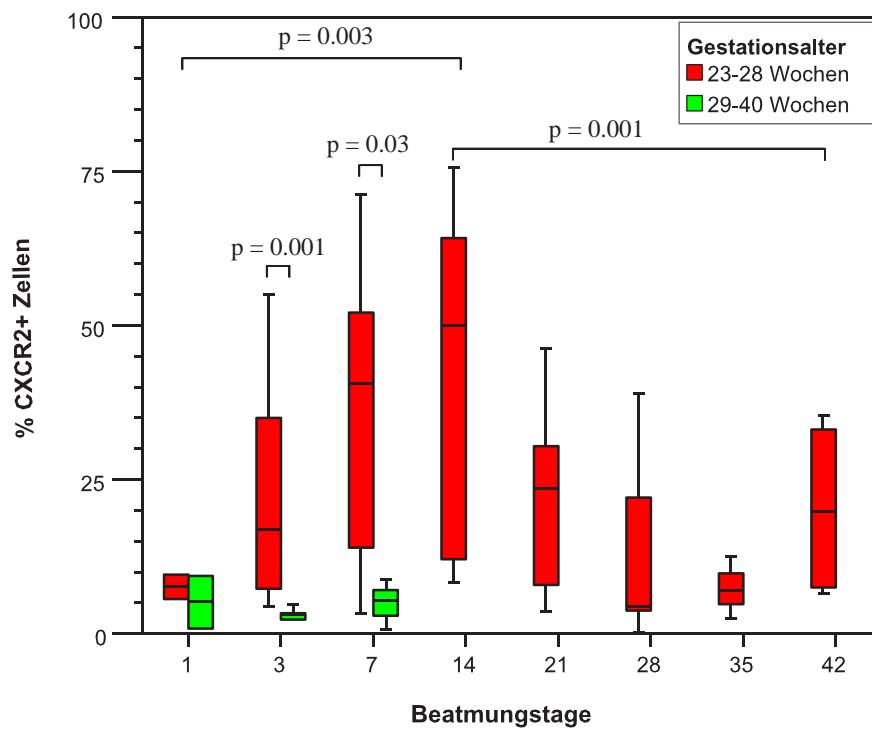


Mit Beginn der maschinellen Beatmung kommt es binnen zwei Wochen zu einem hochsignifikanten Anstieg CXCR2+ Zellen ( $\rho=0,508$ ;  $p<0,001$ ). Das Maximalniveau wird an Tag 14 erreicht (50,1%[67,3%]). Im Gegensatz zu CXCR1 kommt es über den 14. Beatmungstag hinaus zu keinem weiteren Anstieg der CXCR2-Expression. Vielmehr konnten wir einen Abfall CXCR2+ Zellen bis zum Ende der Beatmung feststellen ( $\rho= -0,533$ ;  $p=0,001$ ). Der

in Abb. 15 erkennbare Anstieg von Tag 35 zu Tag 42 ist nicht signifikant ( $p=0,29$ ).

Eine entsprechend des Gestationsalters differenziertere Auswertung zeigte signifikante Unterschiede bei der Expression von CXCR2 auf Zellen des Trachealsekretes (s. Abb. 16).

Abbildung 16: CXCR2-Expression *nach Gestationsalter*



Zu Beginn der Beatmung wiesen beide Gestationsaltersgruppen einen vergleichbaren Anteil CXCR2+ Zellen auf (7,6% [4,1%] in GA I vs. 5,2% [8,6%] in GA II;  $p=0,4$ ). An Tag 3 und Tag 7 konnten in GA I mehr CXCR2+ Zellen gefunden werden (Tag 3: 17% [50,6%] in GA I vs. 3% [4,4%] in GA II;

$p=0,001$ ; Tag 7: 40,7% [67,9%] in GA I vs. 5,5% [8,1%] in GA II;  $p=0,032$ ). Der Anstieg CXCR2+ Zellen in GA I setzte sich bis zum 14. Beatmungstag fort (7,6% [4,1%] an Tag 1; 50,1% [67,3%] an Tag 14;  $\rho=0,41$ ;  $p=0,003$ ). Anschließend konnte ein Abfall bis Tag 42 beobachtet werden ( $\rho= -0.51$ ;  $p=0.001$ ) mit minimalen Werten an Tag 28 (4,4% [38,6%]). Im Gegensatz dazu exprimierten in GA II während der gesamten Beatmungsperiode nur 3,1%-5,5% der Zellen CXCR2.

### 3.3 NGF und TrkA

#### 3.3.1 NGF

NGF konnte im Trachealsekret von allen unseren Patienten nachgewiesen werden. Mit steigender Beatmungsdauer konnte eine stark signifikante Abnahme der NGF-Konzentration festgestellt werden ( $\rho = -0,520$ ;  $p < 0,001$ ).

Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede in der NGF-Konzentration zwischen beiden Gestationsaltersgruppen. Die reiferen Kinder (GA II) hatten signifikant höhere NGF-Konzentrationen (108,5 pg/ml [1001,3 pg/ml] in GA II vs. 59,2 pg/ml [877,5 pg/ml] in GA I;  $p = 0,025$ ).

Wir konnten eine starke Korrelation zwischen NGF-Konzentration und ELBW-Status feststellen. ELBW-Kinder hatten weit niedrigere NGF-Werte im Vergleich zu Kindern mit einem Geburtsgewicht  $> 1000\text{g}$  ( $\rho = -0,561$ ;  $p < 0,001$ ). Um diesen Zusammenhang zwischen NGF-Konzentration und niedrigem Geburtsgewicht genauer zu eruieren wurde eine Subpopulation selektiert. Einschlusskriterien für die Aufnahme in diese Subpopulation waren ein Gestationsalter  $< 30$ . SSW, mindestens zwei valide NGF-Messungen in den ersten 48 Lebensstunden sowie eine Beatmungsdauer von mindestens sieben Tage bei den ELBW. Insgesamt wurden zwölf ELBW- und neun VLBW-Kinder ausgewählt. Tab. 7 zeigt die Charakteristika dieser Subpopulation.

Im Weiteren werden die zwölf ELBW-Kinder als **Gruppe A** bezeichnet, die neun VLBW-Kinder als **Gruppe B**. Es zeigten sich signifikante Unterschiede in der Beatmungsdauer zwischen diesen Gruppen. Alle Kinder der Gruppe B (VLBWI) waren bis zum neunten Lebenstag extubiert. Im Gegensatz dazu waren in Gruppe A (ELBWI) am 14. Lebenstag 11/12 Kindern beatmet, am 21. Lebenstag 8/12, am 28. Lebenstag 7/12, und 4 Kinder über den 35. Lebenstag hinaus.

Tabelle 7: NGF SUBPOPULATION

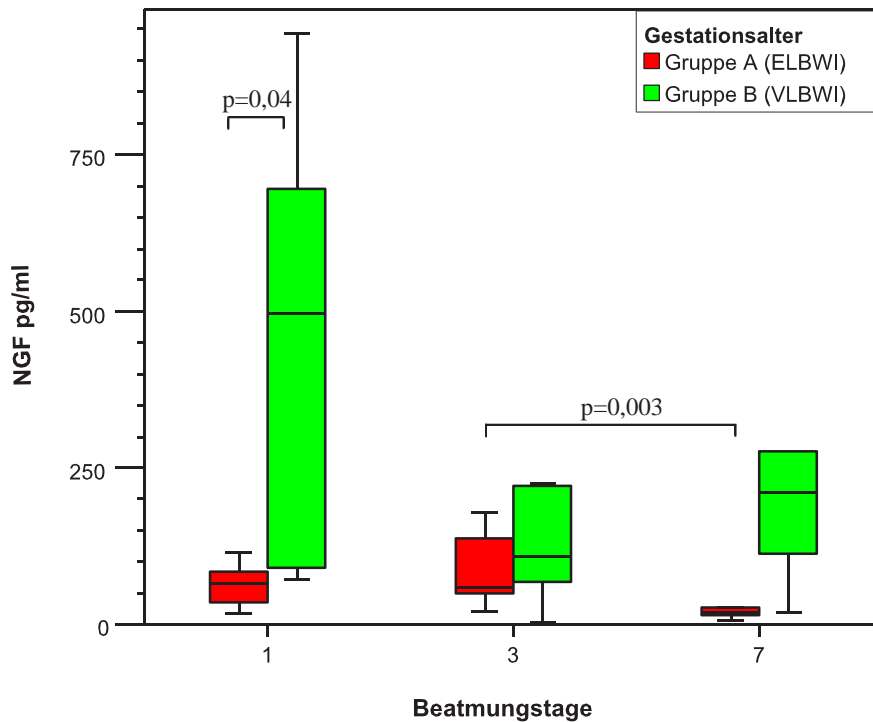
	<b>Gruppe A (ELBW)</b>	<b>Gruppe B (VLBW)</b>
<b>n</b>	12	9
<b>Gestationsalter, Wochen</b>	23 -28 (25)**	27 - 30 (28)
<b>Geburtsgewicht, g</b> <i>SGA (&lt; 10. Perzentile)</i>	580 - 875 (695)** 3 / 12	1050 - 1390 (1230) 0 / 9
<b>Geschlecht n (%)</b>		
<i>m</i>	6 (50%)	2 (22%)
<i>f</i>	6 (50%)	7 (78%)
<b>Beatmungsdauer, d</b>	7 - 51 (29)**	2 - 9 (7)
<b>postnatal Dexamethason i.v.</b>	5 / 12	0 / 9
<b>BPD, 36 Wochen</b>	11 / 12*	0 / 9

*Werte in Klammern zeigen Median; \*\*p < 0,001; \*p=0,01*

Keines der Kinder erhielt Dexamethason in den ersten zwei Lebenswochen. Fünf ELBW-Kinder aus Gruppe A erhielten zur Extubation Dexamethason i.v. (jeweils nach dem 21. Lebenstag).

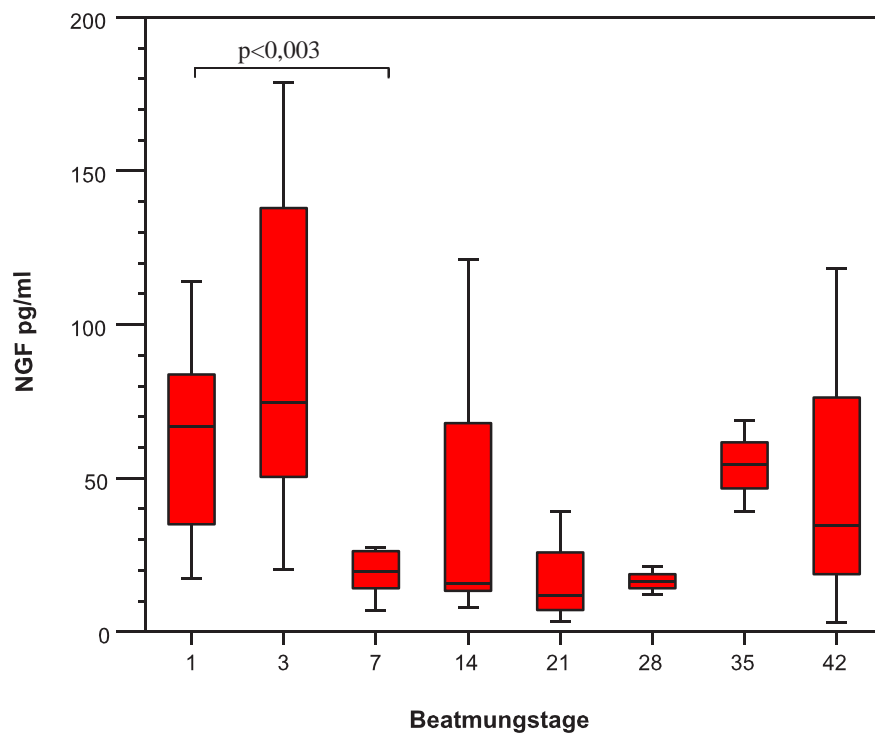
Wir konnten signifikante Unterschiede in der NGF-Konzentration zwischen beiden Gruppen in der ersten Lebenswoche feststellen (Abb. 17). An Tag 1 zeigten sich niedrigere NGF-Konzentrationen in Gruppe A im Vergleich zu den VLBI der Gruppe B (Gruppe A=67,6 pg/ml [141,8 pg/ml]; Gruppe B=497,8 pg/ml [871,8 pg/ml]; p=0,04). In Gruppe B konnten an Tag 3 die höchsten NGF-Konzentrationen gemessen werden (59,4 pg/ml [409,9 pg/ml]), gefolgt von einem signifikanten Abfall der Konzentration bis Tag 7 (p=0,003).

Abbildung 17: NGF nach Gestationsalter



Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der NGF-Konzentration in Gruppe A (s. Abb. 18) zeigt sich ein signifikanter Abfall von Tag 1 bzw. Tag 3 auf Tag 7 (Tag 1=67,6 pg/ml [141,8 pg/ml]; Tag 3=77,1 pg/ml [409,9 pg/ml]; Tag 7=19,6 pg/ml [63,5 pg/ml];  $p < 0,003$ ). Darüber hinaus andauernde Beatmung führte zu NGF-Konzentrationen zwischen 11,8 pg/ml und 54,1 pg/ml (Median). Bei über den Tag 28 hinaus beatmeteten Kindern konnten leicht ansteigende NGF-Konzentrationen festgestellt werden ( $p > 0,05$ ).

