Universitätsklinikum Ulm

Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin

Sektionsleiter: PD Dr. med. H. Hummler

Der Einfluss von Östradiol und Progesteron auf die Nasenpotenzialdifferenz von Frühgeborenen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät

der Universität Ulm

Aileen Winkler

Neu-Ulm

2006

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin
1. Berichterstatter:	PD Dr. Ulrich Thome
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Paul Dietl
Tag der Promotion:	24. November 2006

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis **3**

Abkürzungsverzeichnis **5**

1 Einleitung **7**

2 Material und Methoden **13**

2.1 Ethische Begutachtung 13

2.2 Kriterien der Probandenauswahl 13

2.3 Ablauf der Studie 13

2.4 Zusammensetzung der Studienemulsionen 14

2.5 Zeitraum der Applikation der Studienemulsionen 14

2.6 Zielkriterien 15

2.6.1 Primäres Zielkriterium: Amilorid-sensitive Nasenpotenzialdifferenz 15

2.6.2 Sekundäre Zielkriterien 15

2.7 Messung der Nasenpotenzialdifferenz 17

2.8 Verwendete Lösungen 22

2.9 Auswertung der Messdaten 23

2.10 Statistische Berechnungen 28

3 Ergebnisse **31**

3.1 Vergleich der Studiengruppen 31

3.2 Applikation der Studienemulsionen 32

3.3 Primäres Zielkriterium: Amilorid-sensitive Nasenpotenzialdifferenz 35

3.4 Sekundäre Zielkriterien 37

3.4.1 Nasenpotenzialdifferenz 37

3.4.2 Amilorid-sensitiver Anteil der Nasenpotenzialdifferenz in % 38

3.4.3 Bronchopulmonale Dysplasie 38

3.4.4 Mortalität 42

3.4.5 Hirnblutung 42

3.4.6 Extubationstag 42
3.4.7 Tag der letzten Sauerstoffgabe 43
3.4.8 Oxygenierungsindex 44

4 Diskussion **46**
4.1 Vergleich der Ergebnisse 46
4.2 Der ENaC und sein Zusammenhang mit der Potenzialdifferenz 48
4.3 Messmethodik 51
4.4 Medikamente 54
4.4.1 Östradiol und Progesteron 54
4.4.2 Amilorid 58
4.5 Epithel der Nase und der tieferen Atemwege 60
4.6 Schlussfolgerung 61

5 Zusammenfassung **62**

Literaturverzeichnis **64**

Anhang **74**

Abbildungsverzeichnis **87**

Tabellenverzeichnis **88**

Danksagung **89**

Abkürzungsverzeichnis:

Aisnpd	Amilorid-insensitive Nasenpotenzialdifferenz
AQP	Aquaporin
Asnpd	Amilorid-sensitive Nasenpotenzialdifferenz
AV-Kanal	atrioventrikulärer Septumdefekt
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
c	Konzentration
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CF	Cystische Fibrose
CFTR	cystic fibrosis transmembrane regulator
CPAP	kontinuierlich positiver Atemwegsdruck
D	Diffusionskoeffizient
E2	17β-Östradiol
ED_{50}	Dosis der Häufigkeitsverteilungskurve, bei der in 50% der Fälle eine Wirkung eintritt
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENaC	epithelialer Natriumkanal
FiO_2	inspiratorischer Sauerstoffanteil der Beatmungsluft
FSH	follikelstimulierendes Hormon
HFOV	Hochfrequenzoszillationsventilation
I_{sc}	Kurzschlussstrom
I_{Amil}	Amilorid-sensitiver Anteil des Kurzschlussstroms
i. m.	intramuskulär
i. v.	intravenös
IMV	intermittierend mandatorische Ventilation
IUGR	intrauterine Wachstumsretardierung
IVH	intraventrikuläre Hämorrhagie
LH	luteotropes Hormon
Lp	Löslichkeitsprodukt
MAP	Atemwegsmitteldruck

mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
n	Anzahl
Na-pH	Nabelarterien-pH
NP	Nasenpotenzialdifferenz
Null	Potenzialänderung der Ag^+/AgCl - Halbzelle
OI	Oxygenierungsindex
O_2	Sauerstoff
P	Progesteron
P_{25}	25%-Perzentile
P_{75}	75%-Perzentile
P_{O_2}	Sauerstoffpartialdruck
P_{CO_2}	Kohlendioxidpartialdruck
PD	Potenzialdifferenz
PEEP	positiv-endexspiratorischer Druck
PIP	inspiratorischer Maximaldruck
r	Korrelationskoeffizient
RDS	respiratory distress syndrome
relPD	Amilorid-sensitiver Anteil der Nasenpotenzialdifferenz in %
RM-ANOVA	Varianzanalyse für wiederholte Messungen
ROC	receiver operating characteristics-Kurven
s	Standardabweichung
SSW	Schwangerschaftswoche
t	Zeit
T	Temperatur
TRH	Thyrotropin-releasing Hormon
u	Ionenmobilität
$\bar{x}$	Mittelwert
$\widetilde{x}$	Median
z	Ladung

1 Einleitung

Frühgeborene leiden häufig am Atemnotsyndrom, auch Krankheit der hyalinen Membranen genannt. Es äußert sich schon bald nach der Geburt mit zunehmender Dyspnoe, sternalen und interkostalen Einziehungen und Zyanose und beruht auf einem Mangel an oberflächenaktivem Surfactant [6]. Bei Substitution dieses Mangels [69] verbessert sich zwar die Lungenfunktion und Oxygenierung, aber viele kleine Frühgeborene bleiben weiterhin atemninsuffizient, so dass Surfactant-Mangel nicht die alleinige Ursache der Ateminsuffizienz sein kann.

Pränatal sezerniert das fetale Lungenepithel aktiv Flüssigkeit, was für das Lungenwachstum von großer Bedeutung ist [1, 43, 44]. Die Na^+, K^+-ATPase in der basolateralen Membran schafft einen extrazellulär-intrazellulären Na^+-Gradienten, der den ebenfalls basolateral gelegenen Na^+, K^+, $2Cl^-$-Cotransport antreibt. Dieser Cotransporter bringt Chlorid in die Zellen. Mit dem K^+, das die Zelle durch K^+-Kanäle in der basolateralen Membran verlässt, und dem Na^+ , welches durch die Na^+, K^+-ATPase nach extrazellulär transportiert wird, verlassen positive Ladungen die Zelle, so dass intrazellulär negative Ladungen im Überschuss vorliegen. Angetrieben hierdurch verlässt Cl^- die Zelle in Richtung Lumen, da es nur in der apikalen Membran die entsprechenden Transportkanäle gibt. Na^+ und Wasser folgen entsprechend dem elektrochemischen bzw. osmotischen Gradienten, so dass Flüssigkeit ins Lumen sezerniert wird (Abbildung 1) [49].

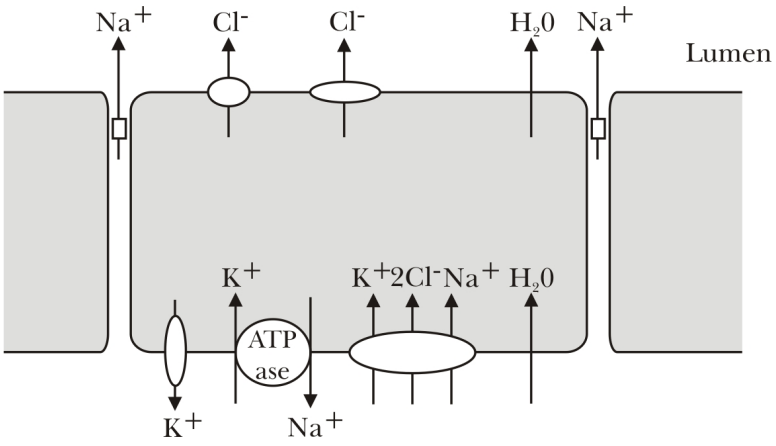

Abbildung 1: Pränatale Flüssigkeitssekretion des Lungenepithels

Für den Gasaustausch nach der Geburt ist es notwendig, dass in der Lunge eine Umstellung von Flüssigkeitssekretion zu Flüssigkeitsabsorption stattfindet. Die Sauerstoffaufnahme ist ein Diffusionsvorgang, so dass die Oxygenierung von der Länge der Diffusionsstrecke abhängig ist. Je weniger Flüssigkeit in den Alveolen vorhanden ist, desto kürzer die Diffusionsstrecke und desto effizienter der Gasaustausch. Die Entfernung der Flüssigkeit erfolgt durch aktiven Na^+-Transport vom Lumen in das Interstitium. Wasser folgt entsprechend dem osmotischen Gradienten und wird zusammen mit dem Na^+ aus dem Interstitium weiter über Blutgefäße abtransportiert.

Der lumenseitige Eintritt von Na^+ erfolgt durch Na^+- durchlässige Kanäle in der apikalen Membran. Die treibende Kraft liefert auch hier die Na^+, K^+-ATPase in der basolateralen Membran, die das Na^+ vom Zellinneren in das Interstitium transportiert. Bei den in der apikalen Membran befindlichen Na^+-Kanälen handelt es sich hauptsächlich um den epithelialen Natriumkanal (ENaC), der aus drei Untereinheiten (α, β, γ) besteht. Dieser kann durch Amilorid, einem Cycloamidin-Derivat, welches aufgrund seiner Wirkung auf renale ENaC als Diuretikum eingesetzt wird, blockiert werden. Das K^+ verlässt die Zelle über basale K^+-Kanäle. Cl^- und Wasser folgen, so dass es zu einer Flüssigkeitsverschiebung vom Lumen in das Interstitium kommt (Abbildung 2) [49].

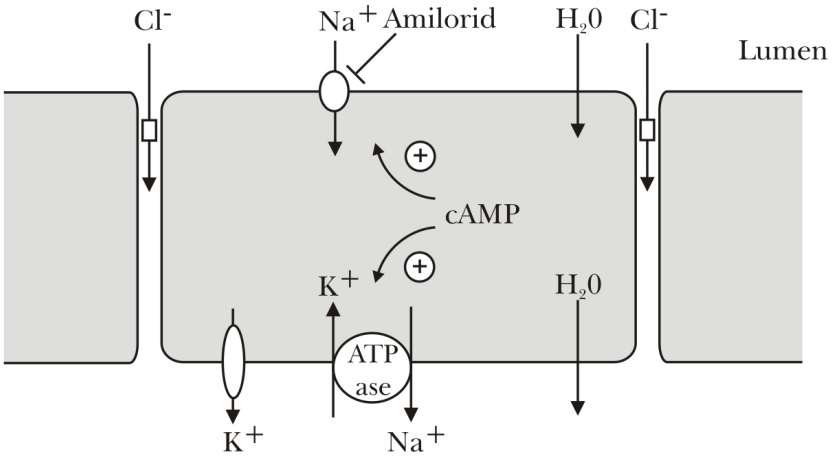

Abbildung 2: Postnatale Flüssigkeitsabsorption des Lungenepithels

Die Permeabilität der Zellmembran für Wasser wird durch Aquaporine (AQP) verbessert, die im mikrovaskulären Endothel (AQP 1), in der basolateralen Membran des respiratorischen Epithels (AQP 4) bzw. in der apikalen Membran von Alveolarzellen Typ I (AQP

5) lokalisiert sind [61]. Allerdings ändert sich die Flüssigkeitsabsorption in Aquaporin-knock-out-Experimenten nicht [40] und eine Deletion von AQP führt zu keiner signifikanten Änderung der wet-to-dry-ratio in der Mäuselunge [70]. Folglich sind Aquaporine nicht für die Flüssigkeitsclearance in der Lunge von Neugeborenen erforderlich [61] und Wasser folgt auch auf anderen Wegen dem osmotischen Gradienten.

Dagegen ist der ENaC essentiell: Mäuse, die kein funktionstüchtiges Gen für αENaC besaßen, hatten einen erhöhten Wassergehalt der Lunge und verstarben innerhalb von 40 Stunden nach der Geburt an respiratorischer Insuffizienz [27]. Hemmung des ENaC durch intratracheale Applikation von Amilorid bei Meerschweinchen führte zu Atemnot, Hypoxie und einem erhöhten extrazellulären Flüssigkeitsgehalt der Lunge [47].

