



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Oxidative stress in experimental bronchopulmonary dysplasia

Horst, S.A.J. ter

Citation

Horst, S. A. J. ter. (2008, June 12). *Oxidative stress in experimental bronchopulmonary dysplasia*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12949>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/12949>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Chapter

7

Summary
Samenvatting

SUMMARY

The aim of the studies presented in this thesis can be divided into two parts. First, characterization of an animal model for experimental bronchopulmonary dysplasia (BPD) that is suitable for intervention studies. Second, development of new and more effective treatment modalities with less severe side effects in this rat model of hyperoxia-induced neonatal lung injury, to reduce morbidity and mortality in premature infants, treated for respiratory distress syndrome (RDS) with a high risk for BPD.

Chapter 1 describes the clinical presentation, history, pathophysiology, and currently available treatment options of BPD, a chronic lung disease of premature infants ventilated for respiratory failure due to RDS. Typical pathological features of BPD consist of an arrest in alveolarization and vascularization in an immature lung. The important roles of surfactant, inflammation and coagulation in the pathophysiology of BPD are discussed, and more importantly, the possible targets for new treatment modalities are explored. Inflammation and unbalanced coagulation and fibrinolysis, leading to extravascular fibrin deposition in the lung, are two interrelated processes that play a pivotal role in the pathophysiology of BPD. This thesis focuses on the development of new treatment options for BPD by interrupting the vicious cycle of inflammation and coagulation, which can be achieved theoretically by either improving the imbalance between coagulation and fibrinolysis, thereby attenuating fibrin deposition, or by inhibiting the inflammatory response.

Chapter 2 reports the characterization of an animal model used to study experimental bronchopulmonary dysplasia. In this model premature rat pups are continuously exposed to hyperoxia during the saccular phase of lung development similar to very premature infants at risk for BPD. Differential gene expression profiles were studied with DNA microarray analysis, confirmed by real-time RT-PCR and were in line with histopathology and fibrin deposition studies using Western blotting. This study highlights exciting findings of genes involved in inflammation, coagulation, fibrinolysis, extracellular matrix turnover, cell cycle regulation, signal transduction, and alveolar enlargement. Histopathology after oxygen-induced neonatal lung injury showed a heterogeneous alveolar development due to a decrease in secondary septation, an increase in septal thickness, a massive influx of leukocytes, fibrin deposition, and fibrosis. Additionally, Western blot analysis demonstrated a high magnitude of alveolar fibrin deposition in rat pups with hyperoxia-induced BPD. These findings indicate that the hyperoxia-exposed premature rat pup is an excellent model to investigate and advance the understanding of the pathophysiology of BPD in premature infants. Therefore, this experimental BPD model was used in the other studies of this thesis to explore and develop new treatment options.

Although surfactant insufficiency plays an important role in the pathogenesis of BPD, the spatial and temporal patterns of expression of surfactant proteins are not yet fully established in newborn infants and animal models suffering from BPD. **Chapter 3** describes the spatial and

temporal expression of the four surfactant proteins (SP-A, SP-B, SP-C, and SP-D) and Clara cell secretory protein (CC-10) in the lungs of premature rat pups raised in room air or exposed to hyperoxia. mRNA expression of the surfactant proteins and CC-10 was studied with RT-PCR and in situ hybridization, and protein expression of SP-A, SP-D, and CC10 with immunohistochemistry. Expression of the four surfactant proteins at the mRNA level was high at birth and declined with advancing normal neonatal lung development. Exposure to hyperoxia led to a sharp increase in SP-A, SP-B, and SP-D mRNA levels in the neonatal period. Expression of CC10 mRNA was not affected by neonatal development or exposure to hyperoxia. In situ hybridization and immunohistochemistry demonstrated that the cellular distribution of SP-B, SP-C, SP-D, and CC-10 was similar in normoxia and hyperoxia. In room air SP-A mRNA and protein expression was high in alveolar type 2 cells and low in bronchial Clara cells, but exposure to hyperoxia induced high levels of SP-A expression in bronchial Clara Cells. The increased expression of SP-A during hyperoxia can therefore, at least in part, be attributed to the induction of SP-A mRNA and protein expression in bronchial Clara cells. The expanded role of Clara cells in the defense against hyperoxic lung injury suggests that Clara cells support alveolar type 2 cell function and may play an important role in the supply of surfactant proteins to the lower airways.