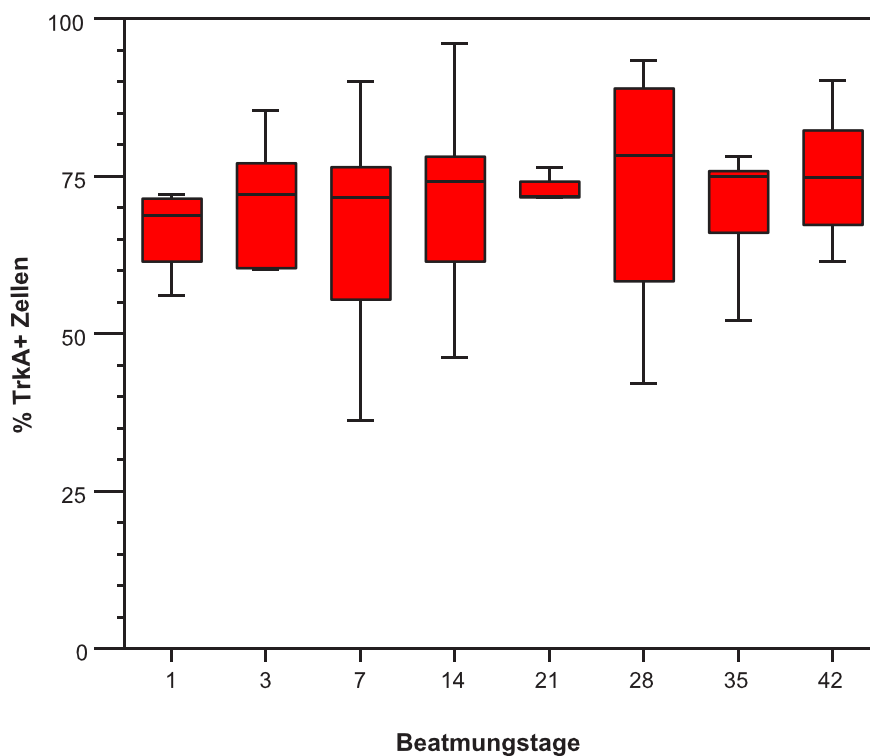
Abbildung 18: NGF Gruppe A (ELWBI)



### 3.3.2 TrkA

Der hoch-affine NGF-Rezeptor TrkA konnte ab dem ersten Lebenstag auf Zellen des Trachealsekretes aller Kinder nachgewiesen werden (s. Abb. 19). Dabei variierte der Prozentsatz TrkA+ Zellen im Verlauf der Beatmungsperiode zwischen 47% und 96% (Spannweite). Der mediane Anteil TrkA+ Zellen lag bis zur Extubation zwischen 69% und 83%.

Abbildung 19: TrkA

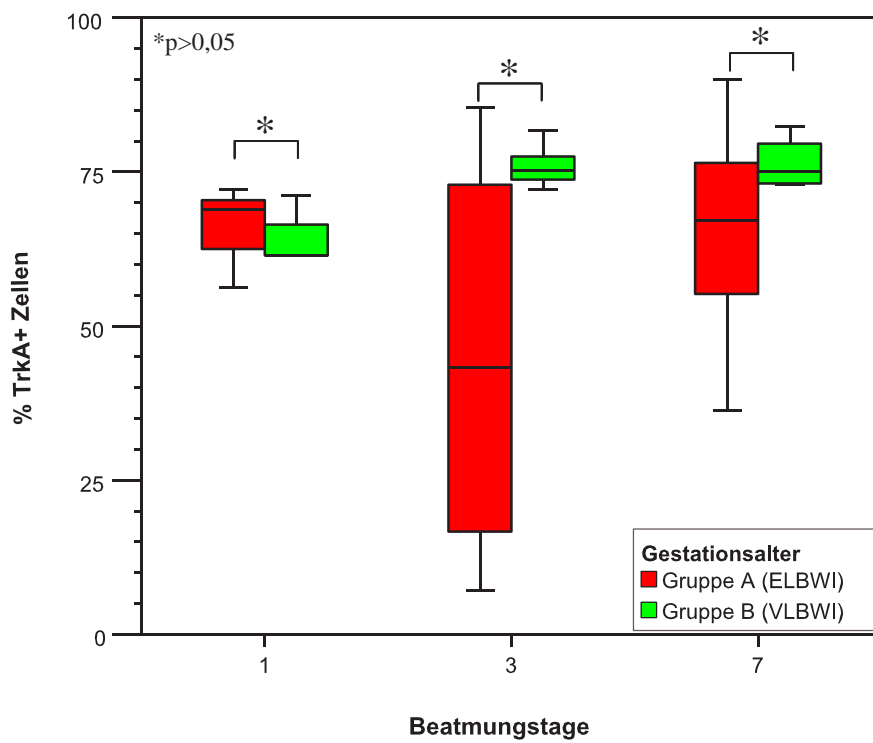


Analog zur Abb. 17 (Vergleich NGF in ELBWI/VLBWI) zeigt Abb. 20 die erste Beatmungswoche, separiert in ELBWI und VLBWI. Im Gegen-



satz zu NGF konnten wir keine signifikanten Unterschiede in der Expression von TrkA zwischen beiden Gestationsaltersgruppen feststellen (TrkA+ Zellen an *Tag 1*: 68,9%[16%] in ELBWI vs. 61,6%[9,9%] in VLBWI,  $p=0,82$ ; *Tag 3*: 43,5%[78,3%] in ELBWI vs. 75,3%[21,4%] in VLBWI,  $p=0,26$ ; *Tag 7*: 67,2%[53,3%] in ELBWI vs. 75,1%[9,4%] in VLBWI,  $p=0,14$ ). In beiden Gruppen konnten keine Veränderungen des Anteils TrkA+ Zellen während der Beatmung festgestellt werden.

Abbildung 20: TrkA



## 3.4 Zelluläre Zusammensetzung des Trachealsekrets

### 3.4.1 Übersicht

Tab. 8 zeigt die Zellzusammensetzung des Trachealsekrets geordnet nach Häufigkeit des Auftretens der entsprechenden Zellpopulation. Neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Alveolarmakrophagen stellen zusammen mehr als 95% der Zellen im Trachealsekret.

Tabelle 8: ZELLULÄRE ZUSAMMENSETZUNG DES TRACHEALSEKRETS

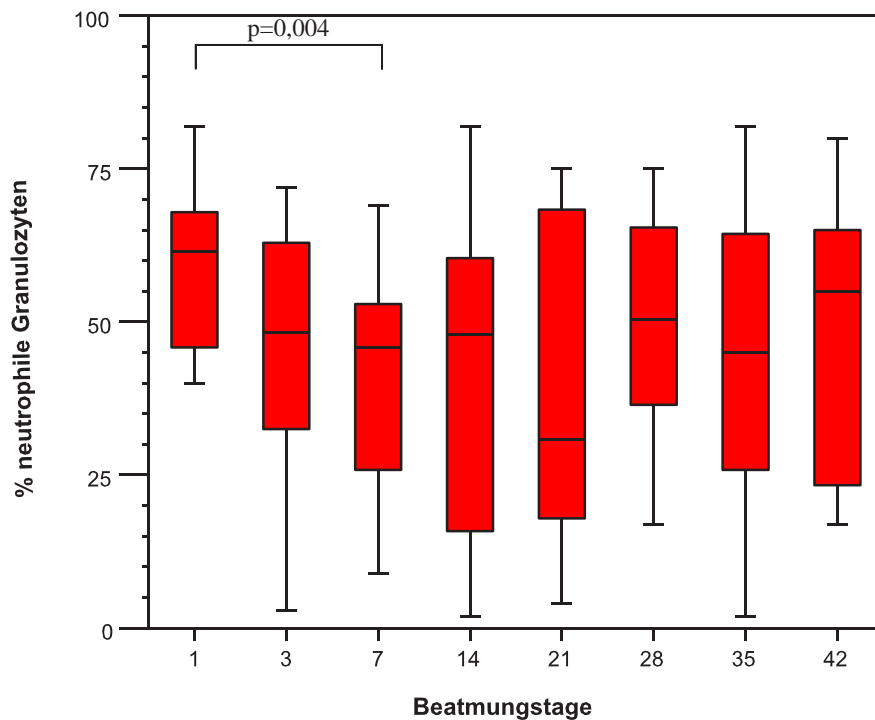
	<b>Median [Spannweite]</b>
<b>Neutrophile G.</b>	49% [87%]
<b>Lymphozyten</b>	32% [85%]
<b>Alveoläre Makrophagen</b>	6% [91%]
<b>Monozyten</b>	2% [9%]
<b>Eosinophile G.</b>	0% [8%]
<b>Basophile G.</b>	0% [0%]

Insgesamt wurden 158 Ausstriche ausgewertet

### 3.4.2 Neutrophile Granulozyten

Abb. 21 zeigt den zeitlichen Verlauf des Anteils neutrophiler Granulozyten an der Gesamtzellzahl des Trachealsekret. Wir konnten in den ersten 7 Tagen einen signifikanten Abfall der neutrophilen Granulozyten feststellen ( $\rho = -0,328$ ;  $p = 0,004$ ). Im weiteren Verlauf zeigten sich keine weiteren Veränderungen. Im Folgenden untersuchten wir den Einfluss des Gestationsalter. Es zeigte sich, dass der in Abb. 21 beobachtete Abfall der neutrophilen Granulozyten in der ersten Beatmungswoche allein den reiferen Kindern der GA II zuzuschreiben war (s. Abb. 22).

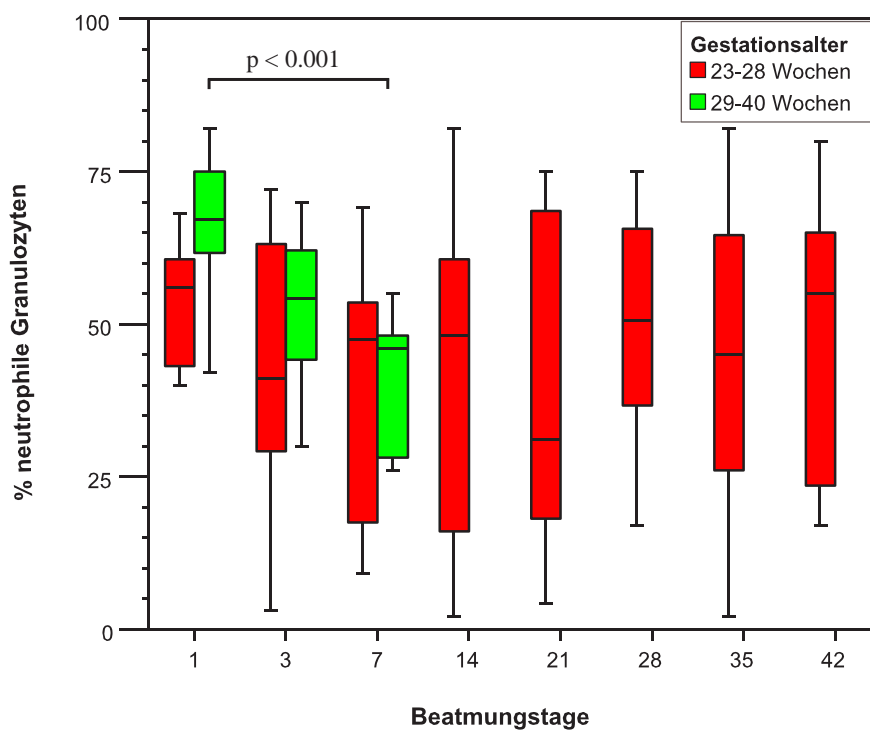
Abbildung 21: NEUTROPHILE GRANULOZYTEN *Übersicht*



Im Gegenzug dazu konnten wir in GA I (23.-28.- SSW) keine signifikanten Veränderungen der Anzahl neutrophiler Granulozyten während der Beatmungsperiode feststellen ( $\rho=0,067$ ). Tendenziell zeigten sich in GA II (29.-40. SSW) höhere initiale Neutrophilenzahlen im Trachealsekret im Vergleich zu den unreiferen Kindern von GA I (56%[60%] in GA I vs. 67%[40%] in GA II;  $p=0,0064$ ). Dabei nahmen die neutrophilen Granulozyten in GA II während der Beatmung stetig ab bis zu einem Niedrigstwert unmittelbar vor der Extubation. Die Neutrophilenzahlen sanken signifikant von 67% an Tag 1 bis auf 46% an Tag 7 ab (67%[40%] an Tag 1; 46%[29%] an Tag 7;  $\rho= -0,582$ ;

$p < 0,001$ ). Dieser Abfall korreliert mit dem in dieser Gruppe beobachteten Abfall der Interleukin-8-Konzentration im selben Zeitraum ( $\rho = 0.814$ ;  $p = 0.007$ ).