Der αENaC mRNA-Gehalt von Rattenlungen nimmt mit steigendem Gestationsalter zu [48]. Aldosteron [42], Glukokortikoide [7] und eine Kombination von Glukokortikoiden und TRH [48, 76] steigern den αENaC - Gehalt. Die rund um den Zeitpunkt der Geburt notwendige Umstellung der Alveolarzelle von Flüssigkeitssekretion zu -absorption ist abhängig vom cAMP-Gehalt der Zelle und wird durch Adrenalin [12] beschleunigt. Dieser Effekt kann experimentell auch durch Terbutalin [42] hervorgerufen werden. Neugeborene, die in den letzten 2 Stunden vor der Geburt per primärer Sectio Terbutalin über den mütterlichen Kreislauf erhielten, hatten eine höhere Compliance der Lunge und einen verringerten Atemwegswiderstand als Neugeborene der Kontrollgruppe [13]. Die Compliance der Lunge hängt vom Wassergehalt der Lunge ab und wird durch Surfactant als auch durch Diuretika verbessert [14]. Daher verbessert eine Steigerung der Flüssigkeitsresorption über ENaC die Compliance der Lunge [14, 22].

Der ENaC-Gehalt in Zellkulturen war abhängig vom Sauerstoffpartialdruck [54, 57, 77, 86]. Unter Hyperoxie-Exposition kam es zu einer anschließenden Steigerung des aktiven Na^+-Transport in der Rattenlunge [50]. Der Na^+-Transport und der damit verbundene Flüssigkeitstransport kann durch Amiloridinstillation in die Rattenlunge nach der Hyperoxiephase reduziert werden [73], was auf eine Beteiligung des ENaC hinweist. Die Abhängigkeit der Aktivität des Na^+-Kanals vom Sauerstoffpartialdruck lässt sich auch über den physiologischen Effekt des Ionenkanals aufzeigen. Denn durch den Transport von Na^+- Ionen werden positive Ladungen aus dem Lumen abtransportiert, so dass ein lumen -

negatives Potenzial entsteht. Dieses durch aktiven Ionen-Transport verursachte elektrische Potenzial ist in Ussing Kammern messbar und nach Kultivierung in 20% O_2 signifikant höher als nach Hypoxie [77].

Aufgrund der geringen Größe der Alveolen ist das Potenzial des Lungenepithels in vivo technisch nicht zugänglich. Ein durch Ionen-Transport verursachtes Potenzial kann jedoch an der Nasenschleimhaut, die sich ähnlich wie das Epithel in der Lunge verhält, gemessen werden, was Rückschlüsse auf die Ionen-Transportvorgänge in den tieferen Atemwegen zulässt [34].

Die Messung der nasalen transepithelialen elektrischen Potenzialdifferenz [30] wurde zunächst zur Diagnose der Mukoviszidose (Cystische Fibrose, CF) [2] eingesetzt. Bei CF ist die Nasenpotenzialdifferenz stark überhöht, da bei fehlendem CFTR dessen inhibitorische Wirkung auf den ENaC entfällt [11] und Natrium vermehrt absorbiert wird.

Bei gesunden Individuen tragen Na^+-Absorption und Cl^--Sekretion zur gesamten Nasenpotenzialdifferenz bei. Um die beiden Komponenten zu trennen, wird die Messung in Anwesenheit von Amilorid wiederholt. Dieses blockiert den ENaC und führt bei lokaler Anwendung in der Nase zu einem Rückgang des Potenzials. Die Differenz der gemessenen Potenziale vor und nach Applikation von Amilorid wird als „Amilorid-sensitiver Anteil der Nasenpotenzialdifferenz“ bezeichnet. Er entspricht dem Anteil des durch den ENaC erfolgten Transports am Gesamtpotenzial. Der Amilorid-insensitive Anteil setzt sich aus Na^+-Absorption durch bisher nicht näher charakterisierte Amilorid-insensitive Na^+-Kanäle und Cl^--Sekretion zusammen. Weil es keinen vollständig effektiven und selektiven Blocker für den Cl^--Transport gibt, konnte dieser Anteil am Nasenpotenzial bisher nicht gut untersucht werden.

Die Amilorid-sensitive Nasenpotenzialdifferenz ist abhängig vom Gestationsalter [8]. Außerdem haben Frühgeborene, die ein Atemnotssyndrom entwickeln, am ersten Lebenstag ein weniger negatives Nasenpotenzial sowie eine geringere Amilorid-sensitive Potenzialdifferenz als lungengesunde Frühgeborene [8]. Der Amilorid-insensitive Anteil ist unverändert [8]. Parallel zur Verbesserung der Atmung erreichen die Nasenpotenzialdifferenz und der Amilorid-sensitive Anteil die Werte von gesunden Neugeborenen [8]. Reifgeborene mit transitorischer Tachypnoe, deren Ursache ein erhöhter Wassergehalt der Lunge bei verzöger-

ter Flüssigkeitsabsorption ist, hatten einen verringerten Amilorid-sensitiven Potenzialanteil [19], was nahe legt, dass das nasale Potenzial ein geeigneter Parameter für den pulmonalen Na^+-Transport sein könnte.

Ferner lassen diese Ergebnisse folgern, dass Früh- und Neugeborene mit respiratorischer Insuffizienz eine suboptimale alveoläre Na^+-Absorption haben und somit von Maßnahmen, die den Na^+-Transport steigern, profitieren könnten. Tierexperimente deuten auf eine mögliche Rolle von Östrogen und Progesteron hin: Untersuchungen von Sweezey et al. [72] an Ratten zeigten, dass der Gehalt von αENaC in Lungen von männlichen Ratten geringer war als der von weiblichen. Nichtschwangere weibliche Ratten hatten die höchsten Konzentrationen von αENaC. Der βENaC - Gehalt hing vom Zyklus ab. Für die γENaC-Untereinheit konnte kein Zusammenhang mit dem Hormonzyklus gefunden werden. Kombinierte Gabe von Progesteron (P) und 17β-Östradiol (E2) steigerte die Expression von αENaC, nicht aber die getrennte Verabreichung der Hormone. Für βENaC ergab sich sogar ein Abfall der Konzentration bei alleiniger Gabe eines der beiden Hormone.

Des Weiteren wurde an kultivierten Lungenepithelien nach fünftägiger Inkubation mit Östradiol- und Progesteronhaltiger Lösung eine dosisabhängige Zunahme des Amilorid-sensitiven Kurzschlussstroms beobachtet, verbunden mit einem Anstieg des αENaC - mRNA - Gehalts [72].

Östrogen und Progesteron werden in der Schwangerschaft von der Plazenta in steigenden Mengen gebildet. Die Hormone erreichen dabei im Blut der Mutter um ein Vielfaches höhere Konzentrationen als bei nicht schwangeren Frauen, und auch im Blut des Feten können die ansteigenden Hormonkonzentrationen gemessen werden [25]. Nach der Geburt kommt es innerhalb eines Tages zu einem Konzentrationsabfall beider Steroide um den Faktor 10-100 bei Mutter und Kind [66], so dass bei Frühgeborenen die Plasmakonzentrationen von Östrogen und Progesteron einige Wochen lang geringer sind, als sie gewesen wären, wenn das Kind in utero verblieben und termingerecht geboren worden wäre. Dies gibt Anlass zu der Vermutung, dass der vorzeitige Entzug von Östrogen und Progesteron pathophysiologisch bedeutsam und eine Substitution der Hormone sinnvoll sein könnte.

Shanklin et al. zeigten erstmalig 1970, dass eine postnatale Injektion von konjugierten Östrogenen die Mortalität, die Morbidität und die Inzidenz des Atemnotssyndroms der

Frühgeborenen senkt [64].

In einer randomisierten Doppelblindstudie an 30 Frühgeborenen wurde die Hälfte der Frühgeborenen so mit Östradiol und Progesteron substituiert, dass die Serumspiegel etwa denen vor der Geburt entsprachen. Keines der substituierten Kinder entwickelte eine chronische Lungenerkrankung (BPD), wohingegen dies bei vier Frühgeborenen der Kontrollgruppe der Fall war [80]. Dieser Unterschied war zwar statistisch nicht signifikant, könnte jedoch ein erster Hinweis auf eine Verbesserung der Lungenfunktion durch E2 und P sein, so dass eine weitere Studie zur Überprüfung dieser Hypothese begonnen wurde.

Der Mechanismus, wie Östrogen und Progesteron die Inzidenz der BPD verringern, ist unklar. Denkbar wären ein positiver Einfluss von E2 und P auf den epithelialen Na^+-Transport und damit den Wassergehalt der Lunge, eine gesteigerte Surfactant-Produktion [31, 78], gesteigerte Alveolarisierung [32] oder eine antiinflammatorische Wirkung. Falls Östrogen und Progesteron die Lungenfunktion über eine Steigerung des epithelialen Na^+-Transportes verbessern, dann müsste sich ein höheres Amilorid-sensitives Nasenpotenzial substituierter im Vergleich zu placebo-behandelten Frühgeborenen einstellen. Ziel der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Studie war, diese Hypothese zu testen, und den Einfluss einer Substitution von Östradiol und Progesteron auf die Nasenpotenzialdifferenz von Frühgeborenen zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Ethische Begutachtung

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Ulm geprüft und befürwortet. Das Einverständnis beider Eltern lag jeweils vor dem Beginn der Maßnahmen vor.

2.2 Kriterien der Probandenauswahl

In die Studie eingeschlossen wurden männliche und weibliche Frühgeborene, die vor Vollendung der 29. Schwangerschaftswoche geboren wurden, bei Geburt leichter als 1000g waren und in den ersten 12 Lebensstunden intubiert und beatmet werden mussten. Als Ausschlusskriterien galten das Fehlen der Einverständniserklärung der Eltern, Missbildungen, Störungen und Anomalien, die die Gonaden und innere Geschlechtsorgane selbst oder die sie steuernden Hormone betreffen (z. B. Gonadendys- und agenesien, kongenitale Nebennierenrindenhyperplasie, etc.), Chromosomenanomalien, angeborene Fehlbildungen, die sich auf die Lungenfunktion auswirken könnten (Lungenfehlbildungen, Zwerchfellhernie, Gastroschisis, Oligo- oder Anhydramnion bereits vor der 20. Schwangerschaftswoche), Herzvitien mit hämodynamischer Relevanz (z. B. Pulmonal-, Trikuspidalklappenatresie, hypoplastisches Linksherz, kompletter AV-Kanal, Fallot´sche Tetralogie, kritische Aortenisthmusstenose, etc.). Ein offener Ductus arteriosus Botalli oder ein hämodynamisch nicht bedeutsamer Vorhof- bzw. Ventrikelseptumdefekt waren keine Ausschlusskriterien.

2.3 Ablauf der Studie

Wenn ein Frühgeborenes innerhalb der ersten zwölf Lebensstunden intubiert werden musste, wurde es bei Vorliegen der Einwilligung der Eltern zufällig der Hormon-substituierten oder der Placebo-Gruppe zugeordnet. Die Hormone enthaltende Lipidemulsion bzw. die Lipidemulsion (Placebo) erhielt das Frühgeborene dann als Dauerinfusion in einer Menge von 15ml/kg/Tag.

2.4 Zusammensetzung der Studienemulsionen

Die Placeboemulsion und die 17β-Östradiol (E2, östra-1,3,5(10)-triene-3,17β-diol, Fa. Synopharm, Hamburg) - Progesteron (P, pregn-4-ene-3,20-dione, Fa. Synopharm, Hamburg) - Emulsion wurden von der Klinikumsapotheke bereitgestellt.

- Placebo-Emulsion:
  Intralipid® 20% (Fa. Kabi-Pharmacia, Erlangen) wurde mit Aqua ad injectabila auf 5% Fettgehalt verdünnt.

- E2-P-haltige Emulsion:
  0,165 mg/ml kristalloides 17β-Östradiol sowie 1,5 mg/ml Progesteron wurden in Lipofundin® 20% (Fa. BBraun, Melsungen) gelöst, welches mit Aqua ad injectabila auf einen Fettgehalt von 5% verdünnt worden war. Bei einer Infusion von 15 ml/kg/Tag resultieren dann 2,5 mg/kg E2 sowie 22,5 mg/kg P pro Tag.

Diese Dosis wurde aufgrund früherer Studien [81] so gewählt, um E2-/P-Konzentrationen im Plasma zu erzielen, die denen in utero nahe kommen. Im Alter von 28 - 40 Schwangerschaftswochen wurden E2-Plasmakonzentrationen zwischen 2000 und 17000 pg/ml in der Nabelvene bzw. zwischen 2000 und 7000 pg/ml in der Nabelarterie gemessen [25, 26, 29, 74]. Die Progesteron-Plasmaspiegel lagen bei 200-1700 ng/ml in der Nabelvene bzw. 100-1200 ng/ml in der Nabelarterie [24, 63, 66]. Angestrebt war deshalb, eine E2-Plasmakonzentration von 2000-6000 pg/ml (7,34-22,03 nmol/l) und eine P-Plasmakonzentration von 300-600 ng/ml (0,95-1,91 μmol/l) zu erreichen.

2.5 Zeitraum der Applikation der Studienemulsionen

Die Applikation erfolgte über mindestens 14 und maximal 28 Tage und wurde beendet, wenn

- ein intravenöser Zugang nicht länger indiziert war, oder
- das Kind in eine andere Klinik verlegt wurde, oder
- eine Hypertriglyzeridämie von > 3,0 mmol/l vorlag, die trotz Absetzen von jeder anderen parenteralen Fettzufuhr über länger als 12 Stunden bestand.