Chapter 4 presents the effects of the methylxanthine derivative pentoxifylline, which is a non-specific phosphodiesterase inhibitor, on the development of hyperoxia-induced lung injury in premature rat pups and their survival. Pentoxifylline prolonged the mean survival of premature rat pups exposed to 100% oxygen by 3 days and Western blot analysis showed a 66% reduction in alveolar fibrin deposition. Minor changes in mRNA expression of key genes involved in the pathogenesis of BPD were observed in lung homogenates after pentoxifylline treatment. However, the total protein concentration in bronchoalveolar lavage fluid was decreased by 33% in the pentoxifylline treated rat pups. Therefore, pentoxifylline treatment attenuated alveolar fibrin deposition and prolonged survival in premature rat pups with hyperoxia-induced BPD, probably by reducing capillary-alveolar protein leakage.

Chapter 5 demonstrates the potential of inhaled nitric oxide (iNO) as therapeutic strategy to prevent experimental BPD in rat pups. Premature rat pups were exposed to room air, hyperoxia or a combination of hyperoxia and NO (8.5 and 17 ppm). The anti-inflammatory effects of prolonged iNO therapy were investigated by studying survival, histopathology, fibrin deposition, and differential mRNA expression (*real-time* RT-PCR) of key genes involved in the development of BPD. iNO therapy prolonged median survival by 1.5 days, reduced fibrin deposition in a dosage dependent way up to 4.3-fold, improved alveolar development by reducing septal thickness, and reduced the influx of leukocytes. Analysis of mRNA expression revealed iNO-induced downregulation of genes involved in inflammation, coagulation, fibrinolysis and cell-cycle regulation, and upregulation of a gene involved in alveolar formation. iNO therapy improved lung pathology and prolonged survival by reducing septum thickness, inhibiting inflammation, and

attenuating alveolar fibrin deposition in premature rat pups with experimental BPD.

Chapter 6 not only reviews the exciting findings and limitations of the previous studies, but also discusses the future perspectives to develop new treatment modalities for premature infants with BPD. The use of an animal model greatly increases the possibilities for extensive research, but no model will ever fully represent the human clinical setting. Both the use of specific phosphodiesterase inhibitors and iNO is very promising and suggests a potential role in the therapy of premature infants suffering from RDS and prone to develop BPD. These studies also indicate that interruption of the vicious cycle of inflammation and coagulation in the development of BPD improves the pathophysiology, and more importantly, the morbidity and mortality of premature infants with BPD.

SAMENVATTING

Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift is tweeledig. Ten eerste het karakteriseren van een diermodel voor experimentele bronchopulmonale dysplasie (BPD), dat geschikt is voor interventiestudies. Ten tweede het ontwikkelen van nieuwe en effectievere therapeutische mogelijkheden met minder bijwerkingen in het rattenmodel van door hyperoxie geïnduceerde neonatale chronische longschade, om de morbiditeit en mortaliteit te verminderen in zeer premature kinderen die behandeld worden voor het “respiratory distress syndrome” (RDS) en daarom een verhoogd risico hebben op het ontwikkelen van BPD.