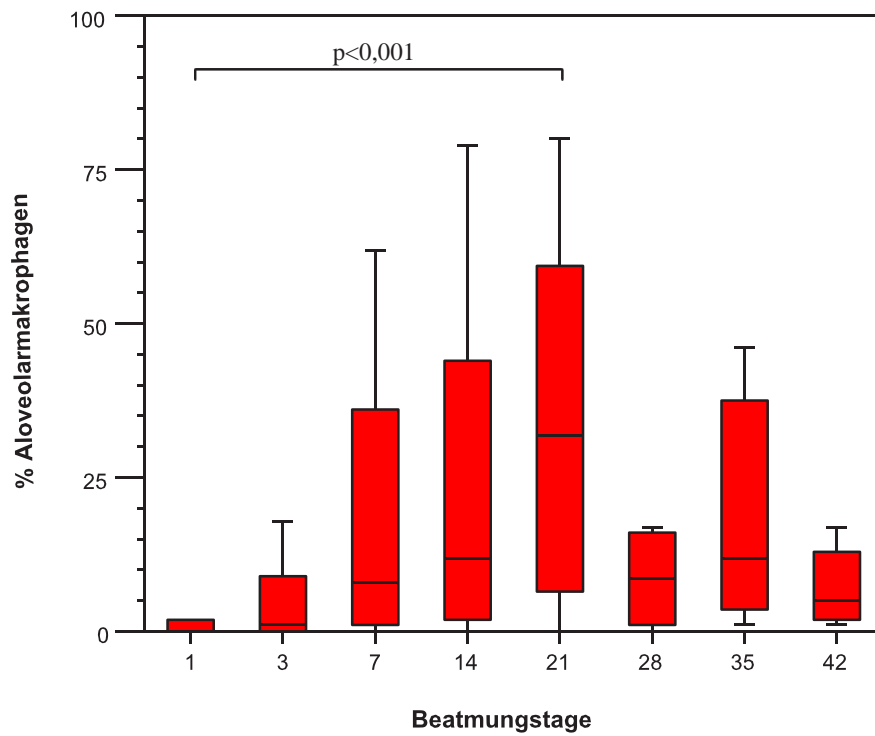
Abbildung 22: NEUTROPHILE GRANULOZYTEN *nach Gestationsalter*



### 3.4.3 Alveolarmakrophagen

Abb. 23 zeigt die gefundenen Daten. Wir konnten einen hochsignifikanten Anstieg der Alveolarmakrophagen von Tag 1 bis Tag 21 feststellen (0%[23%] an Tag 1, 32%[80%] an Tag 21;  $\rho=0,459$ ;  $p < 0,001$ ).

Abbildung 23: Alveolarmakrophagen *Übersicht*

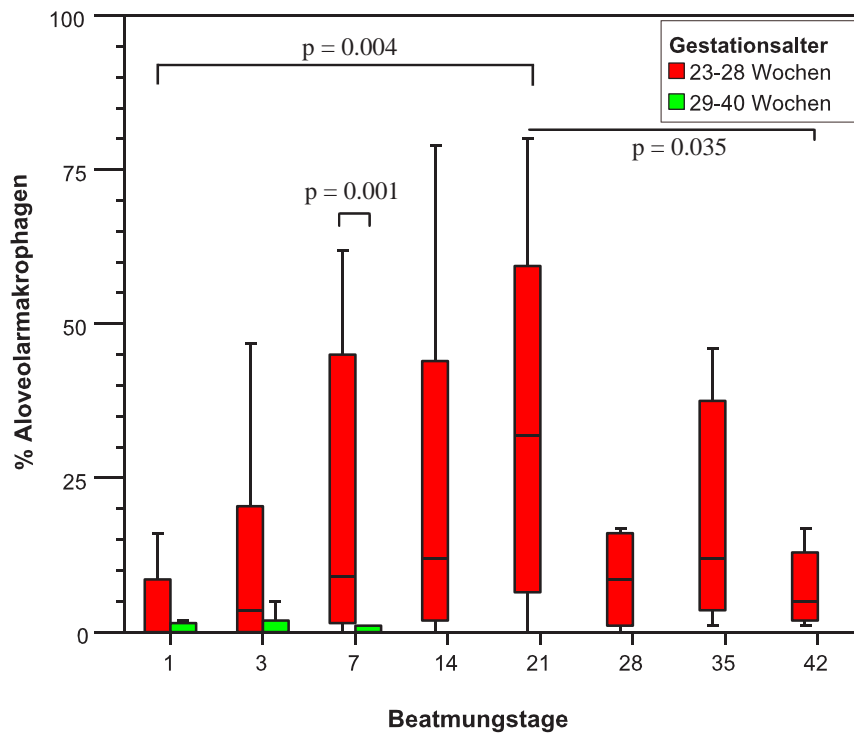


An Tag 21 wurde der höchste Anteil an Alveolarmakrophagen an der Gesamtzellularitytät des Trachealsekretes während der gesamten Beatmungsperiode festgestellt. Bei den über Tag 21 hinaus beatmeten Kindern konnte in der Folge eine tendenzielle Abnahme der Alveolarmakrophagen beobachtet werden (32% [80%] an Tag 21, 5% [16%] an Tag 42;  $\rho = -0,21$ ;  $p = 0,08$ ).

Abb. 24 zeigt den Einfluss des Gestationsalters auf die Alveolarmakrophagen.

Bemerkenswert ist, dass der in Abb. 23 beobachtete Anstieg der Alveolarmakrophagen offensichtlich nur den unreiferen Kindern der GA I zuzu-

Abbildung 24: Alveolarmakrophagen *nach Gestationsalter*



schreiben ist (0%[23%] an Tag 1, 32%[80%] an Tag 21;  $\rho=0,34$ ;  $p=0,004$ ). Nach Erreichen eines Maximalwertes an Tag 21 kam es bis zum Ende der Beatmungsperiode zu einem signifikanten Abfall der Alveolarmakrophagen ( $\rho= -0,27$ ;  $p=0,035$ ). Bei Kindern der GA II konnte im Gegenzug dazu keine Änderung der Alveolarmakrophagen während der Beatmungsperiode festgestellt werden. An Tag 7 konnten in GA II signifikant niedrigere Anteile an Alveolarmakrophagen im Vergleich zu GA I gefunden werden (9%[62%] in GA I vs. 0%[18%] in GA II;  $p=0,001$ ).

## 4 Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung

**Maschinelle Beatmung** schädigt die Lunge auf verschiedene Weise. Neben der direkten Verletzung der Lunge durch hohe Beatmungsdrücke (Barotrauma) oder hohe Atemzugvolumina (Volutrauma) spielt die durch freigesetzte proinflammatorische Mediatoren hervorgerufene Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle. Diese pulmonale Entzündungsreaktion geht mit dem Einstrom neutrophiler Granulozyten in die Lunge einher. Dabei scheint das Ausmaß der pulmonalen Neutrophilie entscheidende Folgen für das weitere Krankheitsgeschehen zu haben.

Die zeitliche Dynamik des neutrophilen Einstroms in der Postpartalperiode wurde in verschiedenen Studien untersucht, allerdings nur über einen kurzen Zeitraum. Unsere Arbeit bestätigt deren Ergebnisse und zeigt weiter, dass konstant hohe Neutrophilenzahlen im Trachealsekret Frühgeborener der 23.-28. SSW (GA I) bis zum Ende der Beatmungs-/Beobachtungsperiode, d.h. bis zu 42 Tage postpartal, bestehen bleiben. Weiter konnten wir zeigen, dass die Neutrophilenzahlen in reiferen Kindern der 29.-40. SSW (GA II) bis zur Extubation stark abnahmen und ein Minimum direkt prae extubationem erreichen.

**Interleukin-8** ist als potentes Chemokin bekannt und wirkt stark chemotaktisch und aktivierend auf neutrophile Granulozyten. Wir konnten einen Trend zu höheren Interleukin-8-Konzentrationen während der ersten Beatmungswoche in Kindern der GA I im Vergleich zu Kindern der GA II feststellen. In GA I zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Interleukin-8-Konzentration innerhalb der ersten drei Beatmungstage. Im weiteren Verlauf zeigten sich in dieser Gruppe keine weiteren Veränderungen. In GA II

war eine tendenzielle Abnahme der Interleukin-8-Konzentration während der Beatmung festzustellen. Die niedrigsten Konzentrationen konnten in dieser Gruppe unmittelbar vor der Extubation gefunden werden. Der Abfall der Interleukin-8-Konzentration korrelierte dabei mit der beobachteten Abnahme der Neutrophilenzahlen im Trachealsekret dieser Gruppe.

Die Wirkung von Interleukin-8 wird über die beiden Chemokin-Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 vermittelt. In der vorliegenden Arbeit berichten wir erstmals über die Expression dieser Rezeptoren auch auf Zellen des Trachealsekretes Frühgeborener und über ihren zeitlichen Verlauf sowie ihre Relation zu den beobachteten Neutrophilenzahlen.

Wir beobachteten einen starken Anstieg der CXCR1+ Zellen während der Beatmung, ohne Unterschiede zwischen beiden Gestationsaltersgruppen feststellen zu können. Demgegenüber wurde CXCR2 an Tag 3 und Tag 7 auf Zellen von GA I signifikant stärker exprimiert. In GA I zeigte sich eine Zunahme der CXCR2+ Zellen innerhalb der ersten 14 Beatmungstage. Im weiteren Verlauf fiel der Anteil CXCR2+ Zellen in GA I bis Tag 42 wieder ab. In GA II blieb der Anteil CXCR2+ Zellen während der Beatmung konstant niedrig.

**NGF**, ursprünglich vor allem in Zusammenhang mit der Entwicklung des embryonalen Nervensystems betrachtet, findet zunehmend Beachtung als inflammatorischer Mediator in der Entwicklung chronischer pulmonaler Entzündungen wie Asthma bronchiale und bronchiale Hyperreaktivität. Unsere Studie beschreibt als erste NGF und seinen hoch-affinen Rezeptor TrkA bei Neugeborenen. Wir konnten NGF in allen Trachealaspiraten nachweisen, extrem unreife Kinder der 23. SSW eingeschlossen. Dabei zeigten die Kinder in Gruppe A (ELBWI, Geburtsgewicht <1000g) niedrigere NGF-Konzentrationen an Tag 1 verglichen mit größeren Neugeborenen (VLBWI,



Geburtsgewicht >1000g). Signifikante Änderungen der NGF-Konzentration zeigten sich nur in Gruppe A. Hier konnten höhere NGF-Konzentrationen an den ersten drei Tagen, gefolgt von einem Abfall auf niedrigere Werte an Tag 7 beobachtet werden. Darüber hinaus konnten wir den hoch-affinen NGF-Rezeptor TrkA auf Zellen des Trachealsekretes des entsprechenden Zeitraumes nachweisen.

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Trachealsekret

Ein grundsätzliches Problem bei der Arbeit mit Trachealsekret bzw. ELF stellt die potentielle Verdünnung durch die bei der Gewinnung verwendete Kochsalzlösung dar. Dies führt zu Schwierigkeiten in der Interpretation von diagnostischen Untersuchungen in ELF. In der Literatur sind verschiedene Ansätze beschrieben, um die Verdünnung quantitativ erfassen und korrigieren zu können. Die am häufigsten diskutierten Möglichkeiten sind die Bestimmung von Albumin, Harnstoff oder IgAsc im ELF [19, 76, 97]. Die theoretischen Anforderungen an einen reliablen Verdünnungsmarker werden leider von keinem der genannten Stoffe erfüllt. Dieser müsste, unabhängig von pulmonalen oder systemischen Erkrankungen, Gestationalalter etc. in zuverlässig bestimmbarer Konzentration im ELF und einem validen Kontrollmedium, z.B. Blut, in bekanntem Verhältnis nachweisbar sein.

Es zeigte sich, dass pulmonale Infektion die Albuminkonzentration im ELF stark beeinflussten.

Harnstoff diffundiert als kleines Molekül frei zwischen verschiedenen Kompartimenten und müsste theoretisch in der gleichen Konzentration im Blut und im ELF enthalten sein. In Studien war die Harnstoffkonzentration aber

sowohl von der Dauer der BAL als auch von der veränderten Kapillarpermeabilität im Rahmen pulmonaler Erkrankungen abhängig [21].

Auch IgAsc variierte in seiner Konzentration abhängig von pulmonalen Infektionen [20].

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass momentan kein valider Verdünnungsmarker bekannt ist. Unproblematisch sind relative, nicht auf ein bestimmtes Volumen bezogene Aussagen, z.B. Anteil der neutrophilen Granulozyten in Relation zur Gesamtzellzahl. Für azelluläre Bestandteile im ELF, z.B. Chemokine, muss vor allem die genau standardisierte Durchführung der BAL bzw. Aspiration eingehalten werden, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten [47]. In Anbetracht dieser Erkenntnisse haben wir uns in der vorliegenden Arbeit gegen die Verwendung eines Verdünnungsmarkers entschieden. Entsprechend den Empfehlungen der *European Respiratory Society* wurde stattdessen ein standardisiertes Protokoll aller Arbeitsschritte bei der Gewinnung des Trachealsekretes strikt befolgt [21, 47].

#### **4.2.2 FACS**

Die Durchflusszytometrie ist ein etabliertes Verfahren zur Analyse zellulärer Oberflächenantigene [108]. In den letzten Jahren wird die Durchflusszytometrie zunehmend zur Analyse von BALF und induziertem Sputum verwendet [12, 44, 51, 104]. Die vorliegende Arbeit ist die erste ihrer Art, die sich mit der FACS-Analyse von Trachealsekret frühgeborener Kinder beschäftigt.