2.6 Zielkriterien

2.6.1 Primäres Zielkriterium: Amilorid-sensitive Nasenpotenzialdifferenz

Primäres Zielkriterium war die an den Lebenstagen 1, 3, 5 und 7 gemessene transepitheliale Amilorid-sensitive Nasenpotenzialdifferenz (Asnpd). Diese kann durch Subtraktion des Amilorid-insensitiven Anteils der Nasenpotenzialdifferenz von der maximal negativen Nasenpotenzialdifferenz berechnet werden.

2.6.2 Sekundäre Zielkriterien

Gesamte Nasenpotenzialdifferenz

Relativer Amilorid-sensitiver Anteil der Nasenpotenzialdifferenz (relPD):
Die relative Änderung der Nasenpotenzialdifferenz zwischen der Perfusion mit Ringerlösung und der Perfusion mit Amilorid-Ringerlösung gibt an, welcher Anteil der Nasenpotenzialdifferenz auf den Ionen-Transport der Amilorid-sensitiven Natriumkanäle zurückzuführen ist und berechnet sich mit relPD = Asnpd/NP.

Bronchopulmonale Dysplasie:
Die Diagnose Bronchopulmonale Dysplasie (BPD) wurde gestellt, wenn eine Versuchsperson in einem postmenstruellen Alter von 36 Wochen eine zusätzliche Sauerstoffzufuhr von mehr als 30 Minuten benötigte, um Sauerstoffsättigungen von 90%, gemessen an der rechten Hand, zu erreichen.

Beobachtungsparameter:
Dokumentiert wurden bei jeder Nasenpotenzialmessung folgende klinische Parameter der Kinder:

- Applikation der E2-P - Emulsion
- Gabe von Glukokortikoiden (Hydrocortison) oder Surfactant, ggf. die Menge
- Spezifische Parameter der Beatmung (PIP (inspiratorischer Maximaldruck), PEEP (positiv-endexspiratorischer Druck), MAP (Atemwegsmitteldruck), Frequenz, Oszil-

lationsamplitude, FiO_2 (Sauerstoffanteil der Beatmungsluft), OI (Oxygenierungsindex, OI = FiO_2 · MAP / P_{O_2})) je nach Beatmungsart (IMV (intermittierend mandatorische Ventilation), HFOV (Hochfrequenzoszillationsventilation), Rachen-CPAP (kontinuierlich positiver Atemwegsdruck))

- Ort des maximal negativen Potenzials (gemessen als Länge des in die Nase eingeführten Teils des Katheters), Beginn der Messaufzeichnung, Startzeitpunkt der nasalen Perfusion mit Amilorid-Ringerlösung, Ende der Messaufzeichnung
- Gegebenenfalls Auffälligkeiten des Kindes

Im Verlauf wurden folgende Daten erhoben:

- Extubationstag sowie Tag der Beendigung der CPAP-Atemunterstützung
- Tag der letzten Sauerstoffgabe
- Diagnose einer Hirnblutung (intraventrikuläre Hämorrhagie, IVH) Grad III (intraventrikuläre Blutung mit Ventrikeldilatation [53]) oder Grad IV (intraventrikuläre Blutung mit Blutung ins Hirnparenchym [53])

Zur Charakterisierung der beiden Studiengruppen wurden außerdem von den Kindern folgende Parameter notiert:

- Geschlecht
- Gestationsalter
- Geburtsgewicht und damit Feststellung einer intrauterinen Wachstumsretardierung (IUGR), definiert als ein Geburtsgewicht unter der 10. Perzentile
- Geburtsmodus (Sectio oder Spontangeburt)
- Vorliegen eines vorzeitigen Blasensprungs
- Nabelarterien-pH, APGAR, Durchführung der pränatalen Betamethason-Therapie zur Induktion der Lungenreifung

Plasmakonzentrationen von E2 und P:

Die Plasmakonzentrationen von E2 und P wurden am 1., 3. und 7. Lebenstag mittels Radioimmunoassay (17β-Estradiol ^{125}I RIA Kit, Progesteron ^{125}I RIA Kit, Costa Mesa, CA) vom endokrinologischen Labor der Universitäts-Frauenklinik Ulm aus 100 μl EDTA-Plasma bestimmt.

2.7 Messung der Nasenpotenzialdifferenz

Die Messung der Nasenpotenzialdifferenz wurde, wenn nicht medizinische Gründe dagegen sprachen, in den ersten 24 Stunden, am dritten, fünften und siebten Lebenstag durchgeführt, jedoch wurde den Kindern nach der Geburt zunächst eine mehrstündige Erholungsphase eingeräumt. Die folgenden drei Messungen wurden dann mit etwa 48-stündigem Abstand vorgenommen. Die Messung der Nasenpotenzialdifferenz wurde auch dann durchgeführt, wenn die Applikation der Studienemulsion abgebrochen worden war, um die Effekte des Absetzens der Hormonemulsion zu beobachten. Das Absetzen der Hormone enthaltenden Emulsion müsste einen ähnlichen Effekt auf die Nasenpotenzialdifferenz haben, wie der postnatale Hormonabfall im Blut von Patienten, die hormonfreie Emulsion erhalten.

Die Messmethode wurde in der Literatur vielfach beschrieben [8, 18, 19, 30, 34], der zunächst verwendete Messaufbau ist in Abbildung 3 dargestellt.

Als Elektroden dienten sterile chlorierte Silberdrähte, entsprechend Ag^+/AgCl - Halbzellen. Die Messelektrode wurde in eine Zuspritzleitung (Medex Medical, Grossbritannien) eingestochen. Diese war über eine Leitung (Original Perfusor®-Leitung, 150 cm, Fa. Braun) mit einer Spritze (Plastipak Sterile Syringe, Becton-Dickinson Drogheda, Ireland), die als Reservoir für die Perfusion diente, einerseits und über zwei Drei-Wege-Hähne (Discofix, Fa. Braun) mit einem 5 Ch - Nabelgefäßkatheter, der im Folgenden als Nasenkatheter bezeichnet wird, andererseits verbunden. Das gesamte System war mit steriler Ringerlösung (in mmol/l: Na^+ 147,2; K^+ 4; Ca^{2+} 2,25; Cl^- 155,7) gefüllt und wurde mit 5 ml/h perfundiert. Die Referenzelektrode wurde in eine zweite ebenfalls mit steriler Ringerlösung gefüllte Zuspritzleitung eingestochen, die zunächst zur Nullkalibrierung des gesamten Messaufbaus über einen der Drei-Wege-Hähne an die erste Leitung angeschlossen wurde. Die außerdem benötigte sterile Amilorid-Ringerlösung wurde in eine Spritze und eine Perfusorleitung

gefüllt und an dem verbliebenen Drei-Wege-Hahn an das System angeschlossen. Die Silber-/Silberchloridelektroden wurden mit einem hochohmigen Messverstärker verbunden (Iso-DAM, Isolated Biological Amplifier, World Precision Instruments, Inc. Sarasota, Florida, USA). Die Digitalisierung der Messwerte erfolgte mit einem Digitalmultimeter (Voltcraft® M3850 Digitalmultimeter, Conrad Electronic GmbH, Klaus-Conrad-Straße 1, 92240 Hirschau), Abtastrate 1,45 Hz, das über ein serielles Kabel an ein Notebook angeschlossen war. Die Daten wurden mit dem Programm *Digiscope*® (Version 1.00, Conrad Electronic) aufgezeichnet.

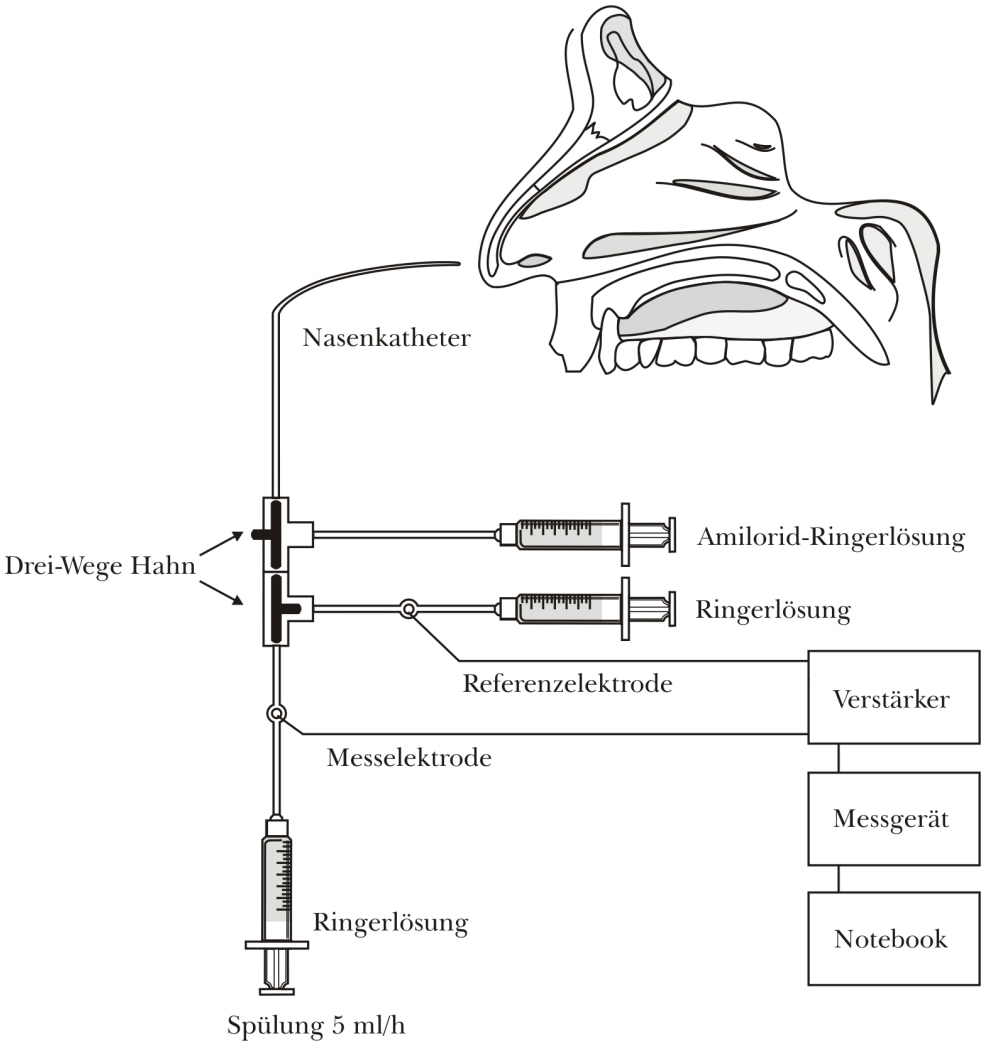

Abbildung 3: Messaufbau, Nullwertkalibrierung

Weil das Potenzial der Ag^{+}/AgCl - Halbzellen temperaturabhängig ist, musste der Messauf-

bau erst von Raum- bzw. Kühlschranktemperatur auf Inkubatortemperatur erwärmt werden. Erst nachdem sich das Potenzial stabilisiert hatte, wurde die Kalibrierung (Aufbau hierzu siehe Abbildung 3) beendet und mit der Messung begonnen.

Dazu wurde die Referenzelektrode dekonnektiert und an eine Infusion des Patienten angeschlossen (Abbildung 4).