Hoofdstuk 1 beschrijft de klinische presentatie, historie, pathofysiologie en huidige therapeutische mogelijkheden voor BPD, een chronische longaandoening in zeer premature kinderen die behandeld worden voor respiratoire insufficiëntie ten gevolge van RDS. Typische pathologische kenmerken van BPD zijn een verstoorde alveolarisatie en vascularisatie van de onrijpe long. De belangrijke rol van surfactant, ontsteking en stolling in de pathofysiologie van BPD wordt besproken en daarnaast wordt ingegaan op eventuele aanknopingspunten voor nieuwe therapieën. Twee aan elkaar gerelateerde processen die een belangrijke rol spelen in de pathofysiologie van BPD, zijn ontsteking en een verstoorde balans van de stollings- en fibrinolytische cascade, die uiteindelijk leiden tot extravasculaire fibrinedepositie in de long. De focus van dit proefschrift is gericht op de ontwikkeling van nieuwe therapieën voor BPD door de vicieuze cirkel van ontsteking en stolling te doorbreken. Theoretisch kan dit bereikt worden door de verstoorde balans van de stollings- en fibrinolytische cascade te verbeteren, waardoor fibrinedepositie in de long verminderd wordt of door de ontstekingsrespons te remmen.

Hoofdstuk 2 beschrijft de karakterisatie van het rattenmodel voor experimentele BPD. In dit model worden prematuur geboren rattenpups continu blootgesteld aan 100% zuurstof tijdens het sacculaire stadium van longontwikkeling, dat overeenkomt met het longstadium van zeer premature kinderen met een verhoogd risico op het ontwikkelen van BPD. Differentiële gen-expressieprofielen zijn bestudeerd met DNA microarray analyse en bevestigd door middel van RT-PCR en kwamen overeen met histopathologische en fibrinedepositie gegevens. Uit deze analyse bleek dat genen die betrokken zijn bij ontsteking, stolling, fibrinolyse, extracellulaire matrix turnover, celcyclusregulatie, signaaltransductie en alveolaire vergroting differentiëel tot expressie werden gebracht. Blootstelling aan hyperoxie resulteerde in een heterogene alveolaire ontwikkeling door een afname van de secundaire septatie, een toename in alveolaire septumdikte, een grote influx van leukocyten, fibrinedepositie en fibrose. Een forse toename van de fibrinedepositie in de long na blootstelling aan hyperoxie werd bevestigd door middel van kwantitatieve Western blotting. Deze resultaten laten zien dat de aan hyperoxie blootgestelde premature rattenpup een uitstekend model is om de pathofysiologie van BPD in premature neonaten beter te onderzoeken. Daarom is dit experimentele BPD

model in de vervolgonderzoeken in dit proefschrift gebruikt om nieuwe therapieën te ontwikkelen.

Ondanks dat surfactantdeficiëntie een belangrijke rol speelt in de pathogenese van BPD, zijn de spatiële en temporele expressiepatronen van de surfactanteiwitten nog niet volledig bekend in premature kinderen en proefdieren met (experimentele) BPD. In **hoofdstuk 3** wordt de spatiële en temporele expressie beschreven van de vier surfactanteiwitten (SP-A, SP-B, SP-C en SP-D) en Clara cell secretory protein (CC-10) in de longen van premature rattenpups blootgesteld aan kamerlucht en hyperoxie. mRNA expressie van de surfactanteiwitten en CC-10 is bestudeerd met RT-PCR en in situ hybridisatie en eiwitexpressie van SP-A, SP-D en CC-10 met immunohistologische technieken. De expressie van de vier surfactant-eiwitten was hoog bij de geboorte en nam vervolgens af tijdens de normale neonatale longontwikkeling. Blootstelling aan hyperoxie leidde tot een sterke stijging van SP-A, SP-B en SP-D mRNA in de neonatale periode. CC-10 mRNA expressie was niet veranderd tijdens de neonatale periode of na blootstelling aan 100% zuurstof. De cellulaire distributie van SP-B, SP-C, SP-D en CC-10 in de long was gelijk in kamerlucht en hyperoxie in paraffine coupes. Op mRNA- en eiwitniveau was de SP-A expressie hoog in de alveolaire type 2 cellen en laag in de bronchiale Claracellen tijdens de normale neonatale ontwikkeling. Na blootstelling aan hyperoxie steeg de SP-A expressie in bronchiale Claracellen. De toegenomen SP-A expressie tijdens hyperoxie kan deels verklaard worden door een toename in mRNA en eiwit expressie van SP-A door bronchiale Claracellen. De extra rol van Claracellen in de verdediging tegen longschade geïnduceerd door hyperoxie, suggereert dat Claracellen de functie van alveolaire type II cellen kunnen ondersteunen en een belangrijke rol kunnen spelen in de surfactantvoorziening in de alveoli.