Erwartungsgemäß gestaltete sich die FACS-Analyse von Trachealsekret schwieriger als die Analyse von Vollblut. Problematisch war dabei vor allem die zum Teil niedrige Zellzahl im Trachealsekret, die eine valide statistische Analyse erschwerte. Theoretisch ist es mit FACS möglich, verschiedene Zelltypen, z.B. neutrophile Granulozyten, anhand ihrer Morphologie und der

Expression spezifischer Oberflächenmarker zu identifizieren. Um diese verschiedenen Zelltypen zuverlässig voneinander trennen zu können, ist aber eine gewisse Mindestgesamtzellzahl erforderlich. Kotecha et al. sahen in ihrer Arbeit bei ähnlicher Fragestellung wegen zu geringer Zellzahlen von einer FACS-Analyse ab [60]. Auch wir mussten im Laufe der Studie feststellen, dass die Gesamtzellzahl eine Differenzierung in verschiedene Subpopulationen nicht immer erlaubte. Wir entschlossen uns daher zu einer vereinfachten Analyse der Gesamtzellpopulation. Leider können wir so nur Aussagen über die Expression betrachteter Rezeptoren auf allen Zellen des Trachealsekrets machen, d.h. ohne Subklassifikation in neutrophile Granulozyten, Alveolar-makrophagen etc.. Auf diese Weise war eine zuverlässige und valide Analyse und statistische Auswertung der gezeigten Werte problemlos möglich.

Die mikroskopische Auswertung der Ausstriche (s. Abb. 8) zeigte, dass neutrophile Granulozyten mit 49% die bei Weitem dominierende Zellgruppe im Trachealsekret bilden. In zahlreichen Studien wurde über eine starke Expression der beiden Interleukin-8-Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 auf neutrophilen Granulozyten berichtet [49, 16, 125, 4]. Es erscheint somit vertretbar, die beobachteten Veränderungen in der Expression von CXCR1 und CXCR2 primär den neutrophilen Granulozyten zuzuschreiben.

Eine höhere Zellausbeute ist wohl nur mit dem Einsatz von invasiveren, für das Frühgeborene belastenderen Methoden wie zum Beispiel BAL zu erreichen. Unter diesen Umständen wäre eine longitudinale, tägliche Untersuchung wie in unserer Studie mit Trachealsekret durchgeführt, nicht möglich gewesen. Besonders problematisch bzgl. der Zellzahl im Trachealsekret waren die reiferen Kinder von GA II (>29. SSW). Bei nur kurzer Beatmungsdauer und relativ guter Lungenfunktion waren die Zellzahlen hier meist niedriger als bei den unreiferen Kindern. Folglich konnte nur ein Teil der von diesen

Kindern mit FACS untersuchten Daten ausgewertet werden.

### **4.2.3 Ausstriche**

Zytospins dienen der morphologischen Differenzierung von Zellen im BALF bzw. Trachealsekret und werden routinemäßig auch bei Kindern zu diagnostischen Zwecken durchgeführt [95, 101]. Es ist seit langem bekannt, dass pulmonale Entzündungsprozesse die zelluläre Zusammensetzung des BALF bzw. des Trachealsekretes verändern. Einen erfahrenen Untersucher vorausgesetzt, ermöglichen Zytospins die zuverlässige Differenzierung der zellulären Fraktion des BALF. Zu bemerken ist, dass die manuelle Analyse sehr zeitaufwendig ist, was den Einsatz dieser Methode in bestimmten Fragestellungen, zum Beispiel bei longitudinalen Studien über lange Zeiträume mit hohen Fallzahlen, nur mit großem Aufwand ermöglicht.

## **4.3 Ergebnisse**

### **4.3.1 Die Bedeutung von Interleukin-8 und seinen Zielrezeptoren CXCR1 und CXCR2 für die Entwicklung beatmungsinduzierter Lungenverletzung**

Die beatmungsinduzierte Lungenschädigung (ventilator induced lung injury=VILI) ist eine häufige und schwere Komplikation bei über einen längeren Zeitraum beatmeten Frühgeborenen. Es wird heutzutage angenommen, dass ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Einflüssen in der Lunge mit einem Überwiegen entzündlicher Mechanismen eine Schlüsselrolle in der Entwicklung dieses Krankheitsbildes übernimmt. Proinflammatorische Mediatoren und Entzündungszellen konnten bei betroffenen Frühgeborenen bevorzugt und in erhöhtem Maße nachgewiesen werden, darunter

Interleukin-8, neutrophile Granulozyten und Makrophagen [114, 42, 43, 59]. Dabei konnte gezeigt werden, dass erhöhte Interleukin-8-Konzentrationen und neutrophile Infiltration der Lunge mit der Entwicklung beatmungsinduzierter Lungenschädigung einhergehen [114, 60, 59, 42].

**Interleukin-8** ist ein potentes Chemokin, welches auf neutrophile Granulozyten und Makrophagen chemotaktisch und antiapoptotisch wirkt, und bei chronischen Lungenerkrankungen erhöht ist [27, 62, 81, 58, 13]. Die Wirkung von Interleukin-8 wird dabei über zwei Rezeptoren vermittelt, CXCR1 und CXCR2 (entspr. IL8R-A und IL8R-B). Beide Rezeptoren sind G-Proteinvermittelt und werden sowohl auf neutrophilen Granulozyten als auch auf Makrophagen exprimiert [50, 16, 5].

**CXCR1 und CXCR2** vermitteln den chemotaktischen und antiapoptotischen Effekt von Interleukin-8 auf neutrophile Granulozyten [125, 4, 27, 67]. Die Akkumulation neutrophiler Granulozyten in der Lunge ist ein dynamischer Prozess, bestehend aus neutrophiler Migration aus dem Blut und Tilgung aus der Lunge durch Apoptose und Phagozytose.

Die Inkubation mit Interleukin-8 führte bei neutrophile Granulozyten *in vitro* zu einer Abnahme der Apoptoserate [27, 67, 38]. Es wird kontrovers diskutiert, welcher der beiden CXC-Rezeptoren, oder ob etwa beide Rezeptoren zusammen, diesen Effekt vermittelt. Dunican et al. beobachteten eine Abnahme der neutrophilen Apoptoserate unter dem Einfluss von Interleukin-8 sowie eine Downregulation von CXCR2. Gleichzeitig blieb CXCR1 weiter stark exprimiert. Sie schlussfolgerten, dass die neutrophile Apoptose primär über CXCR1 gesteuert wird [26]. Glynn et al. inkubierten neutrophile Granulozyten mit Gro- $\alpha$ , einem CXC-Chemokin, welches ausschließlich an CXCR2 bindet (im Gegensatz zu Interleukin-8, welches an beide CXC-Rezeptoren bindet). Ebenso wie Interleukin-8 führte auch Gro- $\alpha$  zu einer Abnahme der

Apoptoserate. Durch einen selektiven CXCR2-Antikörper konnte dieser Effekt antagonisiert werden. Interleukin-8 führte auch bei gleichzeitiger Inkubation mit besagtem CXCR2-Antagonisten zu einer Abnahme der neutrophilen Apoptoserate [38].

Neben dem gezeigten Einfluss auf die neutrophile Apoptoserate wirkt Interleukin-8 stark chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten. Dabei führt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Gabe eines spezifischen CXCR2-Antagonisten in Gegenwart von Interleukin-8 zu einer verminderten neutrophilen Chemotaxis [125, 4]. Im Tiermodell konnte durch die Gabe dieses CXCR2-Antagonisten während der Beatmungsperiode die Entwicklung beatmungsinduzierter Lungenschädigung reduziert werden [4].

In unserer Arbeit konnten wir signifikante Unterschiede in der Migration von neutrophilen Granulozyten in die Lunge von Kindern der 23.-28. SSW (GA I) gegenüber Kindern der 29.-40. SSW (GA II) feststellen. Wir beobachteten eine persistierende Neutrophilie bei den unreifen Kindern der GA I. Im Gegensatz dazu fielen die Neutrophilenzahlen bei den reiferen Kindern innerhalb der ersten Woche stark ab. In dieser Gruppe konnten die niedrigsten Neutrophilenzahlen unmittelbar vor der Extubation gemessen werden. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Kotecha et al. gefundenen Resultaten [60]. Auch hier blieben die neutrophilen Granulozyten in der Gruppe der unreiferen Kinder (Gestationsalter: Median=26. SSW) persistierend auf hohem Niveau, während sie bei den reiferen Kindern (Gestationsalter: Median=31. SSW) bis zum zehnten Tag konstant abfielen. Aufgrund zu geringer Zellzahlen im Trachealsekret führten Kotecha et al. keine FACS-Analyse durch. Sie erklärten die beobachtete Persistenz hoher Neutrophilenzahlen bei den unreiferen Kindern mit einer niedrigeren neutrophilen Apoptoserate im Zytospin

in dieser Kohorte verglichen mit den reiferen Kindern.

Wir beobachteten einen Anstieg der Alveolarmakrophagen in GA I bis zu einem Maximalwert an Tag 21. Im Gegenzug dazu konnten wir bei den reiferen Kindern (GA II) keine Veränderung während der Beatmungsperiode feststellen. Zum Ende der ersten Beatmungswoche zeigte diese Kinder signifikant niedrigere Makrophagenzahlen im Vergleich zu Kindern in GA I. Verschiedene extrinsische Faktoren wirken auf neutrophilen Granulozyten in entzündlichem Milieu proapoptotisch, darunter der death-receptor Fas und TRAIL (tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand) [98, 99]. Beide Liganden werden auf Makrophagen exprimiert und stellen eine mögliche Schnittstelle dar durch welche Makrophagen die Apoptose von neutrophilen Granulozyten regulieren können [10, 46].

Kotecha et al. berichteten bei einer vergleichbaren Patientenpopulation über einen Einstrom von Alveolarmakrophagen in die Lunge, gefolgt von einer Zunahme der neutrophilen Apoptoserate und folgend einer Abnahme der Neutrophilenzahlen mit einer Latenzzeit von mehreren Tagen [60]. Wir konnten auch nach Erreichen des Alveolarmakrophagen-Maximums am 21. Lebenstag keine signifikante Abnahme der Neutrophilenzahlen feststellen, wobei wir lichtmikroskopisch nicht zwischen vitalen und einem möglicherweise zunehmendem Anteil apoptotischer neutrophiler Granulozyten unterscheiden haben. Klinisch besserte sich die pulmonale Funktion in diesem Zeitraum so dass bis zum 42. Lebenstag alle Kinder extubiert werden konnten. Der geringere Anteil Alveolarmakrophagen im Trachealsekret der reiferen Kindern reflektiert vermutlich die primär reduzierte entzündliche Aktivität der Lunge in dieser Population.

Zahlreiche Studien berichten über hohe Interleukin-8-Konzentrationen im

BALF frühgeborener Babies [114, 59]. Wir beobachteten einen signifikanten Anstieg der Interleukin-8-Konzentration innerhalb der ersten drei Tage in GA I und tendenziell niedrigere Interleukin-8-Konzentrationen in GA II ( $p=0,07$ ). Die von uns gefundenen Interleukin-8-Konzentrationen sind vergleichbar mit anderen Studien die ebenfalls Trachealsekret verwendeten. Dies validiert unser Vorgehen bei der Gewinnung des Trachealsekretes [54].

Nach unserem Wissen berichtet die vorliegende Arbeit als Erste die Expression von CXCR1 und CXCR2 im Trachealsekret frühgeborener Kinder. Wir konnten einen Anstieg des Anteils CXCR1+ Zellen während der Beatmungsperiode in beiden Gestationsaltersgruppen feststellen. Der Anteil CXCR2+ Zellen bei den unreifen Babies der GA I nahm bis Tag 14 zu. Wir beobachteten eine persistierende Neutrophilie bei den unreifen, über einen längeren Zeitraum beatmeten Kindern (GA I). Entsprechend der weiter oben im Text zitierten Arbeiten zur Funktion von CXCR auf neutrophile Granulozyten könnte die beobachtete Neutrophilie, zumindest zum Teil, Folge der vermehrten Expression dieser chemotaktisch und anti-apoptotisch wirksamen Rezeptoren sein.

Ein Vergleich der Alveolarmakrophagenzahl und der CXCR2-Expression zeigt einen Anstieg der CXCR2-Expression im Vorfeld des Makrophageneinstroms. Studien zur Entwicklung atherosklerotischer Neubildungen berichten über eine zentrale Rolle von CXCR2 für die Akkumulation von Makrophagen [5]. Leider konnten wir in unserer Arbeit die CXCR2-Expression nur für die Gesamtzellularität des Trachealsekretes bestimmen. Wir können daher zu diesem Zeitpunkt nur vermuten, dass der beobachtete Einstrom von Makrophagen Folge der gesteigerten CXCR2-Expression ist.