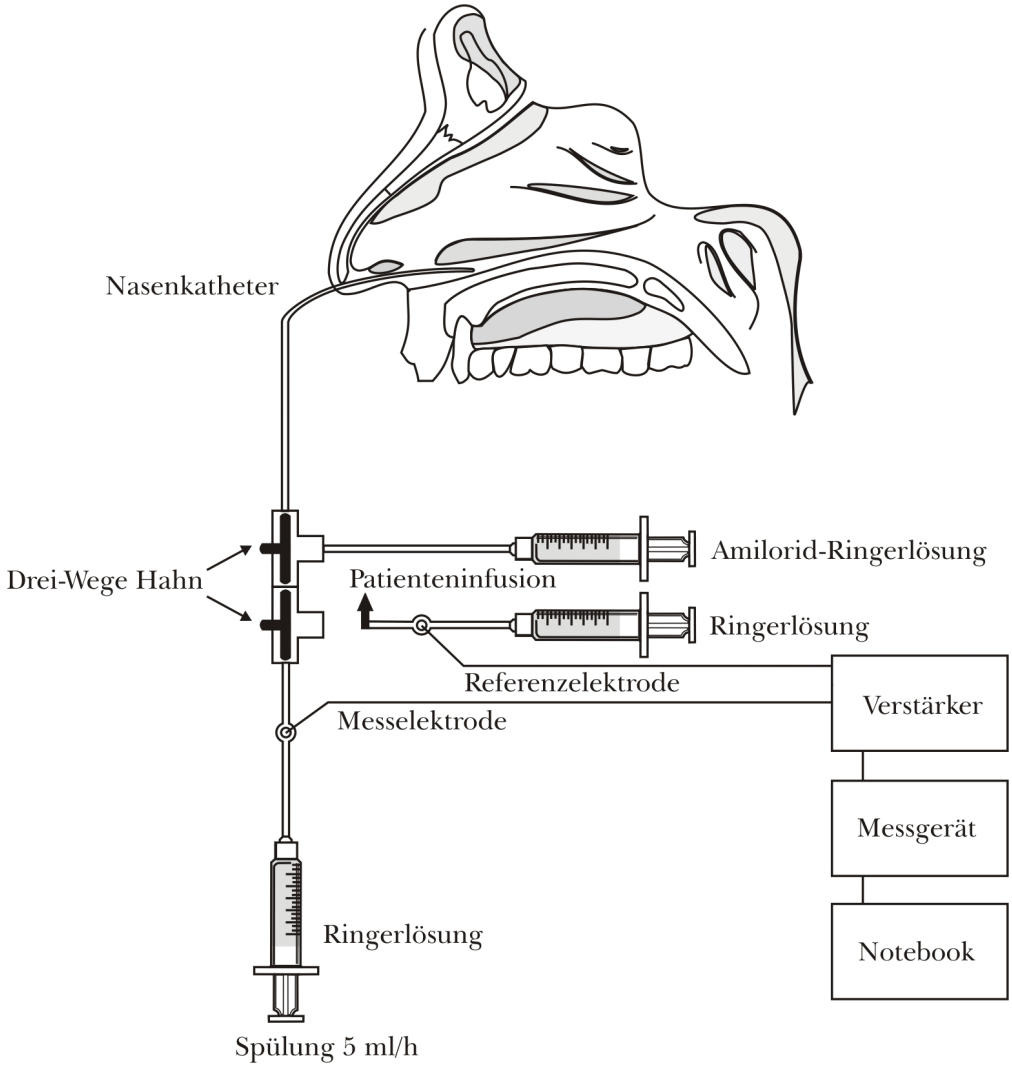

Abbildung 4: Messaufbau bei der Messaufzeichnung

Aufgrund der in der menschlichen Haut lokalisierten Schweißdrüsen hat die Haut des Menschen im Gegensatz zu der von Nagetieren ein von Null verschiedenes Potenzial. Um einen systematischen Fehler zu vermeiden, muss die Referenzelektrode daher perkutan ange-

schlossen werden. In der Literatur wird eine subkutane und eine intravenöse Anbringung der Referenzelektrode beschrieben [19, 71]. Um Schmerzen zu vermeiden, wurde die Referenzelektrode an einen bereits vorhandenen arteriellen oder venösen Katheter angeschlossen. Die Auswahl des verwendeten Katheters erfolgte, da ein möglichst geringer elektrischer Widerstand für die Messung benötigt wurde, in folgender Rangfolge: Nabelarterienkatheter, periphere Arterienkanüle, peripherer venöser Zugang, zentraler Venenkatheter. Der elektrische Widerstand war abhängig vom Inhalt, von der Länge und vom Durchmesser des Katheters.
Die Potenzialaufzeichnung am Computer wurde gestartet und der Nasenkatheter dann langsam in den unteren Nasengang des Nasenlochs auf der dem Beatmungstubus gegenüberliegenden Seite (in der Regel das linke Nasenloch) vorgeschoben und an der Stelle der maximalen lumen-negativen Potenzialdifferenz fixiert. Bei extubierten Patienten wurde die Perfusionsgeschwindigkeit der Ringerlösung gegebenenfalls von 5 ml/h auf 2 ml/h reduziert (Abbildung 4). Die ständige Perfusion des Messsystems mit Ringerlösung war notwendig, da sonst Luft, die zwischen Katheter und Nasenschleimhaut gelangt, als isolierendes Medium den Stromfluss verhinderte und die Ableitung störte.
Nachdem eine stabile Potenzialdifferenz abgeleitet werden konnte, d. h. kein steigender oder fallender Trend erkennbar war, wurde die Perfusionslösung von Ringerlösung auf Amilorid-Ringerlösung umgestellt. Die Amiloridlösung umspülte das Nasenepithel ebenfalls mit 5 ml/h und das Nasenpotenzial stellte sich dann rasch auf einen neuen weniger lumen-negativen Wert ein. Der Rückgang des Potenzials entsprach dem Amilorid-sensitiven Anteil.
Um eine mögliche Potenzialänderung der Ag^+/AgCl -Halbzellen während der Messung bei der Auswertung berücksichtigen zu können, wurden die Infusionsleitungen nach Ende der Messung erneut kurzgeschlossen und die Differenz aufgezeichnet.
Im in Abbildung 3 und 4 gezeigten Messaufbau wurde die Spüllösung an der Ag^+/AgCl-Halbzelle der Messelektrode entlang gelenkt, so dass trotz der hohen Chloridkonzentration geringe Mengen an Silberionen zum Patienten gelangen konnten. Obwohl die erwartete Silberionenkonzentration weit unter den Konzentrationen liegt, die Effekte auf gemessene Potenziale hatten [33], wurde der Messaufbau ab Proband Nr. 72 so verändert, dass noch weniger Silber die Nasenschleimhaut erreichte (Abbildung 5).

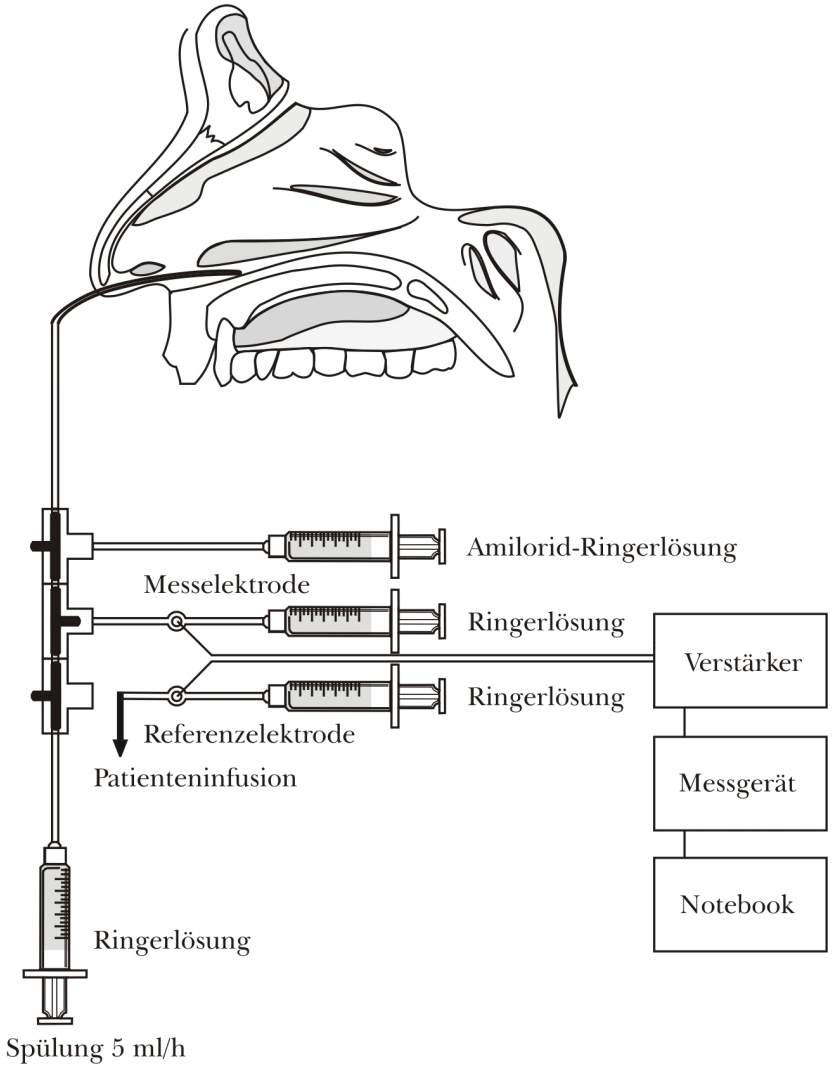

Abbildung 5: Messaufbau mit Messelektrodenanschluss im Nebenschluss

Im neuen Messaufbau wurde die Leitung mit der Messelektrode im Nebenschluss angekoppelt, so dass das Silber nur noch, wenn überhaupt, durch die langsameren Diffusionsvorgänge die perfundierende Leitung erreichen konnte (Abbildungen 5, 6). Erkennbare Effekte auf die Messwerte hatte dies nicht.

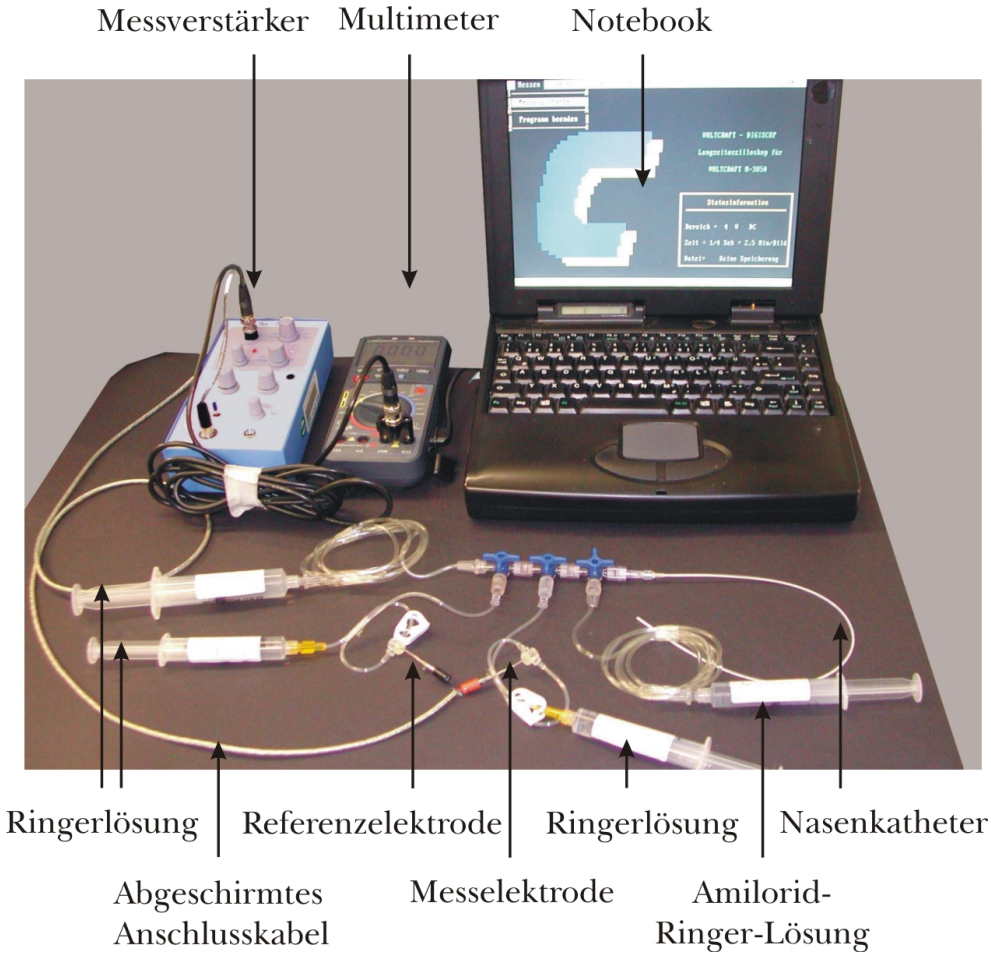

Abbildung 6: Kalibrierung des Messaufbaus mit Messelektrodenanschluss im Nebenschluss

2.8 Verwendete Lösungen

Für die Messung wurden zwei verschiedene Lösungen benötigt:

- Ringerlösung:

  Verwendet wurde die im Stationsbedarf üblicherweise gebrauchte Ringerlösung (in mmol/l: Na^+ 147,2; K^+ 4; Ca^{2+} 2,25; Cl^- 155,7, B. Braun, Melsungen AG).

- Amiloridlösung (10^{-4} mol/l):

  Amilorid-Hydrochlorid 0,015 g in Ringer-Lösung ad 500 ml wurde steril von der Klinikumsapotheke bereitgestellt und bis zum Gebrauch im Kühlschrank gelagert.

Beide Lösungen wurden im Kühlschrank bei 4° C maximal 14 Tage gelagert. Untersuchungen der Apotheke hatten ergeben, dass das enthaltene Amilorid über diese Zeit stabil ist.