In **hoofdstuk 4** worden de effecten beschreven van de niet-specifieke fosfodieësterase remmer pentoxifylline, een methylxanthine derivaat, op de ontwikkeling van hyperoxie-geïnduceerde longschade in premature rattenpups en hun overleving. Pentoxifylline verlengde de gemiddelde overleving van rattenpups blootgesteld aan 100% zuurstof, met gemiddeld 3 dagen en resulteerde in een 66% vermindering van de pulmonale fibrinedepositie, gekwantificeerd met behulp van de Western blot-techniek. Bij de analyse van sleutelgenen betrokken bij de pathogenese van experimentele BPD op mRNA niveau werden slechts marginale verschillen waargenomen na behandeling met pentoxifylline. De totale eiwitconcentratie in bronchoalveolair lavagevocht was verminderd met 33% in de met pentoxifylline behandelde rattenpups. Pentoxifyllinebehandeling leidde tot een vermindering van de alveolaire fibrinedepositie en een verlenging van de overleving in premature rattenpups met experimentele BPD en kan mogelijk verklaard worden door vermindering van capillaire alveolaire lekkage.

In **hoofdstuk 5** wordt de rol van inhalatie "nitric oxide" (iNO) als therapie in experimentele BPD onderzocht. Premature rattenpups werden blootgesteld aan kamerlucht, hyperoxie of een combinatie van hyperoxie en een klinisch relevante dosis NO (8,5 en 17 ppm). De anti-inflammatoire effecten van iNO therapie werden bestudeerd aan de hand van overleving,

histopathologie, fibrinedepositie en differentiële mRNA expressie (real-time RT-PCR) van sleutelgenen in de ontwikkeling van BPD. iNO therapie verlengde de mediane overleving met 1,5 dagen, verminderde fibrinedepositie dosisafhankelijk met maximaal een factor 4,3, verbeterde de alveolaire ontwikkeling door middel van een vermindering van de dikte van de alveolaire septa en een verminderde influx van leukocyten. Analyse van de mRNA expressie data resulteerde in een differentiële expressie van genen betrokken bij ontsteking, stolling, fibrinolyse, celcyclusregulatie en alveolaire vergroting. iNO therapie verbeterde longpathologie en verlengde de overleving door een vermindering van de dikte van de alveolaire septa, remming van de ontstekingsrespons en vermindering van de fibrinedepositie in premature rattenpups met experimentele BPD.

Hoofdstuk 6 behandelt de interessante resultaten en de beperkingen van het gepresenteerde onderzoek. Tevens worden de toekomstmogelijkheden geëxploreerd voor de ontwikkeling van nieuwe therapeutische mogelijkheden voor premature neonaten met BPD. Het gebruik van een diermodel voor BPD vergroot de mogelijkheden voor uitgebreid onderzoek, maar zal nooit de humane klinische setting volledig kunnen evenaren. Zowel het gebruik van fosfodiesteraseremmers en iNO zijn veelbelovende nieuwe therapeutische mogelijkheden en zouden misschien in de toekomst een rol kunnen spelen in de behandeling van premature neonaten met RDS en een verhoogde kans op de ontwikkeling van BPD. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift suggereert dat interruptie van de vicieuze cirkel van ontsteking en stolling in BPD de morbiditeit en mortaliteit van premature neonaten met BPD kan verbeteren.