### 4.3.2 Die Bedeutung von NGF und seinem Zielrezeptoren TrkA für die Entwicklung beatmungsinduzierter Lungenverletzung

**NGF** NGF spielt als Neurotrophin eine wichtige Rolle in der Entwicklung und der Funktion des zentralen und peripheren Nervensystems. Darüber hinaus haben Arbeiten der letzten Jahre gezeigt, dass NGF auf vielfältige Art und Weise immunmodulatorisch wirkt. Auf neutrophile Granulozyten wirkt NGF chemotaktisch und stimuliert die Produktion von Superoxiden. NGF gilt mittlerweile als wichtiger Mediator für die Entwicklung bronchialer Hyperreaktivität und Asthma bronchiale [23, 22, 52]. Als Produktionsort für NGF in der Lunge konnte eine Reihe von Zelltypen identifiziert werden, darunter Epithelzellen der Luftwege, glatte Muskelzellen und Fibroblasten. Die Anwesenheit von Zytokinen wie IL1- $\beta$  und TNF- $\alpha$  scheint dabei die Freisetzung von NGF zu stimulieren [32, 86, 34]. Mechanische Beatmung wiederum führte in mehreren Studien an frühgeborenen Kindern zu einer erhöhten Konzentration inflammatorischer Zytokine wie Interleukin-8, Interleukin-6 und Interleukin-1- $\beta$  im Trachealsekret [81, 78]. Über einen längeren Zeitraum beatmete Frühgeborene sind prädisponiert für die Entwicklung einer BPD und zeigen häufig pathologische Lungenfunktionstests [103, 90]. In der vorliegenden Arbeit soll in diesem Zusammenhang die Rolle von NGF für die Entwicklung einer BPD bzw. pathologischer Lungenfunktion näher betrachtet werden.

In der Literatur sind nur wenige konkrete Angaben über NGF-Werte beim Menschen zu finden. Eine der umfangreichsten Arbeiten wurde von Serrano et al. an 157 Erwachsenen durchgeführt. Die durchschnittliche NGF-Konzentration im Blut lag hier bei 194 pg/ml, mit signifikant höheren Konzentrationen bei Männern verglichen mit Frauen ( 243 pg/ml vs. 112 pg/ml) [111]. Haddad et al. fanden signifikante Unterschiede in der NGF-Konzentration

im Nabelschnurblut früh- und reifgeborener Kinder (13,7 pg/ml vs. 21,2 pg/ml) [45]. Auch BDNF, ein weiterer Vertreter der Neurotrophine, konnte mit zunehmendem Gestationsalter in signifikant steigenden Konzentrationen im Nabelschnurblut nachgewiesen werden [15]. Olgart et al. beschrieben im Zusammenhang mit Asthma NGF-Konzentration im BALF erwachsener Patienten. Die NGF-Konzentrationen lagen hier bei 119 pg/ml in der Gruppe der Asthma-Patienten bzw. 53,9 pg/ml in der Kontrollgruppe [48]. In einer Arbeit über die Rolle von NGF bei Williams- und Down-Syndrom konnten Calamandrei et. al in der gesunden Kontrollgruppe NGF-Konzentrationen im Blut zwischen 17 pg/ml bis 23,5 pg/ml finden [11]. Tab. 9 zeigt eine Übersicht über die genannten Arbeiten.

Tabelle 9: NGF *Literaturübersicht*

<b>Studie</b>	<b>n Pat.</b>	<b>Medium</b>	<b>NGF-Konzentration</b>	<b>Besonderheiten</b>
Serrano, 1996	157	Blut	112 pg/ml (♀) - 243 pg/ml (♂)	Erwachsene
Haddad, 1994	61	NSB*	13,7 pg/ml (I) - 21,2 pg/ml (II)	Frühgeborene (I); Reifgeborene (II)
Olgart, 2002	14	BALF	53,9 mg/pl (I) - 119 mg/pl (II)	Asthmatiker (II) vs. Kontrollgruppe (I) ; Erwachsene
Calamandrei, 2000	26	Blut	17 pg/ml (I) - 23,5 pg/ml (II)	2-6 Jahre alt (I); 8-12 Jahre alt (II)

\*NSB=Nabelschnurblut

Nach unserem Wissen beschreibt die vorliegende Arbeit als erste NGF im Trachealsekret des frühgeborenen Kindes. NGF konnte bei allen Kindern schon innerhalb des ersten Lebensstages festgestellt werden. Dabei beobach-

teten wir signifikant niedrigere NGF-Konzentrationen an Tag 1 in ELBWI (Geburtsgewicht <1000g, Gruppe A) im Vergleich zu VLBWI (Geburtsgewicht 1000g-1500g, Gruppe B). Es ist nicht auszuschliessen das Unterschiede in der Beatmung, z.B. MAP oder FiO<sub>2</sub>, dafür die Ursache sind. Ein Vergleich der Beatmungsparameter zwischen beiden Gruppen zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede. Chouthai et al. und Haddad et al. berichten in ihren Arbeiten über erniedrigte NGF-Konzentrationen im Nabelschnurblut Frühgeborener im Vergleich zu Reifgeborenen [15, 45]. Bis auf ein Kind waren in unserer Studie alle Kinder in der Gruppe der ELBWI zwischen der 23. und 26. SSW geboren. Es scheint berechtigt anzunehmen, dass die beobachteten Unterschiede der NGF-Konzentration an Tag 1 Folge der extremen Unreife der Kinder in Gruppe A sind.

Wir konnten besonders in den ELBWI der Gruppe A eine Abnahme der NGF-Konzentrationen innerhalb der ersten sieben Tage feststellen. Zum momentanen Zeitpunkt können wir nicht beantworten, ob die hohen NGF-Konzentrationen an Tag 1 und Tag 3 Folge maschineller Beatmung sind oder ob sie mit anderen Faktoren in kausalem Zusammenhang stehen. Es ist bekannt, dass die Freisetzung von NGF aus Epithel- und glatten Muskelzellen des Bronchialsystems sowie aus Fibroblasten durch verschiedene Zytokine wie IL1- $\beta$  und TNF- $\alpha$  getriggert wird [31, 86, 34]. Bei frühgeborenen Kindern welche in der Folge BPD entwickelten, konnten erhöhte Konzentrationen einiger dieser Zytokine in den ersten Lebenstagen festgestellt werden, darunter IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL6 [54]. In unserer Studienpopulation entwickelten bis auf ein Kind alle Kinder der Gruppe A in der Folge BPD. Es ist denkbar, dass die relativ hohen NGF-Konzentrationen in den ersten Tagen in dieser Gruppe die Konsequenz erhöhter Zytokin-Freisetzungen sind. In Gruppe B, in der kein Kind BPD entwickelte, konnte kein signifikanter Abfall der

NGF-Konzentration festgestellt werden. Die Freisetzung von NGF könnte also direkte Folge der maschinellen Beatmung sein oder indirekt die Konsequenz erhöhter Zytokin-Konzentration.

Im Vergleich zu den oben genannten Studien (s. auch Abb. 9) fällt auf, dass die von uns gefundenen NGF-Konzentrationen initial teilweise mehr als zehnmals so hoch sind (Gruppe A=67,6 pg/ml; Gruppe B=497,8 pg/ml). Bei länger beatmeten Kindern konnten wir im weiteren Verlauf NGF-Konzentration von durchschnittlich 23,2 - 54,2 pg/ml feststellen. Aus Mangel an Vergleichswerten für NGF-Konzentrationen bei frühgeborenen Kindern kann an dieser Stelle über die eventuelle pathologische Bedeutung der gefundenen NGF-Konzentrationen nur spekuliert werden. Betrachtet man die in Abb. 9 gezeigten NGF-Konzentrationen, so scheinen die in unserer Studie beobachteten Werte aber durchaus relevant.

Bei Mäusen führte die Überexpression von NGF zu sensorischer Hyperinnervation und erhöhtem Atemwegswiderstand [52]. Obstruktion und Hyperreagibilität der kleinen Luftwege wird häufig bei frühgeborenen Kindern mit BPD beobachtet [103, 90, 115]. Es scheint berechtigt anzunehmen, dass NGF zu der bei Frühgeborenen mit BPD berichteten Hyperreagibilität der Luftwege beiträgt. Letztlich kann diese Frage allein anhand unserer Studie aber leider nicht beantwortet werden.

**TrkA** In der Literatur ist der chemotaktische Effekt von NGF auf neutrophile Granulozyten beschrieben [8, 36]. Bis zum heutigen Zeitpunkt gibt es keine Arbeit, die klar differenziert, welcher der beiden NGF-bindenden Rezeptoren, TrkA oder p75, diesen Effekt vermittelt. Es ist zu beachten, dass NGF mit hoher Affinität spezifisch an TrkA bindet. P75 bindet mit niedriger Affinität sowohl NGF als auch andere Neurotrophine (Brain-derived

neurotrophic factor, Neurotrophin-3, Neurotrophin-4/5) [126]. Nach unserem Wissen ist nur für NGF eine chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten beschrieben. Dies legt die Vermutung nahe, dass die chemotaktische Aktivierung neutrophiler Granulozyten über NGF überwiegend via TrkA vermittelt wird.

Die vorliegende Arbeit beschreibt als erste die Expression des hochaffinen NGF-spezifischen Rezeptors TrkA auf Zellen des Trachealsekretes frühgeborener Kinder. Auffallend ist der konstant hohe Anteil TrkA+ Zellen im Trachealsekret (s. Abb. 19). Bemerkenswert ist, dass TrkA in unserer Studienpopulation auf mehr Zellen des Trachealsekretes exprimiert wurde als der in der Literatur weit mehr beachtete neutrophil-chemotaktische Interleukin-8-Rezeptor CXCR2 ( $p < 0,001$ ). NGF könnte im Rahmen entzündlicher pulmonaler Erkrankungen Einfluss auf die Akkumulation neutrophiler Granulozyten haben.

### 4.3.3 Ausblick

Unsere Ergebnisse zu Interleukin-8-Konzentrationen und pulmonaler Neutrophilie decken sich im Wesentlichen mit denen anderer Studien. Dies validiert unsere Studienpopulation und den Ablauf der Trachealsekretaspiration. Wir berichten zum ersten Mal über die Expression von CXCR1 und CXCR2 auf Zellen des Trachealsekretes bei Neugeborenen der 23.-40. SSW. Der beobachtete Anstieg der Alveolarmakrophagen innerhalb der ersten drei Wochen könnte Folge der gesteigerten Expression von CXCR2 sein. Der starke Anstieg CXCR1+ Zellen während des gesamten Beatmungszeitraumes könnte durch eine Verminderung der neutrophilen Apoptoserate zu der beobachteten persistierenden Neutrophilie beitragen.

Wir konnten NGF und seinen hoch-affinen Rezeptor TrkA ab dem ersten Lebenstag in Trachealsekreten frühgeborener Kinder der 23.-30. SSW nachweisen. Dabei beobachteten wir signifikant niedrigere NGF-Konzentrationen an Tag 1 in den ELBWI im Vergleich zu den reiferen VLBWI. Vermutlich ist dies Folge der extremen Unreife dieser Kinder. NGF und TrkA konnten während bis zu 42 Tagen maschineller Beatmung im Trachealsekret nachgewiesen werden.

Die Prävention und Therapie der beatmungsinduzierten Lungenschädigung beim Frühgeborenen wird auch in Zukunft eine große Herausforderung für Ärzte und Eltern darstellen. Studien der letzten Jahre zeigen, dass CXCR1 und CXCR2 eine zentrale Rolle in der pathophysiologischen Entstehung dieser Erkrankung spielen. Erste Ergebnisse im Tiermodell zum Einsatz spezifischer Antikörper gegen diese Rezeptoren sind sehr ermutigend. Wir konnten zum ersten Mal diese Rezeptoren auch bei frühgeborenen Kindern nachweisen. In weiteren Studien mit größeren Fallzahlen muss die Rolle dieser

Rezeptoren nun weiter beleuchtet werden. Dabei ist vor allem eine spezifische Auswertung der Expression für die verschiedenen Zellpopulationen, also neutrophile Granulozyten, Makrophagen etc., erstrebenswert. Möglicherweise ist es in diesem Zusammenhang sinnvoll, zugunsten einer höheren Zellausbeute im Trachealsekret auf invasivere Möglichkeiten der Sekretgewinnung, z.B. BAL, zurückzugreifen. Allerdings wäre dieses Vorgehen aufgrund seiner Invasivität mit Sicherheit nicht zur longitudinalen Beobachtung geeignet.

Wir konnten zum ersten Mal NGF und seinen Rezeptor TrkA im Trachealsekret frühgeborener Kinder nachweisen. Die Bedeutung von NGF bei chronisch-inflammatorischen Erkrankungen der Lunge des Adulten ist Inhalt umfangreicher Studien. Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass NGF und TrkA auch beim frühgeborenen Kind an der Regulation der Atemwege beteiligt sind. Das genauere Verständnis der Wirkmechanismen von NGF und seiner Bedeutung für die Prävention und Therapie der beatmungsinduzierten Lungenschädigung beim Frühgeborenen muss in Zukunft Ziel weiterer Studien sein.

## 5 Zusammenfassung

**Einleitung** Die bronchopulmonale Dysplasie ist eine häufige Komplikation langzeitbeatmeter Frühgeborener. Entzündliche Prozesse in der Lunge spielen in der Pathogenese eine Schlüsselrolle. Infolge maschineller Beatmung kommt es bei diesen Patienten zu einem Anstieg proinflammatorischer Zytokine und zu einem Einstrom neutrophiler Granulozyten und Alveolarmakrophagen in die Lunge. Im späteren Leben findet sich bei diesen Kindern häufig eine Hyperreagibilität der Luftwege, potentiell verursacht durch ein Remodelling der Luftwege infolge der Beatmungs-induzierten Lungenschädigung und der damit einhergehenden chronischen Inflammation.