2.9 Auswertung der Messdaten

Für die Aufzeichnung der Messwerte wurde das Programm *Digiscope*® verwendet. Um die Daten anschließend graphisch darstellen zu können, wurden die Rohdaten mittels eines hierfür eigens entwickelten *Excel*®-Makros (siehe Anhang) ausgewertet.
Aus jeder Messkurve mussten drei Bereiche ausgewählt werden:

- Potenzialdifferenz bei Perfusion mit Ringerlösung (Nasenpotenzialdifferenz, NP)
- Potenzialdifferenz bei Perfusion mit Amilorid-Ringerlösung (Amilorid-insensitive Potenzialdifferenz, Aisnpd)
- Durch Drift verursachte Potenzialänderung der $Ag^+/AgCl$ - Halbzellen bei Messende (Null)

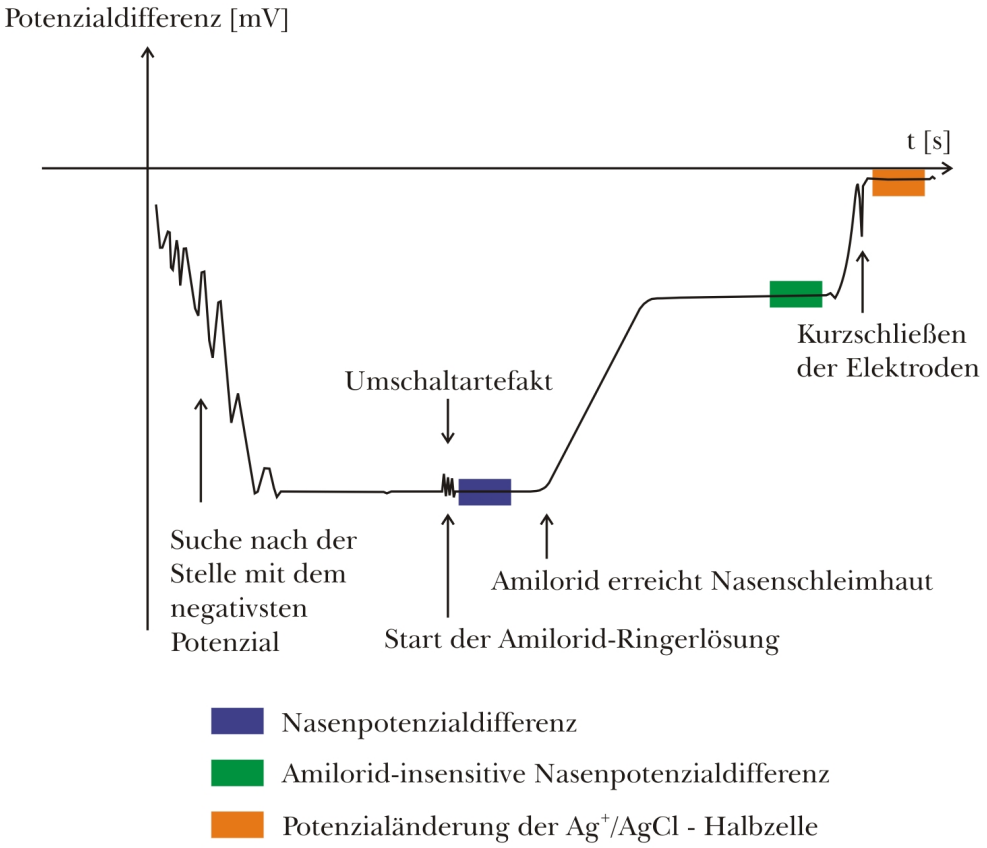

Abbildung 7: Skizze einer Messaufzeichnung

Hieraus wird die Amilorid-sensitive Potenzialdifferenz (Asnpd) berechnet:

$$Asnpd = (Aisnpd - Null) - (NP - Null) = Aisnpd - NP.$$

Kriterien zur Auswahl der Messbereiche:

Das Ziel war, die Wertebereiche so auszuwählen, dass möglichst wenig Verfälschungen durch Messartefakte in die Wertebereiche des NP, Aisnpd und Asnpd eingehen. Deshalb wurden jeweils die arithmetischen Mittel der Potenziale über 15 Sekunden möglichst konstanter repräsentativer Messaufzeichnung berechnet.

Es wurden die letzten möglichst artefaktfreien Sekunden der Messaufzeichnung für die Berechnung des Mittelwerts des Aisnpd verwendet.

Die Festlegung des als maximalen Nasenpotenzials erachteten Bereiches der Messaufzeichnung erfolgte folgendermaßen: Bei einigen Messungen kam es evtl. in Folge der Manipulation beim Umschalten der Perfusion von Ringer- auf Amilorid-Ringerlösung zu einer geringen Potenzialänderung. Diese Potenzialänderung ließ sich auch in Messungen ohne Proband simulieren. Da im Wesentlichen die Amilorid-sensitive Potenzialdifferenz betrachtet werden sollte, war es im Sinne der Fehlerreduktion sinnvoll, sowohl das NP als auch das Aisnpd nach dem Umschaltartefakt abzulesen. Deshalb wurde das NP aus Daten nach dem Zeitpunkt des Umschaltens der Perfusionslösung, aber noch bevor Amilorid-haltige Lösung das Nasenepithel erreichte, ausgewählt. Hierfür blieb genügend Zeit, da sich mit einer Perfusion von 5ml/h (Volumenfluss) und einem Kathetervolumen von 0,3ml und

$$Volumenfluss = \frac{Volumen}{Zeit}$$

eine Zeit von 3 Minuten 36 Sekunden errechnen lässt, in der das Nasenepithel noch von Amilorid-freier Ringerlösung umspült wird. Nur wenn nach dem Umschalten der Perfusion nicht gleich ein stabiles Potenzial abzuleiten war (z. B. wegen einer vorübergehenden Unterbrechung des Stromkreises durch eine Luftblase), dann wurde der Mittelwert aus den Messwerten direkt vor dem Umschalten der Perfusionslösungen berechnet.

Am Ende der Messaufzeichnung wurde jeweils durch Kurzschluss der Infusionsleitungen geprüft, ob eine Potenzialdrift der Ag^+/AgCl - Halbzellen während der Messung stattgefunden hatte und auch diese Veränderung aufgezeichnet. Auch von dieser Potenzialänderung der

Ag^+/AgCl - Halbzelle wurde das arithmetische Mittel berechnet und dieses vom arithmetischen Mittel des Amilorid-insensitiven Potenzials und des Nasenpotenzials subtrahiert, und so eine Verfälschung der Messwerte durch die Drift der Ag^+/AgCl - Halbzellen korrigiert.

1. Makro zur Bearbeitung der Rohdaten

Das Programm *Digiscope*® Version 1.00 liefert die Messwerte in Form einer Textdatei mit einem Messwert pro Zeile, wobei die Messwertkolonne alle 20 Sekunden durch * unterbrochen wird.

Beispiel:

-1.711
-1.709
-1.700
*
-1.703
-1.706
-1.710
-1.709

Der Beginn der Messaufzeichnung wird mit

Page 1 Range : DC V 4 Begin : 12:39:02 06-04-2002 20 Sek

das Ende mit

Page 3 Range : DC V 4 End : 12:57:53 06-04-2002 20 Sek

dokumentiert. Sollte während der Messung die Datenübertragung kurzfristig unterbrochen sein, zeichnet *Digiscope*® dies wie folgt auf:

Page 2 Range : DC V 4 End : 12:52:51 06-04-2002 20 Sek
Page 3 Range : DC V 4 Begin : 12:52:52 06-04-2002 20 Sek.

Das entwickelte *Excel*®-*Makro* öffnet die ausgewählte Textdatei mit Rohdaten, rekonstruiert zunächst aus den Zeitangaben eine kontinuierliche Zeitachse, fügt diese ein und löscht die Zeilen, die die Zeiten enthalten, heraus, um reine Datenkolonnen zu erhalten, die *Excel*® dann graphisch darstellen kann. Bedingt durch die Einstellungen am Verstärker müssen die Messwerte mit 10 multipliziert werden, um das Potenzial in mV zu erhalten. Dann werden die Messwerte graphisch ausgegeben.

Die Messapparatur wurde sorgfältig mit der Ringer- bzw. Ringer-Amiloridlösung gefüllt, dennoch kam es gelegentlich durch Lufteinschluss zu Unterbrechungen des Stromkreises. Diese führten aufgrund der internen Verschaltung des Verstärkers zur Registrierung des maximal möglichen positiven Potenzials, was im Diagramm als Spannungsspitzen erschien.

Das *Makro* gibt die Gesamtmesszeit in Sekunden sowie die Anzahl der Messwerte aus und benennt die Datei und Diagramme nach der Messung. Aus den Daten wurden pro Messung manuell die folgenden drei Wertebereiche ausgesucht: Die Potenzialdifferenz bei Perfusion mit Ringerlösung (NP), die Potenzialdifferenz bei Perfusion mit Amilorid-Ringerlösung (Aisnpd) und die durch Kurzschluss der Leitungen ermittelte Potenzialänderung der Ag^{+}/AgCl - Halbzelle am Ende der Messaufzeichnung. Die ausgewählten Bereiche wurden von Hand in vorbereitete Spalten kopiert. Das *Makro* errechnete dann die Mittelwerte.

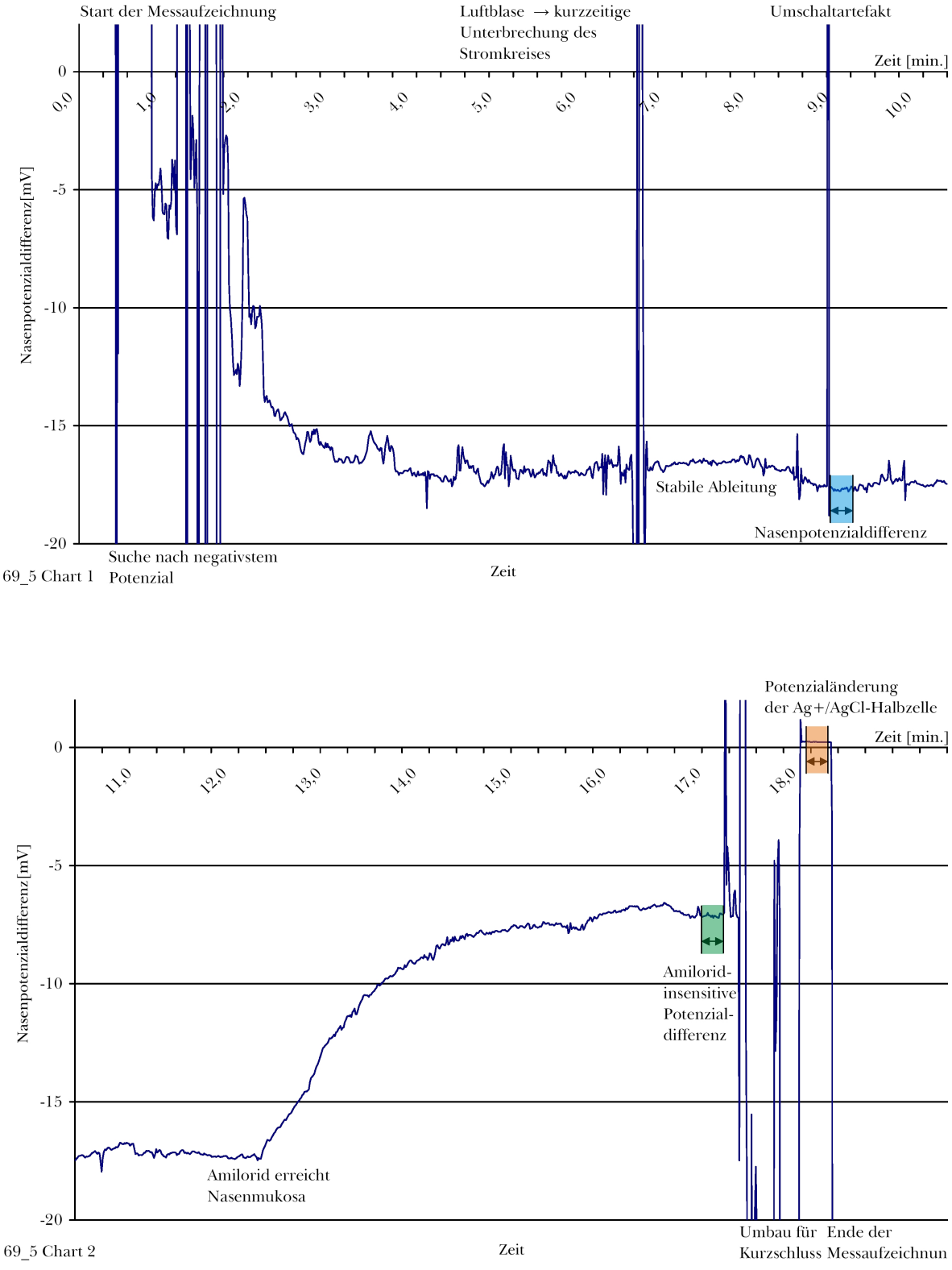

Abbildung 8: Excel-Graphiken einer Nasenpotenzial-Messung

2. Makro zur Subtraktion der Nullverschiebung

Dieses *Makro* berechnet jeweils die Differenz aus Werten der Aufzeichnung mit Ringerlösung bzw. Amilorid-Ringerlösung und der Potenzialänderung der Ag^{+}/AgCl - Halbzelle und gibt diese neuen korrigierten Werte des NP bzw. Aisnpd für jeden Messwert aus. Es berechnet den neuen Mittelwert des NP und Aisnpd, die Standardabweichungen sowie erneut die Amilorid-sensitive Potenzialdifferenz (Asnpd) und die relativ zum NP gesehene Potenzialänderung (=|Asnpd/ NP|) und schreibt alle neu berechneten Werte in die Tabelle (Tabelle 1).

Tabelle 1: Von Excel-Makro erzeugte Tabelle mit Daten einer Messung

Messzeit	Datenzahl	Nullp	NP	Aisnpd	Asnpd	|Asnpd/NP|
1126 s	1633	0,23 mV	-17,16 mV	-7,12 mV	10,04 mV	0,59
			s	s		
			0,09 mV	0,06 mV		
			NP - Nullp	Aisnpd - Nullp	Asnpd*	|Asnpd/NP*|
			-17,39 mV	-7,35 mV	10,04 mV	0,59
			s	s		
			0,09 mV	0,06 mV		

Erläuterung der Abkürzungen: NP = Nasenpotenzialdifferenz, Aisnpd = Amilorid-insensitive Nasenpotenzialdifferenz, Asnpd = Amilorid-sensitive Nasenpotenzialdifferenz, s = Standardabweichung, Nullp = Nullpunkt, * = um Nullpunkt korrigierter Wert.

2.10 Statistische Berechnungen

Anzahl der Probanden:

Die Studie zum Einfluss von Östradiol und Progesteron auf die Nasenpotenzialdifferenz von Frühgeborenen wurde im Rahmen einer randomisierten Doppelblindstudie durchgeführt, die den Einfluss der postnatalen Substitution dieser Hormone auf die Häufigkeit des Auftretens einer bronchopulmonalen Dysplasie (BPD) untersuchte. Überprüft wurde hierbei die Hypothese, ob eine solche Substitution die Häufigkeit der BPD auf die Hälfte reduziert. Bei einer

erwarteten Inzidenz für BPD von 60% und einer erwarteten Reduktion auf 30% ergab sich bei einseitiger Testung mit einem Fehler 1. Art von 5% und einem Fehler 2. Art von 20% eine Fallzahl von 40 Patienten pro Gruppe.

Die Messung der Nasenpotenzialdifferenz wurde erst im Verlauf der Studie zur Untersuchung der Häufigkeit der BPD begonnen. Zu diesem Zeitpunkt waren in dieser Studie noch weitere 26 Probanden zu randomisieren. Diese Fallzahl stand für die Untersuchungen des Nasenpotenzials zur Verfügung, denn die Ethikkommision hatte einer Erhöhung der Probandenzahl nicht zugestimmt. Bei 13 Patienten pro Behandlungsgruppe ($n_a = n_b = 13$), einer Standardabweichung s = 2,0 mV [8], einer Wahrscheinlichkeit für einen α-Fehler von 0,05 und einem β-Fehler von 0,2 konnte mit einem einseitigen t-Test noch ein Unterschied ($\overline{x_a} - \overline{x_b}$) von 2,0 mV festgestellt werden (für α = 0,05 und Freiheitsgrad 24 beträgt die kritische Schranke 1,71):

$$t = \frac{|\overline{x_a} - \overline{x_b}|}{s \cdot \sqrt{\frac{1}{n_a} + \frac{1}{n_b}}}$$

$$t = \frac{2}{2 \cdot \sqrt{\frac{1}{13} + \frac{1}{13}}}$$

$$t = 2,54$$

Da die Nasenpotenzialdifferenz bei jedem Probanden an vier verschiedenen Tagen gemessen wurde, war zu erwarten, dass mittels Varianzanalyse für wiederholte Messungen (RM-ANOVA) auch noch etwas kleinere Unterschiede statistisch nachweisbar sein würden.

Auswertung der Daten:

Die statistischen Berechnungen zur Auswertung der gemessenen und erhobenen Daten wurden mit Hilfe der Programme *SigmaStat*® (Version 3.0), *Analyse-it for Microsoft Excel*® (Version 1.71) sowie *SAS*® (Version 8.2) durchgeführt. Die Auswertung für das primäre Zielkriterium, die Amilorid-sensitive Nasenpotenzialdifferenz, erfolgte als Two Way RM ANOVA unter Einbeziehung aller gemessenen Werte, unabhängig davon, ob die Probanden der Verumgruppe die E2/P-Emulsion tatsächlich erhalten hatten (intention to treat-Analyse). Anschließend wurde eine explorative Datenanalyse ohne Korrektur des p-Wertes für multiples Testen durchgeführt. Es wurde eine according to protocol-Analyse für die Asnpd

durchgeführt, d.h. es wurde berücksichtigt, ob den Probanden der Verumgruppe zum Zeitpunkt der Messung E2 und P infundiert wurde. Verwendet wurde hierfür die Two Way RM ANOVA. Des Weiteren wurden Analysen mit dem Log Rank Test, dem Fisher´s Exact Test und der Pearson Korrelation durchgeführt. Mit *Analyse-it for Microsoft Excel* wurden ROC (receiver operating characteristics)-Kurven erstellt. In diesen werden die korrespondierenden Werte für Sensitivität und Spezifität für verschiedene Diskriminanzschwellen gegeneinander aufgetragen und so Sensitivität und zugehörige Spezifität eines Tests für verschiedene Diskriminanzschwellen beschrieben. Der diagnostische Test weist Trennschärfe auf, wenn sich die Kurve signifikant von der Winkelhalbierenden des Koordinatensystems (links-unten nach rechts-oben) unterscheidet. Der demographische Vergleich der beiden Studiengruppen erfolgte mittels t-Test für kontinuierliche normalverteilte Daten (Geburtsgewicht, Nabelarterien-pH), mittels Mann Whitney Rank Sum Test für ordinale Daten oder nicht-normalverteilte Daten (APGAR, Lungenreifungsinduktion mit Betamethason, Surfactantgabe und -dosis) sowie Fisher´s Exact Test für Daten einer Nominalskala (Geschlecht) jeweils auf dem 5%-Signifikanzniveau.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleich der Studiengruppen

In die Studie eingeschlossen wurden 16 männliche und 13 weibliche Frühgeborene, somit drei mehr als geplant, mit einem Geburtsgewicht von unter 1000 g, die mit einem Gestationsalter unter 29 Schwangerschaftswochen geboren, und die innerhalb der ersten 12 Lebensstunden intubiert und beatmet wurden.

Tabelle 2: Charakterisierung der Studiengruppen

	Placebo	**Verum**	**p**	**Test**
	$\bar{x} \pm s/\widetilde{x}$ (min-max)	$\bar{x} \pm s/\widetilde{x}$ (min-max)		
Anzahl	14	15		
Geschlecht m : w	7 : 7	9 : 6	0,715	Fisher
Gestationsalter (Wochen)	$25\ \frac{5}{7} \pm 1$	$25 \pm 1\frac{2}{7}$	0,097	MW
Geburtsgewicht (g)	630 ± 166	650 ± 162	0,738	t-Test
pränat. Betamethason-Therapie	13; 1; 0	11; 2; 2	0,355	MW
APGAR 1 min	4 (0 - 6)	4 (2 - 8)	0,106	MW
APGAR 5 min	7 (5 - 9)	8 (5 - 10)	0,326	MW
APGAR 10 min	9 (6 - 10)	9 (5 - 10)	0,646	MW
Na-pH	$7{,}20 \pm 0{,}12$	$7{,}25 \pm 0{,}11$	0,306	t-Test
Anzahl Surfactantgaben	1,5 (1 - 4)	2 (1 - 4)	0,284	MW
Surfactant (mg)	83 (55 - 196)	112 (55 - 220)	0,347	MW
Sectio / Spontangeburt	13 / 1	10 / 5	0,169	Fisher
vorzeitiger Blasensprung nein / ja	14 / 0	12 / 3	0,224	Fisher
IUGR ja / nein	7 / 7	4 / 11	0,264	Fisher

Erläuterung der Abkürzungen:$\bar{x}$ = Mittelwert, $\widetilde{x}$ = Median, s = Standardabweichung, min = kleinster Wert, max = größter Wert, Fisher = Fisher´s Exact Test, MW = Mann Whitney Rank Sum Test, m = männlich, w = weiblich, pränat. Betamethason-Th. = pränatale Betamethason-Therapie (> einmalig durchgeführt; einmalig durchgeführt; nicht durchgeführt), Na-pH = Nabelarterien-pH, vorzeitiger Blasensprung = $\geq$ 7 Tage vor Geburt, IUGR = intrauterine Wachstumsretardierung, definiert als Geburtsgewicht unterhalb der 10. Perzentile.

Die Probanden wurden nach Liste randomisiert, 15 Frühgeborene erhielten Östradiol (E2) und Progesteron (P), im Folgenden als Hormongruppe bezeichnet, die anderen 14 erhielten Placebo (Placebogruppe). 27 Probanden überlebten (93,1%). Die beiden verstorbenen Probanden waren der Hormongruppe zugeordnet.

Zwischen der Hormon-Behandelten und der Placebogruppe ergaben sich auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ keine Unterschiede in Bezug auf Geschlecht, Gestationsalter, Geburtsgewicht, Durchführung der Betamethason-Therapie, APGAR-Werte, Nabelarterien-pH, die Häufigkeit der Surfactant-Gabe, die Menge applizierten Surfactants, Geburtsmodus, vorzeitigen Blasensprung oder intrauterine Wachstumsretardierung (Tabelle 2).

3.2 Applikation der Studienemulsionen

Die Probanden der Hormongruppe erhielten die Hormone im Median 17,35 Tage (2,02 - 27,91 Tage), den Probanden der Placebogruppe wurde im Median 20,48 Tage (2,83 - 28,63 Tage) lang fetthaltige Emulsion als Placebo appliziert. Ziel war, mit der Substitution bei der Verumgruppe eine E2-Konzentration von 2000 - 6000 pg/ml und eine P-Konzentration von 300 - 600 ng/ml zu erreichen. Die Plasmakonzentrationen von Östradiol und Progesteron wurden am 1., am 3. und am 7. Lebenstag mittels Radioimmunoassay vom Endokrinologischen Labor der Universitäts-Frauenklinik Ulm aus 100 μl EDTA-Plasma bestimmt.

Die E2-Spiegel lagen in der Hormongruppe zumeist über der angestrebten Minimalkonzentration von 2000 pg/ml E2 (5 Werte < 2000 pg/ml). Deutlich über der gesetzten Maximalkonzentration von 6000 pg/ml E2 lagen 3 Werte (15086, 300000 und 100000 pg/ml) (Abbildung 9). Die erwünschte minimale Progesteron-Plasmakonzentration von 300 ng/ml P wurde am ersten Lebenstag in der Hälfte der Fälle erreicht, die darauf folgenden Messungen ergaben nur 3 Werte < 300 ng/ml. Es lagen 3 Werte über 600 ng/ml P (Abbildung 10).