Interleukin-8 ist ein potentes, in der Lunge unter anderem von Alveolarepithelzellen sezerniertes Chemokin. U.a. stimuliert Interleukin-8 die Migration und Aktivierung von Entzündungszellen. Die Wirkung von Interleukin-8 auf neutrophile Granulozyten und Makrophagen wird dabei über die Interleukin-8-Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 vermittelt.

NGF (Nerve Growth Factor) ist ein Neurotrophin, welches in Tiermodellen die Hyperreagibilität und Entzündung der Luftwege moduliert sowie die Migration von Lungenfibroblasten und Proliferation bronchialer SMC (smooth muscle cells) stimuliert. Die Wirkung von NGF wird spezifisch über den TrkA (Tropomyosinrezeptorkinase A) vermittelt.

Das Ziel dieser Arbeit war die longitudinale Untersuchung der Interleukin-8- bzw. NGF-Rezeptorinteraktion und deren Rolle bezüglich der Akkumulation von Entzündungszellen in der kindlichen Lunge.

**Methoden** Unsere Patienten wurden sechsmal pro Woche endotracheal abgesaugt. In dem so gewonnenen Trachealsekret wurde alternierend die Expression der Interleukin-8- und NGF-Rezeptoren mit FACS durchflusszy-



tometrisch bestimmt bzw. im Ausstrichpräparat die Zellpopulationen lichtmikroskopisch ausgezählt. Die Interleukin-8- respektive NGF-Konzentration wurde täglich mit ELISA bestimmt. Der klinische Zustand der Patienten wurde umfangreich dokumentiert.

**Ergebnisse** 30 Patienten wurden in die Studie eingeschlossen, davon 18 Kinder mit einem Gestationsalter <29 Wochen (GA I) und zwölf reifere Kinder (GA II). Wir beobachteten konstant hohe Neutrophilenzahlen in der Lunge der unreiferen Kinder. Im Gegenzug dazu konnten wir bei den reiferen Kindern eine Abnahme der Neutrophilenzahlen bis auf ein Minimum direkt prae extubationem feststellen ( $p < 0,001$ ). Die Kinder der GA I zeigten einen Anstieg der Interleukin-8-Konzentration in den ersten drei Tagen ( $p < 0,05$ ), während wir bei den reiferen Kinder eine tendentielle Abnahme während der Beatmung feststellten ( $\rho = -0,443$ ;  $p = 0,06$ ). Dabei korrelierte die Interleukin-8-Konzentration mit der Abnahme der Neutrophilenzahlen in dieser Population ( $\rho = 0.814$ ;  $p = 0.007$ ).

Unabhängig vom Gestationsalter beobachteten wir einen starken Anstieg CXCR1+ Zellen im Trachelsekret ( $\rho = 0,48$ ;  $p = 0,001$ ). Während der Anteil CXCR2+ Zellen in GA II konstant blieb, zeigte sich in GA I ein Anstieg während der ersten 14 Beatmungstage ( $\rho = 0,41$ ;  $p = 0,003$ ).

Wir konnten erstmals NGF und die Expression des NGF-Rezeptors TrkA beim Frühgeborenen nachweisen. Dabei zeigten sich bei extrem frühreifen Kindern mit einem Geburtsgewicht <1000g niedrigere NGF-Konzentrationen als bei reiferen Kindern ( $p < 0,05$ ). Bei allen Kindern konnte TrkA auf den Zellen des Trachealsekretes nachgewiesen werden.

**Diskussion** Die Akkumulation neutrophiler Granulozyten in der Lunge ist ein dynamischer Prozess bestehend aus neutrophiler Migration und kon-

trollierter Apoptose. Der starke Anstieg CXCR1+ Zellen während der Beatmungsphase könnte durch Verminderung der neutrophilen Apoptoserate zu der beobachteten persistierenden Neutrophilie beitragen. Der Anstieg CXCR2+ Zellen in den ersten beiden Wochen könnte zu dem beobachteten Einstrom von Alveolarmakrophagen führen.

Wir konnten eine starke Expression von TrkA auf Zellen des Trachealsekretes feststellen. In Anbetracht der beschriebenen chemotaktischen Wirkung von NGF auf neutrophile Granulozyten ist anzunehmen, dass NGF auch beim Frühgeborenen Einfluss auf die Akkumulation neutrophiler Granulozyten in der Lunge hat.

## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

ARDS	acute respiratory distress syndrome
BALF	bronchoalveolar lining fluid
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
CLD	chronic lung disease
CXCL8	alt: IL8-Interleukin8
CXCR1	CXCL8-Rezeptor 1; alt: IL8-RA
CXCR2	CXL8-Rezeptor 2; alt: IL8-RB
ELBWI	extreme low birth weight infants
ELF	epithelial lining fluid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	fluorescent activated cell sorting
FiO <sub>2</sub>	inspiratorische Sauerstoff-Konzentration
FSC	Forward angle light scatter
MAP	mean airway pressure
NGF	Nerve Growth factor
SMC	smooth muscle cell
SSC	side angle light scatter
TrkA	Tropomyosinrezeptor Kinase A; Zielrezeptor für NGF
VILI	ventilator-induced lung injury
VLBWI	very low birth weight infants

## 6.2 Danksagung

**PD Dr. Andreas Flemmer** Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Flemmer für die Überlassung des Themas und sein kontinuierliches, grosses Engagement. Er war stets ein aufgeweckter und kritischer Gesprächspartner bei klinischen wie experimentellen Fragestellungen und hat massgeblich zum Erfolg beigetragen.

**Prof. Dr. Andreas Schulze** Meinem Doktorvater Prof. Dr. Andreas Schulze möchte ich für seine kollegiale Art der Betreuung meiner Doktorarbeit danken. Das produktive Umfeld seiner Abteilung trug entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit bei.

**PD Dr. Susanne Krauss-Etschmann** Frau PD Dr. Krauss-Etschmann danke ich für Ihr Engagement bei experimentellen und immunologischen Fragestellungen. Durch Ihre Kompetenz und Erfahrung half Sie mir aus manch frustrierender Situation.

**Dr. Ebru Yilmaz** Frau Dr. Ebru Yilmaz danke ich für ihre engagierte und ausdauernde Mitarbeit. Durch Ihre aufmerksame Beobachtungsgabe konnte ich manche Hürde umgehen.

**Dr. Rashmi Mittal** Bei Frau Dr. Rashmi Mittal möchte ich mich für ihre tatkräftige methodische Unterstützung und Ihre humorvolle Art bedanken.

**NIPS-Team** mein besonderer Dank gilt dem gesamten Team der neonatologischen Intensivstation, ohne dessen tatkräftige Mithilfe diese Arbeit nicht zu realisieren gewesen wäre.

## 7 Literaturverzeichnis

### Literatur

- [1] L Aloe, L Bracci-Laudiero, S Bonini, and L Manni. The expanding role of nerve growth factor: from neurotrophic activity to immunologic diseases. *Allergy*, 52(9):883–94, Sep 1997. 0105-4538 (Print) Journal Article Review.
- [2] Praveen Ballabh, Maciej Simm, Jaishree Kumari, Alfred N Krauss, Ajey Jain, Peter A M Auld, and Susanna Cunningham-Rundles. Lymphocyte subpopulations in bronchopulmonary dysplasia. *Am J Perinatol*, 20(8):465–475, 2003.
- [3] Eduardo Bancalari and Nelson Claure. Definitions and diagnostic criteria for bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinatol*, 30(4):164–70, Aug 2006.
- [4] J Belperio, M Keane, M Burdick, V Londhe, Y Xue, K Li, R Phillips, and R Strieter. Critical role for cxcr2 and cxcr2 ligands during the pathogenesis of ventilator-induced lung injury. *J Clin Invest*, 110(11):1703–16, Dec 2002.
- [5] William A Boisvert, David M Rose, Kristen A Johnson, Maria E Fuentes, Sergio A Lira, Linda K Curtiss, and Robert A Terkeltaub. Up-regulated expression of the cxcr2 ligand kc/gro-alpha in atherosclerotic lesions plays a central role in macrophage accumulation and lesion progression. *Am J Pathol*, 168(4):1385–1395, 2006.
- [6] S Bonini, A Lambiase, S Bonini, F Angelucci, L Magrini, L Manni, and L Aloe. Circulating nerve growth factor levels are increased in

- humans with allergic diseases and asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(20):10955–60, Oct 1996. 0027-8424 (Print) Journal Article.
- [7] S Bonini, G Rasi, M Bracci-Laudiero, A Procoli, and L Aloe. Nerve growth factor: neurotrophin or cytokine? *Int Arch Allergy Immunol*, 131(2):80–4, Jun 2003. 1018-2438 (Print) Journal Article Review.
- [8] M Boyle, M Lawman, A Gee, and M Young. Nerve growth factor: a chemotactic factor for polymorphonuclear leukocytes in vivo. *J Immunol*, 134(1):564–8, Jan 1985. 0022-1767 (Print) Journal Article.
- [9] A Braun, E Appel, R Baruch, U Herz, V Botchkarev, R Paus, C Brodie, and H Renz. Role of nerve growth factor in a mouse model of allergic airway inflammation and asthma. *Eur J Immunol*, 28(10):3240–51, Oct 1998. 0014-2980 (Print) Journal Article.
- [10] S B Brown and J Savill. Phagocytosis triggers macrophage release of fas ligand and induces apoptosis of bystander leukocytes. *J Immunol*, 162(1):480–5, Jan 1999.
- [11] G Calamandrei, E Alleva, F Cirulli, A Queyras, V Volterra, O Capirci, S Vicari, A Giannotti, P Turrini, and L Aloe. Serum ngf levels in children and adolescents with either williams syndrome or down syndrome. *Dev Med Child Neurol*, 42(11):746–50, Nov 2000.
- [12] J Campbell, C Brightling, F Symon, S Qin, K Murphy, M Hodge, D Andrew, L Wu, E Butcher, and A Wardlaw. Expression of chemokine receptors by lung t cells from normal and asthmatic subjects. *J Immunol*, 166(4):2842–8, Feb 2001.
- [13] P Carre, R Mortenson, T King, P Noble, C Sable, and D Riches. Increased expression of the interleukin-8 gene by alveolar macrophages

- in idiopathic pulmonary fibrosis. a potential mechanism for the recruitment and activation of neutrophils in lung fibrosis. *J Clin Invest*, 88(6):1802–10, Dec 1991. 0021-9738 (Print) Journal Article.
- [14] S Chabra, C Cottrill, M K Rayens, R Cross, D Lipke, and M Bruce. Lymphocyte subsets in cord blood of preterm infants: effect of antenatal steroids. *Biol Neonate*, 74(3):200–207, 1998.
- [15] N Chouthai, J Sampers, N Desai, and G Smith. Changes in neurotrophin levels in umbilical cord blood from infants with different gestational ages and clinical conditions. *Pediatr Res*, 53(6):965–9, Jun 2003. 0031-3998 (Print) Journal Article.
- [16] A Chuntharapai and K Kim. Regulation of the expression of il-8 receptor a/b by il-8: possible functions of each receptor. *J Immunol*, 155(5):2587–94, Sep 1995. 0022-1767 (Print) Journal Article.
- [17] R Clark, D Gerstmann, A Jobe, S Moffitt, A Slutsky, and B Yoder. Lung injury in neonates: causes, strategies for prevention, and long-term consequences. *J Pediatr*, 139(4):478–86, Oct 2001. 0022-3476 (Print) Journal Article Review.
- [18] O Dammann and A Leviton. Maternal intrauterine infection, cytokines, and brain damage in the preterm newborn. *Pediatr Res*, 42(1):1–8, Jul 1997. 0031-3998 (Print) Journal Article Review.
- [19] P Dargaville, M South, P Vervaart, and P McDougall. Validity of markers of dilution in small volume lung lavage. *Am J Respir Crit Care Med*, 160(3):778–84, Sep 1999. 1073-449X (Print) Journal Article.

- [20] P Dargaville, M South, P Vervaart, and P McDougall. Validity of markers of dilution in small volume lung lavage. *Am J Respir Crit Care Med*, 160(3):778–84, Sep 1999. 1073-449X (Print) Journal Article.
- [21] J de Blic, F Midulla, A Barbato, A Clement, I Dab, E Eber, C Green, J Grigg, S Kotecha, G Kurland, P Pohunek, F Ratjen, and G Rossi. Bronchoalveolar lavage in children. ers task force on bronchoalveolar lavage in children. european respiratory society. *Eur Respir J*, 15(1):217–31, Jan 2000. 0903-1936 (Print) Journal Article Review.
- [22] A de Vries, M C Dessing, F Engels, P A Henricks, and F P Nijkamp. Nerve growth factor induces a neurokinin-1 receptor- mediated airway hyperresponsiveness in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med*, 159(5 Pt 1):1541–1544, 1999.
- [23] A De Vries, Ferdi Engels, P A J Henricks, T Leusink-Muis, A Fischer, and F P Nijkamp. Antibodies directed against nerve growth factor inhibit the acute bronchoconstriction due to allergen challenge in guinea-pigs. *Clin Exp Allergy*, 32(2):325–328, 2002.
- [24] J DiVietro, M Smith, B Smith, L Petruzzelli, R Larson, and M Lawrence. Immobilized il-8 triggers progressive activation of neutrophils rolling in vitro on p-selectin and intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol*, 167(7):4017–25, Oct 2001. 0022-1767 (Print) Journal Article.
- [25] S Donnelly, R Strieter, S Kunkel, A Walz, C Robertson, D Carter, I Grant, A Pollok, and C Haslett. Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at-risk patient groups. *Lancet*, 341(8846):643–7, Mar 1993. 0140-6736 (Print) Journal Article.



- [26] A Dunican, P Grutkoski, S Leuenroth, A Ayala, and H H Simms. Neutrophils regulate their own apoptosis via preservation of cxc receptors. *J Surg Res*, 90(1):32–38, 2000.
- [27] A Dunican, S Leuenroth, P Grutkoski, A Ayala, and H Simms. Tnfalpha-induced suppression of pmn apoptosis is mediated through interleukin-8 production. *Shock*, 14(3):284–8; discussion 288–9, Sep 2000.
- [28] E A Egan, 2nd. Effect of lung inflation on alveolar permeability to solutes. *Ciba Found Symp*, (38):101–14, 1976.
- [29] Richard A Ehrenkranz, Michele C Walsh, Betty R Vohr, Alan H Jobe, Linda L Wright, Avroy A Fanaroff, Lisa A Wrage, Kenneth Poole, and National Institutes of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. Validation of the national institutes of health consensus definition of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics*, 116(6):1353–60, Dec 2005.
- [30] P Ehrhard, U Ganter, A Stalder, J Bauer, and U Otten. Expression of functional trk protooncogene in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(12):5423–7, Jun 1993. 0027-8424 (Print) Journal Article.
- [31] A Fox, H Patel, P Barnes, and M Belvisi. Release of nerve growth factor by human pulmonary epithelial cells: role in airway inflammatory diseases. *Eur J Pharmacol*, 424(2):159–62, Jul 2001. 0014-2999 (Print) Journal Article.
- [32] A J Fox, H J Patel, P J Barnes, and M G Belvisi. Release of nerve growth factor by human pulmonary epithelial cells: role in airway inflammatory diseases. *Eur J Pharmacol*, 424(2):159–162, 2001.

- [33] J Frank, C Wray, D McAuley, R Schwendener, and M Matthay. Alveolar macrophages contribute to alveolar barrier dysfunction in ventilator-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 291(6):L1191–8, Dec 2006.
- [34] V Freund, F Pons, V Joly, E Mathieu, N Martinet, and N Frossard. Upregulation of nerve growth factor expression by human airway smooth muscle cells in inflammatory conditions. *Eur Respir J*, 20(2):458–63, Aug 2002. 0903-1936 (Print) Journal Article.
- [35] S Friberg, C Olgart Hoglund, and L Gustafsson. Nerve growth factor increases airway responses and decreases levels of exhaled nitric oxide during histamine challenge in an in vivo guinea-pig model. *Acta Physiol Scand*, 173(2):239–45, Oct 2001. 0001-6772 (Print) Journal Article.
- [36] A Gee, M Boyle, K Munger, M Lawman, and M Young. Nerve growth factor: stimulation of polymorphonuclear leukocyte chemotaxis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80(23):7215–8, Dec 1983. 0027-8424 (Print) Journal Article.
- [37] R Gerszten, E Garcia-Zepeda, Y Lim, M Yoshida, H Ding, M Gimbrone, A Luster, F Lusinskas, and A Rosenzweig. Mcp-1 and il-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature*, 398(6729):718–23, Apr 1999. 0028-0836 (Print) Journal Article.
- [38] P C Glynn, E Henney, and I P Hall. The selective cxcr2 antagonist sb272844 blocks interleukin-8 and growth-related oncogene-alpha-mediated inhibition of spontaneous neutrophil apoptosis. *Pulm Pharmacol Ther*, 15(2):103–110, 2002.

- [39] R Gomez, R Romero, F Ghezzi, B Yoon, M Mazor, and S Berry. The fetal inflammatory response syndrome. *Am J Obstet Gynecol*, 179(1):194–202, Jul 1998.
- [40] D Good. Nerve growth factor regulates hco<sub>3</sub><sup>-</sup> absorption in thick ascending limb: modifying effects of vasopressin. *Am J Physiol*, 274(4 Pt 1):C931–9, Apr 1998. 0002-9513 (Print) Journal Article.
- [41] D Good and T George. Neurotrophin-3 inhibits hco absorption via a camp-dependent pathway in renal thick ascending limb. *Am J Physiol Cell Physiol*, 281(6):C1804–11, Dec 2001. 0363-6143 (Print) Journal Article.
- [42] J Grigg, S Arnon, A Chase, and M Silverman. Inflammatory cells in the lungs of premature infants on the first day of life: perinatal risk factors and origin of cells. *Arch Dis Child*, 69(1 Spec No):40–43, 1993.
- [43] P Groneck and C Speer. Inflammatory mediators and bronchopulmonary dysplasia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 73(1):F1–3, Jul 1995. 1359-2998 (Print) Journal Article.
- [44] R Gruber, A Pforte, B Beer, and G Riethmuller. Determination of gamma/delta and other t-lymphocyte subsets in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood from patients with sarcoidosis and idiopathic fibrosis of the lung. *Apmis*, 104(3):199–205, Mar 1996.
- [45] J Haddad, V Vilge, J Juif, M Maitre, L Donato, J Messer, and J Mark. Beta-nerve growth factor levels in newborn cord sera. *Pediatr Res*, 35(6):637–9, Jun 1994. 0031-3998 (Print) Journal Article.

- [46] O Halaas, R Vik, A Ashkenazi, and T Espevik. Lipopolysaccharide induces expression of apo2 ligand/trail in human monocytes and macrophages. *Scand J Immunol*, 51(3):244–50, Mar 2000.
- [47] P Haslam and R Baughman. Report of ers task force: guidelines for measurement of acellular components and standardization of bal. *Eur Respir J*, 14(2):245–8, Aug 1999. 0903-1936 (Print) Editorial.
- [48] C Olgart Hoglund, F de Blay, J Oster, C Duvernelle, O Kassel, G Pauli, and N Frossard. Nerve growth factor levels and localisation in human asthmatic bronchi. *Eur Respir J*, 20(5):1110–6, Nov 2002. 0903-1936 (Print) Journal Article.
- [49] W Holmes, J Lee, W Kuang, G Rice, and W Wood. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science*, 253(5025):1278–80, Sep 1991. 0036-8075 (Print) Journal Article.
- [50] W Holmes, J Lee, W Kuang, G Rice, and W Wood. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science*, 253(5025):1278–80, Sep 1991. 0036-8075 (Print) Journal Article.
- [51] G Hoser, J Kawiak, J Domagala-Kulawik, P Kopinski, and W Droszcz. Flow cytometric evaluation of lymphocyte subpopulations in half of healthy smokers and nonsmokers. *Folia Histochem Cytobiol*, 37(1):25–30, 1999.
- [52] G Hoyle, R Graham, J Finkelstein, K Nguyen, D Gozal, and M Friedman. Hyperinnervation of the airways in transgenic mice overexpressing nerve growth factor. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 18(2):149–57, Feb 1998. 1044-1549 (Print) Journal Article.

- [53] S Jones, M Wolf, S Qin, C Mackay, and M Baggiolini. Different functions for the interleukin 8 receptors (il-8r) of human neutrophil leukocytes: NADPH oxidase and phospholipase D are activated through il-8r1 but not il-8r2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(13):6682–6, Jun 1996. 0027-8424 (Print) Journal Article.
- [54] B Jonsson, K Tullus, A Brauner, Y Lu, and G Noack. Early increase of TNF- $\alpha$  and IL-6 in tracheobronchial aspirate fluid: indicator of subsequent chronic lung disease in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 77(3):F198–201, 1997.
- [55] Y Kannan, H Ushio, H Koyama, M Okada, M Oikawa, T Yoshihara, M Kaneko, and H Matsuda. 2.5S nerve growth factor enhances survival, phagocytosis, and superoxide production of murine neutrophils. *Blood*, 77(6):1320–1325, 1991.
- [56] T Kawano. High frequency oscillation. *Acta Paediatr Jpn*, 34(6):631–5, Dec 1992. 0374-5600 (Print) Journal Article Review.
- [57] H Kobayashi, G Gleich, J Butterfield, and H Kita. Human eosinophils produce neurotrophins and secrete nerve growth factor on immunologic stimuli. *Blood*, 99(6):2214–20, Mar 2002. 0006-4971 (Print) Journal Article.
- [58] S Kotecha. Cytokines in chronic lung disease of prematurity. *Eur J Pediatr*, 155 Suppl 2:S14–7, Aug 1996. 0340-6199 (Print) Journal Article Review.
- [59] S Kotecha, B Chan, N Azam, M Silverman, and R Shaw. Increase in interleukin-8 and soluble intercellular adhesion molecule-1 in bronchoalveolar lavage fluid from premature infants who develop chronic

- lung disease. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 72(2):F90–6, Mar 1995. 1359-2998 (Print) Journal Article.
- [60] S Kotecha, R Mildner, L Prince, J Vyas, A Currie, R Lawson, and M Whyte. The role of neutrophil apoptosis in the resolution of acute lung injury in newborn infants. *Thorax*, 58(11):961–7, Nov 2003.
- [61] M Krieger, T Brunner, S Bischoff, V von Tscharnner, A Walz, B Moser, M Baggiolini, and C Dahinden. Activation of human basophils through the il-8 receptor. *J Immunol*, 149(8):2662–7, Oct 1992. 0022-1767 (Print) Journal Article.
- [62] S Kunkel, T Standiford, K Kasahara, and R Strieter. Interleukin-8 (il-8): the major neutrophil chemotactic factor in the lung. *Exp Lung Res*, 17(1):17–23, Jan 1991.
- [63] A Lambiase, L Bracci-Laudiero, S Bonini, S Bonini, G Starace, M D’Elios, M De Carli, and L Aloe. Human cd4+ t cell clones produce and release nerve growth factor and express high-affinity nerve growth factor receptors. *J Allergy Clin Immunol*, 100(3):408–14, Sep 1997. 0091-6749 (Print) Journal Article.
- [64] B Lane, K Lore, P Bock, J Andersson, M Coffey, R Strieter, and D Markovitz. Interleukin-8 stimulates human immunodeficiency virus type 1 replication and is a potential new target for antiretroviral therapy. *J Virol*, 75(17):8195–202, Sep 2001. 0022-538X (Print) Journal Article.
- [65] A Leon, A Buriani, R Dal Toso, M Fabris, S Romanello, L Aloe, and R Levi-Montalcini. Mast cells synthesize, store, and release nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(9):3739–43, Apr 1994. 0027-8424 (Print) Journal Article.

- [66] E Leonard, A Skeel, T Yoshimura, K Noer, S Kutvirt, and D Van Epps. Leukocyte specificity and binding of human neutrophil attractant/activation protein-1. *J Immunol*, 144(4):1323–30, Feb 1990. 0022-1767 (Print) Journal Article.
- [67] S Leuenroth, C Lee, P Grutkoski, H Keeping, and H H Simms. Interleukin-8-induced suppression of polymorphonuclear leukocyte apoptosis is mediated by suppressing cd95 (fas/apo-1) fas-1 interactions. *Surgery*, 124(2):409–417, 1998.
- [68] R Levi-Montalcini. The nerve growth factor 35 years later. *Science*, 237(4819):1154–62, Sep 1987. 0036-8075 (Print) Journal Article Review.
- [69] R Levi-Montalcini, S Skaper, R Dal Toso, L Petrelli, and A Leon. Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokine. *Trends Neurosci*, 19(11):514–20, Nov 1996. 0166-2236 (Print) Journal Article Review.
- [70] G Lewin and Y Barde. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci*, 19:289–317, 1996. 0147-006X (Print) Journal Article Review.
- [71] U Lippert, M Artuc, A Grutzkau, A Moller, A Kenderessy-Szabo, D Schadendorf, J Norgauer, K Hartmann, R Schweitzer-Stenner, T Zuberbier, B Henz, and S Kruger-Krasagakes. Expression and functional activity of the il-8 receptor type cxcr1 and cxcr2 on human mast cells. *J Immunol*, 161(5):2600–8, Sep 1998. 0022-1767 (Print) Journal Article.
- [72] A Luster. Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*, 338(7):436–45, Feb 1998.
- [73] H Lutichau, J Stine, T Boesen, A Johnsen, D Chantry, J Gerstoft, and T Schwartz. A highly selective cc chemokine receptor (ccr)8 ant-

- agonist encoded by the poxvirus mollusum contagiosum. *J Exp Med*, 191(1):171–80, Jan 2000.
- [74] N Luu, G Rainger, and G Nash. Differential ability of exogenous chemotactic agents to disrupt transendothelial migration of flowing neutrophils. *J Immunol*, 164(11):5961–9, Jun 2000. 0022-1767 (Print) Journal Article.
- [75] M Mallat, R Houlgatte, P Brachet, and A Prochiantz. Lipopolysaccharide-stimulated rat brain macrophages release ngf in vitro. *Dev Biol*, 133(1):309–11, May 1989. 0012-1606 (Print) Journal Article.
- [76] T Marcy, W Merrill, J Rankin, and H Reynolds. Limitations of using urea to quantify epithelial lining fluid recovered by bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis*, 135(6):1276–80, Jun 1987.
- [77] K Matsushima and J Oppenheim. Interleukin 8 and mcaf: novel inflammatory cytokines inducible by il 1 and tnf. *Cytokine*, 1(1):2–13, Nov 1989. 1043-4666 (Print) Journal Article Review.
- [78] J R McColm, B J Stenson, N Biermasz, and N McIntosh. Measurement of interleukin 10 in bronchoalveolar lavage from preterm ventilated infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 82(2):F156–9, 2000.
- [79] S Meakin and E Shooter. The nerve growth factor family of receptors. *Trends Neurosci*, 15(9):323–31, Sep 1992. 0166-2236 (Print) Journal Article Review.
- [80] Keith L. Moore. *Embryologie*. Schattauer, 1990.