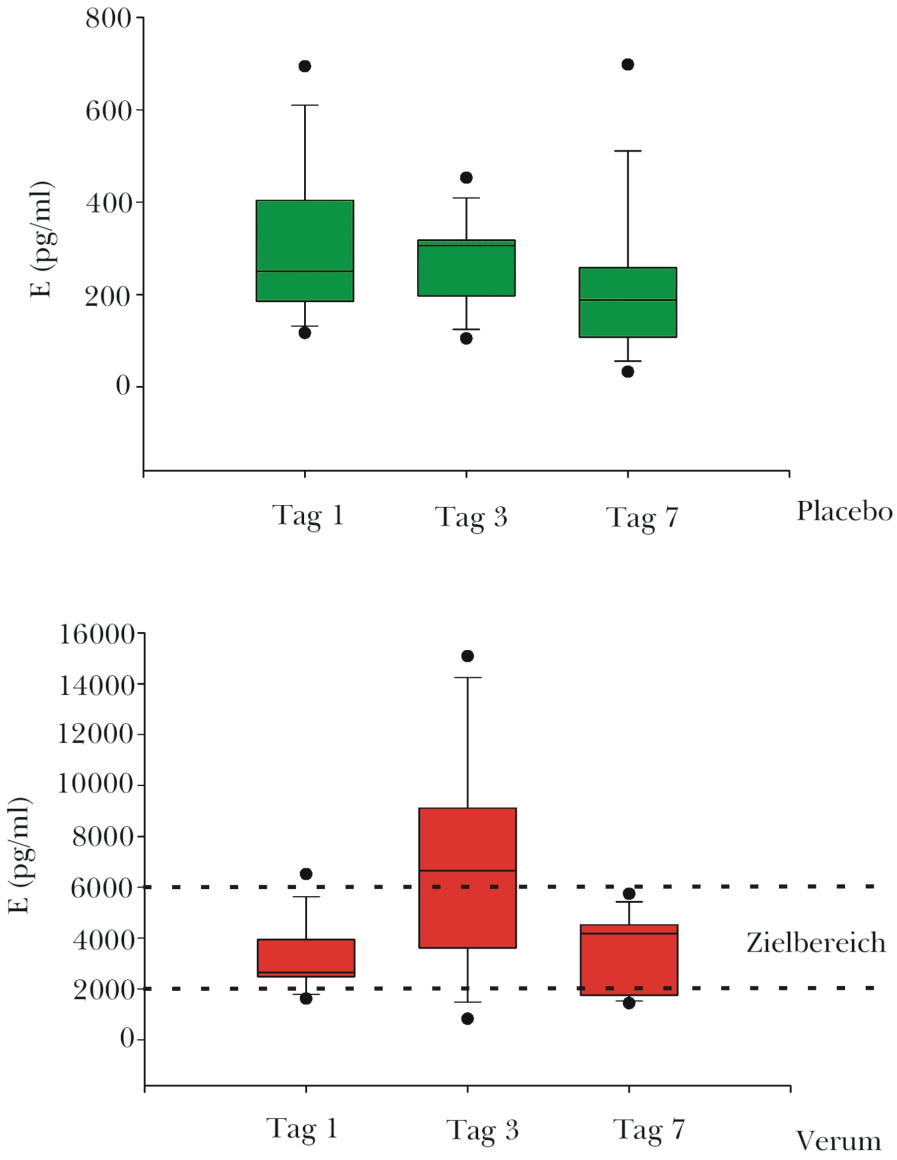

Abbildung 9: Östradiol-Plasmakonzentrationen

E = 17β-Östradiol-Plasmakonzentration; Die waagerechte Linie in der Box kennzeichnet den Median, die Box umgibt den Bereich zwischen der 25%- und der 75%-Perzentile, die Fehlerbalken beschreiben die 5%- und die 95%-Perzentile, die Punkte den minimalen und den maximalen Wert. Der angestrebte Konzentrationsbereich wird durch die gestrichelten Linien markiert. Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung der y-Achse.

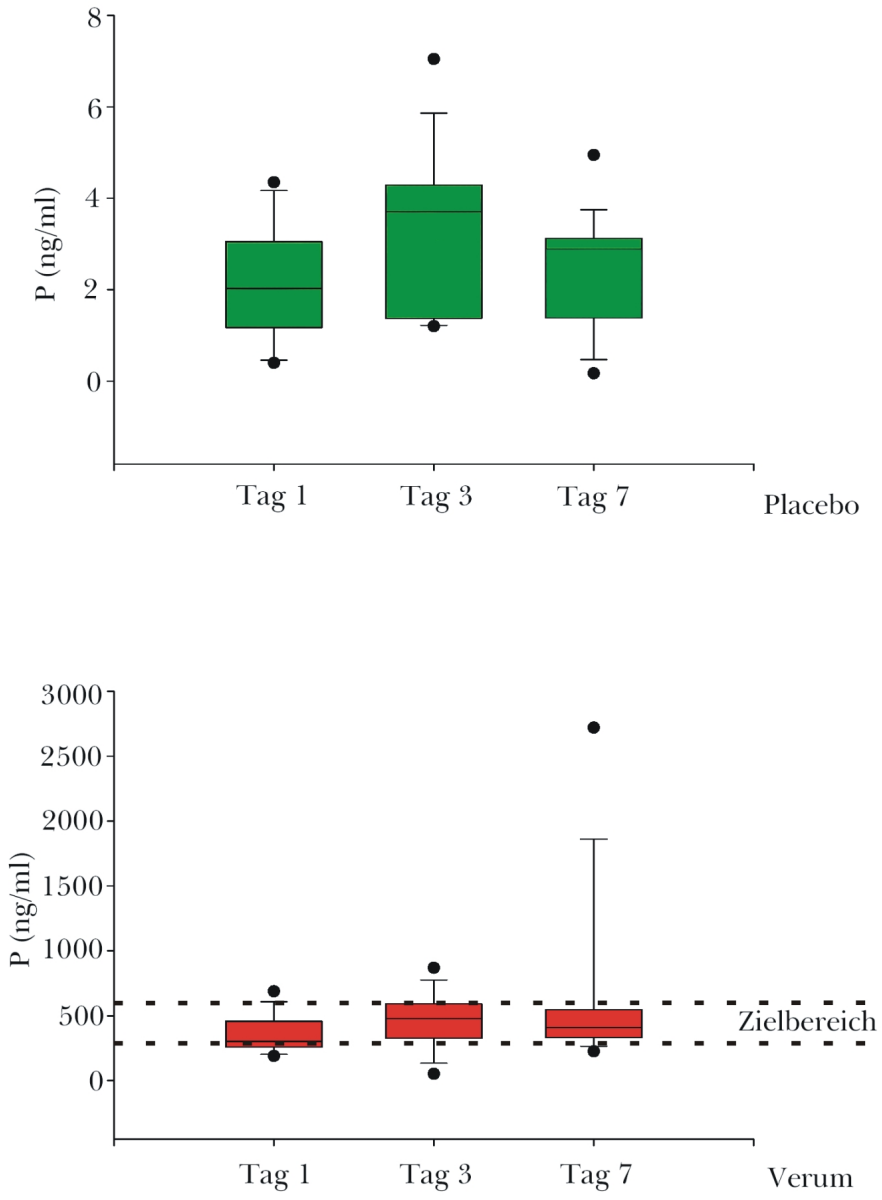

Abbildung 10: Progesteron-Plasmakonzentrationen

P = Progesteron-Plasmakonzentration; Die waagerechte Linie in der Box kennzeichnet den Median, die Box umgibt den Bereich zwischen der 25%- und der 75%-Perzentile, die Fehlerbalken beschreiben die 5%- und die 95%-Perzentile, die Punkte den minimalen und den maximalen Wert. Der angestrebte Konzentrationsbereich wird durch die gestrichelten Linien markiert. Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung der y-Achse.

3.3 Primäres Zielkriterium: Amilorid-sensitive Nasenpotenzialdifferenz

Der Mittelwert der Amilorid-sensitiven Nasenpotenzialdifferenz lag in der Placebogruppe bei 6,07 mV (Standardabweichung s = 0,72 mV) und in der Hormongruppe bei 6,51 mV (s = 0,69 mV). In der RM-ANOVA als intention to treat-Analyse ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Applikation von E2/P-haltiger Fettemulsion und der Asnpd an den verschiedenen Messtagen (p = 0,638) (Abbildung 11, Tabelle 3).

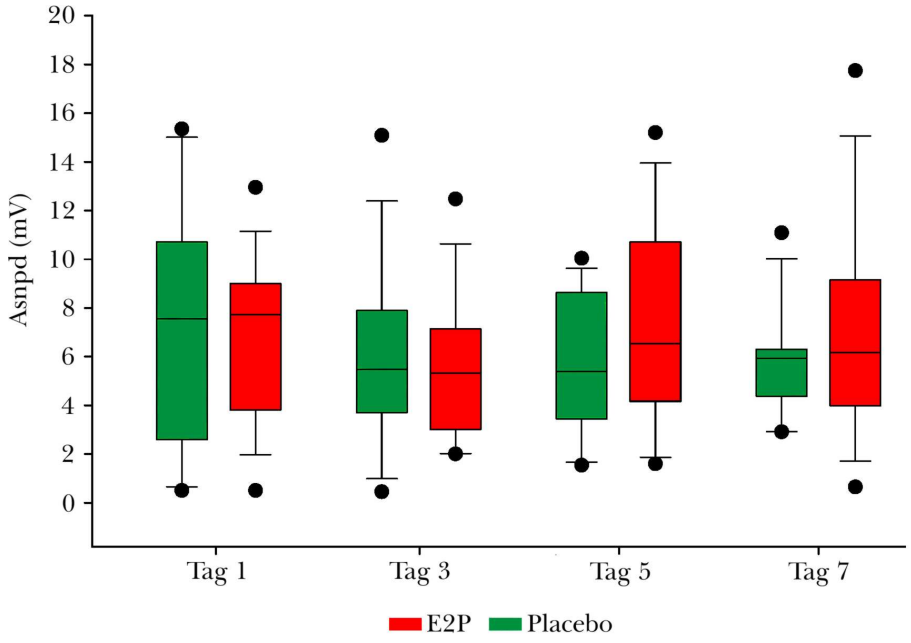

Abbildung 11: Amilorid-sensitive Nasenpotenzialdifferenz, intention to treat-Analyse

Asnpd = Amilorid-sensitive Nasenpotenzialdifferenz, E2P = Verumgruppe, Placebo = Placebogruppe; Die waagerechte Linie in der Box kennzeichnet den Median, die Box umgibt den Bereich zwischen der 25%- und der 75%-Perzentile, die Fehlerbalken beschreiben die 5%- und die 95%-Perzentile, die Punkte den minimalen und den maximalen Wert.

In der according to protocol-Analyse wurde berücksichtigt, ob die Probanden zum Zeitpunkt der Messung E2/P erhielten. Bei einem Probanden der Placebogruppe und drei Probanden der Hormongruppe wurde die fetthaltige Emulsion vor Beendigung der vier Messungen auf Grund einer Hypertriglyzeridämie abgesetzt. Bei Berechnung des Mittelwerts der Asnpd

erhält man 5,86 mV bei den Placebo-Behandelten Probanden (s = 0,77 mV) bzw. 6,88 mV bei den Hormon-Behandelten Probanden (s = 0,69 mV). Auch hier ließ sich kein signifikanter Zusammenhang (p = 0,4522) feststellen (Abbildung 12).

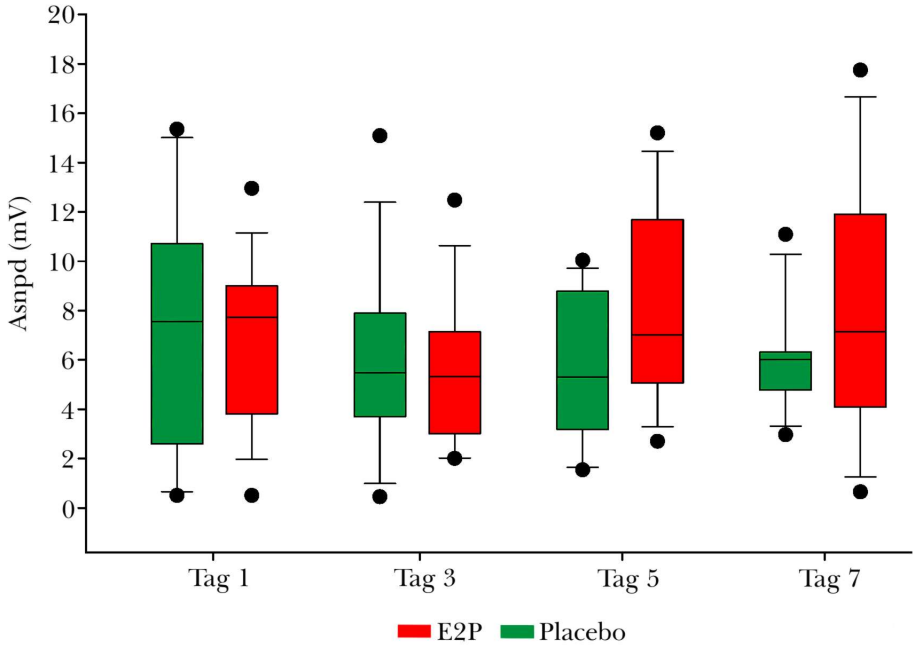

Abbildung 12: Amilorid-sensitive Nasenpotenzialdifferenz, according to protocol-Analyse

Asnpd = Amilorid-sensitive Nasenpotenzialdifferenz, E2P = Verumgruppe, Placebo = Placebogruppe; Die waagerechte Linie in der Box kennzeichnet den Median, die Box umgibt den Bereich zwischen der 25%- und der 75%-Perzentile, die Fehlerbalken beschreiben die 5%- und die 95%-Perzentile, die Punkte den minimalen und den maximalen Wert.