- [81] U Munshi, J Niu, M Siddiq, and L Parton. Elevation of interleukin-8 and interleukin-6 precedes the influx of neutrophils in tracheal aspirates from preterm infants who develop bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulmonol*, 24(5):331–6, Nov 1997. 8755-6863 (Print) Journal Article.
- [82] K Murase, Y Murakami, K Takayanagi, Y Furukawa, and K Hayashi. Human fibroblast cells synthesize and secrete nerve growth factor in culture. *Biochem Biophys Res Commun*, 184(1):373–9, Apr 1992. 0006-291X (Print) Journal Article.
- [83] J G Muscedere, J B Mullen, K Gan, and A S Slutsky. Tidal ventilation at low airway pressures can augment lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 149(5):1327–34, May 1994.
- [84] G Nilsson, K Forsberg-Nilsson, Z Xiang, F Hallbook, K Nilsson, and D Metcalfe. Human mast cells express functional trka and are a source of nerve growth factor. *Eur J Immunol*, 27(9):2295–301, Sep 1997. 0014-2980 (Print) Journal Article.
- [85] W Northway, R Rosan, and D Porter. Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease. bronchopulmonary dysplasia. *N Engl J Med*, 276(7):357–68, Feb 1967. 0028-4793 (Print) Journal Article.
- [86] C Olgart and N Frossard. Human lung fibroblasts secrete nerve growth factor: effect of inflammatory cytokines and glucocorticoids. *Eur Respir J*, 18(1):115–21, Jul 2001. 0903-1936 (Print) Journal Article.

- [87] U Otten, J Scully, P Ehrhard, and R Gadiant. Neurotrophins: signals between the nervous and immune systems. *Prog Brain Res*, 103:293–305, 1994. 0079-6123 (Print) Journal Article Review.
- [88] A Patapoutian and L Reichardt. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol*, 11(3):272–80, Jun 2001. 0959-4388 (Print) Journal Article Review.
- [89] J Patterson and G Childs. Nerve growth factor and its receptor in the anterior pituitary. *Endocrinology*, 135(4):1689–96, Oct 1994. 0013-7227 (Print) Journal Article.
- [90] A S Pelkonen, A L Hakulinen, and M Turpeinen. Bronchial lability and responsiveness in school children born very preterm. *Am J Respir Crit Care Med*, 156(4 Pt 1):1178–1184, 1997.
- [91] H Petering, O Gotze, D Kimmig, R Smolarski, A Kapp, and J Elsner. The biologic role of interleukin-8: functional analysis and expression of *cxcr1* and *cxcr2* on human eosinophils. *Blood*, 93(2):694–702, Jan 1999. 0006-4971 (Print) Journal Article.
- [92] A Philip. Oxygen plus pressure plus time: the etiology of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics*, 55(1):44–50, Jan 1975. 0031-4005 (Print) Journal Article.
- [93] F Pons, V Freund, H Kuissu, E Mathieu, C Olgart, and N Frossard. Nerve growth factor secretion by human lung epithelial a549 cells in pro- and anti-inflammatory conditions. *Eur J Pharmacol*, 428(3):365–9, Oct 2001. 0014-2999 (Print) Journal Article.
- [94] S Randell, R Mercer, and S Young. Postnatal growth of pulmonary acini and alveoli in normal and oxygen-exposed rats studied by serial

- section reconstructions. *Am J Anat*, 186(1):55–68, Sep 1989. 0002-9106 (Print) Journal Article.
- [95] F Ratjen, M Bredendiek, M Brendel, J Meltzer, and U Costabel. Differential cytology of bronchoalveolar lavage fluid in normal children. *Eur Respir J*, 7(10):1865–70, Oct 1994. 0903-1936 (Print) Journal Article.
- [96] M Reinshagen, H Rohm, M Steinkamp, K Lieb, I Geerling, A Von Herbay, G Flamig, V Eysselein, and G Adler. Protective role of neurotrophins in experimental inflammation of the rat gut. *Gastroenterology*, 119(2):368–76, Aug 2000. 0016-5085 (Print) Journal Article.
- [97] S Rennard, G Basset, D Lecossier, K O’Donnell, P Pinkston, P Martin, and R Crystal. Estimation of volume of epithelial lining fluid recovered by lavage using urea as marker of dilution. *J Appl Physiol*, 60(2):532–8, Feb 1986. 8750-7587 (Print) Journal Article.
- [98] S A Renshaw, S J Timmons, V Eaton, L R Usher, M Akil, C D Bingle, and M K Whyte. Inflammatory neutrophils retain susceptibility to apoptosis mediated via the fas death receptor. *J Leukoc Biol*, 67(5):662–8, May 2000.
- [99] Stephen A Renshaw, Jasvir S Parmar, Vanessa Singleton, Sarah J Rowe, David H Dockrell, Steven K Dower, Colin D Bingle, Edwin R Chilvers, and Moira K B Whyte. Acceleration of human neutrophil apoptosis by trail. *J Immunol*, 170(2):1027–33, Jan 2003.
- [100] A Ricci, L Felici, S Mariotta, F Mannino, G Schmid, C Terzano, G Cardillo, F Amenta, and E Bronzetti. Neurotrophin and neurotrophin receptor protein expression in the human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 30(1):12–9, Jan 2004. 1044-1549 (Print) Journal Article.

- [101] J Riedler, J Grigg, C Stone, G Tauro, and C Robertson. Bronchoalveolar lavage cellularity in healthy children. *Am J Respir Crit Care Med*, 152(1):163–8, Jul 1995.
- [102] B Robin, Y Kim, J Huth, J Klocksieben, M Torres, R Tepper, R Castile, J Solway, M Hershenson, and A Goldstein-Filbrun. Pulmonary function in bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulmonol*, 37(3):236–42, Mar 2004. 8755-6863 (Print) Clinical Trial Journal Article.
- [103] Beverley Robin, Young-Jee Kim, Jaimee Huth, Jim Klocksieben, Margaret Torres, Robert S Tepper, Robert G Castile, Julian Solway, Marc B Hershenson, and Amy Goldstein-Filbrun. Pulmonary function in bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulmonol*, 37(3):236–242, 2004.
- [104] P Rytala, M Plataki, F Bucchieri, M Uddin, G Nong, V Kinnula, and R Djukanovic. Airway neutrophilia in copd is not associated with increased neutrophil survival. *Eur Respir J*, 28(6):1163–9, Dec 2006.
- [105] A Samanta, J Oppenheim, and K Matsushima. Identification and characterization of specific receptors for monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (mdncf) on human neutrophils. *J Exp Med*, 169(3):1185–9, Mar 1989. 0022-1007 (Print) Journal Article.
- [106] A Samanta, J Oppenheim, and K Matsushima. Interleukin 8 (monocyte-derived neutrophil chemotactic factor) dynamically regulates its own receptor expression on human neutrophils. *J Biol Chem*, 265(1):183–9, Jan 1990. 0021-9258 (Print) Journal Article.
- [107] L Santambrogio, M Benedetti, M Chao, R Muzaffar, K Kulig, N Gabelini, and G Hochwald. Nerve growth factor production by lymphocytes.

- J Immunol*, 153(10):4488–95, Nov 1994. 0022-1767 (Print) Journal Article.
- [108] G Schmitz. Durchflusszytometrie in der klinischen diagnostik. 1994.
- [109] C Schultz, J Tautz, I Reiss, and J Moller. Prolonged mechanical ventilation induces pulmonary inflammation in preterm infants. *Biol Neonate*, 84(1):64–6, 2003. 0006-3126 (Print) Journal Article.
- [110] K Sebok, D Woodside, A al Aoukaty, A Ho, S Gluck, and A Maghazachi. Il-8 induces the locomotion of human il-2-activated natural killer cells. involvement of a guanine nucleotide binding (go) protein. *J Immunol*, 150(4):1524–34, Feb 1993. 0022-1767 (Print) Journal Article.
- [111] T Serrano, L Lorigados, and S Armenteros. Nerve growth factor levels in normal human sera. *Neuroreport*, 8(1):179–81, Dec 1996.
- [112] A S Slutsky. Lung injury caused by mechanical ventilation. *Chest*, 116(1 Suppl):9S–15S, Jul 1999.
- [113] A Solomon, L Aloe, J Pe'er, J Frucht-Pery, S Bonini, S Bonini, and F Levi-Schaffer. Nerve growth factor is preformed in and activates human peripheral blood eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*, 102(3):454–60, Sep 1998. 0091-6749 (Print) Journal Article.
- [114] C Speer. Inflammation and bronchopulmonary dysplasia: a continuing story. *Semin Fetal Neonatal Med*, 11(5):354–62, Oct 2006. 1744-165X (Print) Journal Article.
- [115] R S Tepper, W J Morgan, K Cota, and L M Taussig. Expiratory flow limitation in infants with bronchopulmonary dysplasia. *J Pediatr*, 109(6):1040–1046, 1986.

- [116] D Thibeault, S Mabry, and M Rezaiekhalthigh. Neonatal pulmonary oxygen toxicity in the rat and lung changes with aging. *Pediatr Pulmonol*, 9(2):96–108, 1990. 8755-6863 (Print) Journal Article.
- [117] M Torcia, L Bracci-Laudiero, M Lucibello, L Nencioni, D Labardi, A Rubartelli, F Cozzolino, L Aloe, and E Garaci. Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory b lymphocytes. *Cell*, 85(3):345–356, 1996.
- [118] T Ueyama, M Hamada, T Hano, I Nishio, Y Masuyama, and S Furukawa. Production of nerve growth factor by cultured vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive and wistar-kyoto rats. *J Hypertens*, 11(10):1061–5, Oct 1993. 0263-6352 (Print) Journal Article.
- [119] S Uhlig. Ventilation-induced lung injury and mechanotransduction: stretching it too far? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 282(5):L892–6, May 2002. 1040-0605 (Print) Journal Article Review.
- [120] M Ultsch, C Wiesmann, L Simmons, J Henrich, M Yang, D Reilly, S Bass, and A de Vos. Crystal structures of the neurotrophin-binding domain of trka, trkb and trkc. *J Mol Biol*, 290(1):149–59, Jul 1999. 0022-2836 (Print) Journal Article.
- [121] L J Van Marter, E N Allred, M Pagano, U Sanocka, R Parad, M Moore, M Susser, N Paneth, and A Leviton. Do clinical markers of barotrauma and oxygen toxicity explain interhospital variation in rates of chronic lung disease? the neonatology committee for the developmental network. *Pediatrics*, 105(6):1194–201, Jun 2000.

- [122] K Wada, A H Jobe, and M Ikegami. Tidal volume effects on surfactant treatment responses with the initiation of ventilation in preterm lambs. *J Appl Physiol*, 83(4):1054–61, Oct 1997.
- [123] B Warner, L Stuart, R Papes, and J Wispe. Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice. *Am J Physiol*, 275(1 Pt 1):L110–7, Jul 1998. 0002-9513 (Print) Journal Article.
- [124] H H Webb and D F Tierney. Experimental pulmonary edema due to intermittent positive pressure ventilation with high inflation pressures. protection by positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis*, 110(5):556–65, Nov 1974.
- [125] J White, J Lee, P Young, R Hertzberg, A Jurewicz, M Chaikin, K Widdowson, J Foley, L Martin, D Griswold, and H Sarau. Identification of a potent, selective non-peptide cxcr2 antagonist that inhibits interleukin-8-induced neutrophil migration. *J Biol Chem*, 273(17):10095–8, Apr 1998. 0021-9258 (Print) Journal Article.
- [126] C Wiesmann, M Ultsch, S Bass, and A de Vos. Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the trka receptor. *Nature*, 401(6749):184–8, Sep 1999. 0028-0836 (Print) Journal Article.
- [127] M Wilson, F S Rosen, S F Schlossman, and E L Reinherz. Ontogeny of human t and b lymphocytes during stressed and normal gestation: phenotypic analysis of umbilical cord lymphocytes from term and preterm infants. *Clin Immunol Immunopathol*, 37(1):1–12, 1985.

- [128] Z Xiang and G Nilsson. Ige receptor-mediated release of nerve growth factor by mast cells. *Clin Exp Allergy*, 30(10):1379–86, Oct 2000. 0954-7894 (Print) Journal Article.
- [129] B A Yoder, M U Anwar, and R H Clark. Early prediction of neonatal chronic lung disease: a comparison of three scoring methods. *Pediatr Pulmonol*, 27(6):388–94, Jun 1999.