Es fand sich keine Korrelation zwischen der Asnpd und dem Geburtsgewicht (r = 0,0259) oder dem Gestationsalter (r = -0,000973). Auch die Therapie mit Hydrocortison zur Blutdrucksteigerung bei 13 von 14 Frühgeborenen der Placebogruppe, sowie 10 von 15 Frühgeborenen der Hormongruppe hatte keinen Einfluss auf die Asnpd (p = 0,23).
Des weiteren ergaben sich keine Unterschiede zwischen der Hormon- und der Placebogruppe bei getrennter Testung der Asnpd-Werte von Tag 1 und Tag 3-7. Auch eine Korrelation zwischen Asnpd und dem E2-Spiegel bestand nicht.

3.4 Sekundäre Zielkriterien

Da im Folgenden keine primären Zielkriterien ausgewertet wurden, sind die folgenden Ergebnisse als Hypothesen generierend zu betrachten.

3.4.1 Nasenpotenzialdifferenz

Die gesamte Nasenpotenzialdifferenz lag durchschnittlich bei -10,32 mV in der Placebogruppe (Standardabweichung s = 0,94 mV) bzw. -10,04 mV in der Hormongruppe (s = 0,91 mV) und war so mit p = 0,9027 (bzw. 0,9581 in der according to protocol-Analyse) nicht signifikant verschieden (RM-ANOVA, Abbildung 13, Tabelle 3).

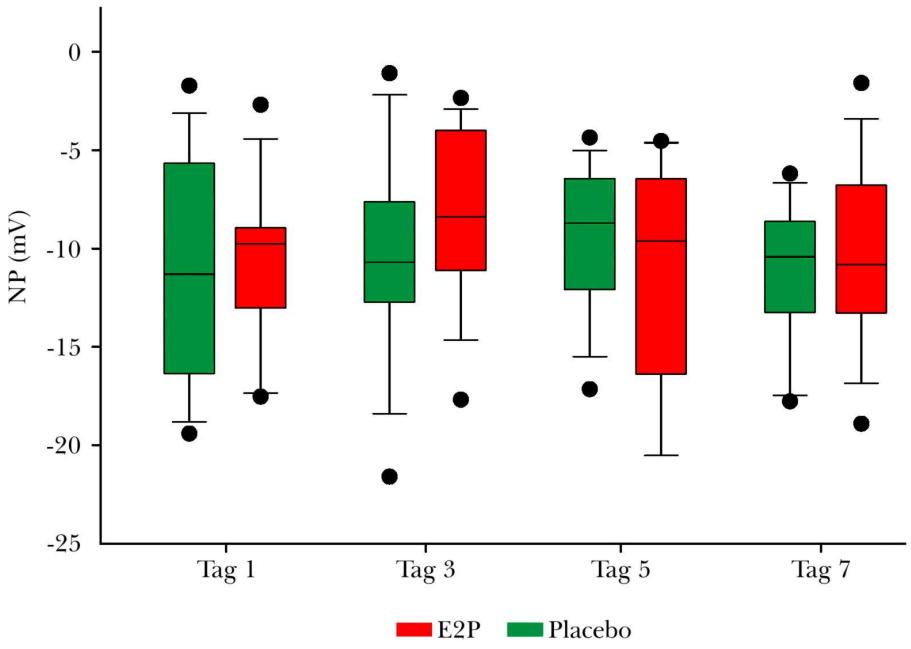

Abbildung 13: Nasenpotenzialdifferenz, intention to treat-Analyse

NP = Nasenpotenzialdifferenz, E2P = Verumgruppe, Placebo = Placebogruppe; Die waagerechte Linie in der Box kennzeichnet den Median, die Box umgibt den Bereich zwischen der 25%- und der 75%-Perzentile, die Fehlerbalken beschreiben die 5%- und die 95%-Perzentile, die Punkte den minimalen und den maximalen Wert.

Tabelle 3: Ergebnisse der Studiengruppen im Vergleich als intention to treat und according to protocol-Analyse

	intention to treat-Analyse			according to protocol-Analyse		
	Placebo	Verum	p	Placebo	Verum	p
Asnpd $\overline{x}$ (mV)	6,07	6,51	0,638	5,86	6,88	0,452
NP $\overline{x}$ (mV)	-10,32	-10,04	0,903	-9,97	-10,32	0,958
relPD $\overline{x}$ (mV)	54,2%	60,2%	0,059	53,2%	62,6%	0,028

Erläuterung der Abkürzungen: $\overline{x}$ = Mittelwert, Asnpd = Amilorid-sensitive Nasenpotenzialdifferenz, NP = Nasenpotenzialdifferenz, relPD = Amilorid-sensitiver Anteil der Nasenpotenzialdifferenz in %.

Aus den 4 Messungen pro Patient wurden jeweils die Mittelwerte gebildet, anschließend wurden davon die Mittelwerte je Studiengruppe berechnet, p-Wert nach Two Way RM ANOVA.

3.4.2 Amilorid-sensitiver Anteil der Nasenpotenzialdifferenz in %

Der Amilorid-sensitive Anteil der Potenzialdifferenz lag mit 54,2% in der Placebogruppe unter dem der Hormongruppe von 60,2% (siehe Tabelle 3). In der according to protocol-Analyse ergab sich ein Anteil von 53,2 % bzw. 62,6 % in der Placebo- bzw. Hormongruppe und damit ein auf dem 5%-Signifikanzniveau signifikanter Unterschied (siehe Tabelle 3). Folglich könnte die postnatale Substitution von E2/P zwar nicht die gesamte Nasenpotenzialdifferenz, jedoch den Amilorid-sensitiven Anteil beeinflusst haben.

3.4.3 Bronchopulmonale Dysplasie

Am 28. Lebenstag bedurften 12 der 14 Probanden der Placebogruppe und 10 der 15 Probanden der Verumgruppe zusätzlicher Sauerstoffzufuhr von mehr als 30 Minuten, um Sauerstoffsättigungen von 90% zu erzielen.

Im postmenstruellen Alter von 36 Wochen benötigten sieben Probanden der Placebogruppe sowie fünf Probanden der Verumgruppe zusätzliche Sauerstoffzufuhr von mehr als 30 Minuten, um Sauerstoffsättigungen von 90% zu erzielen, und hatten somit eine bronchopulmonale Dysplasie (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Häufigkeit der bronchopulmonalen Dysplasie

	Placebo	Verum	p
BPD 28d	12 von 14 (85,7%)	12 von 15 (80,0%)	1,000
BPD 36w	7 von 14 (50,0%)	5 von 15 (33,3%)	0,462

Erläuterung der Abkürzungen: BPD 28d = Bronchopulmonale Dysplasie im Alter von 28 Tagen oder verstorben, BPD 36w = Bronchopulmonale Dysplasie im postmenstruellen Alter von 36 Wochen oder verstorben, p-Wert nach Fisher´s Exact Test

Des Weiteren wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse bezüglich eines Zusammenhangs zwischen einer chronischen Lungenerkrankung im postmenstruellen Alter von 36 Wochen und den gemessenen Potenzialdifferenzen aus beiden Studiengruppen durchgeführt. Betrachtet man die Amilorid-sensitive Nasenpotenzialdifferenz, so hatten Kinder, die eine BPD erworben hatten oder starben, eine signifikant kleinere Asnpd als Kinder, die im Alter von 36 postmenstruellen Wochen keine BPD hatten (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Asnpd und Bronchopulmonale Dysplasie

	BPD oder Tod	keine BPD	p
	n = 12	n = 17	
Asnpd (mV)	5,2 $\pm$ 2,4	7,1 $\pm$ 2,6	0,036

Erläuterung: Asnpd = Amilorid-sensitive Nasenpotenzialdifferenz, BPD = bronchopulmonale Dysplasie (im Alter von 36 postmenstruellen Wochen), p-Wert nach Two Way RM-ANOVA, n = Anzahl Probanden

Die RM-ANOVA ergab, dass mit der Bestimmung des Amilorid-sensitiven Anteils der Nasenpotenzialdifferenz in % (relPD) die Entstehung einer chronischen Lungenerkrankung vorhergesagt werden kann (p = 0,0294), der Wert der Nasenpotenzialdifferenz war dagegen kein signifikanter Parameter (p = 0,0671).
Es ergaben sich also Anhaltspunkte dafür, dass mit der Messung der Amilorid-sensitiven Nasenpotenzialdifferenz in der ersten Lebenswoche die Entstehung einer bronchopulmonalen Dysplasie vorhergesagt werden könnte.

Um das zu überprüfen wurden ROC-Kurven der Mittelwerte (MW) der vier Asnpd-Messungen pro Proband erstellt.

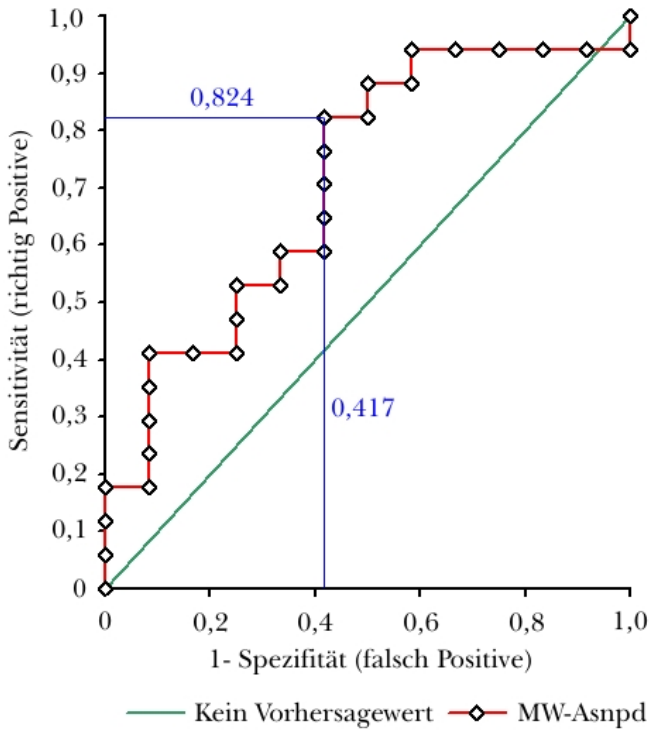

Abbildung 14: ROC-Kurve Asnpd

Erläuterung der Abkürzungen: ROC = receiver operating characteristics-Kurve, MW-Asnpd = ROC für die Mittelwerte der pro Proband gemessenen Amilorid-sensitiven Nasenpotenzialdifferenzen

Nimmt man als Diskriminanzschwelle eine über die erste Lebenswoche gemittelte Amilorid-sensitive Nasenpotenzialdifferenz von > 4,30 mV, so wurde in dem hier beschriebenen Kollektiv mit einer Sensitivität von 82,4% und einer Spezifität von 58,3% die Entstehung einer bronchopulmonalen Dysplasie vorgesagt (Abbildung 14, siehe blaue Markierung, p = 0,0172).

Für die gesamte Nasenpotenzialdifferenz ergab sich ein ähnliches Bild. Probanden, die keine chronische Lungenerkrankung entwickelten, wiesen negativere Werte auf. Liegt der Mittelwert der Nasenpotenzialdifferenz in der ersten Lebenswoche unter -7,67 mV, so ist die Sensitivität der Vorhersage einer BPD 88,2 % und die Spezifität der Vorhersage 58,3 % (Abbildung 15, siehe blaue Markierung, p = 0,0237).

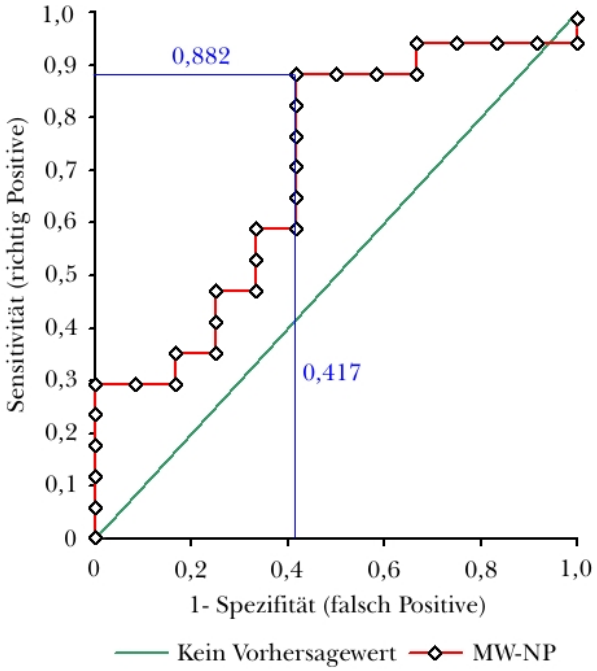

Abbildung 15: ROC-Kurve NP

Erläuterung der Abkürzungen: ROC = receiver operating characteristics-Kurve, MW-NP = ROC für die Mittelwerte der pro Proband gemessenen Nasenpotenzialdifferenzen

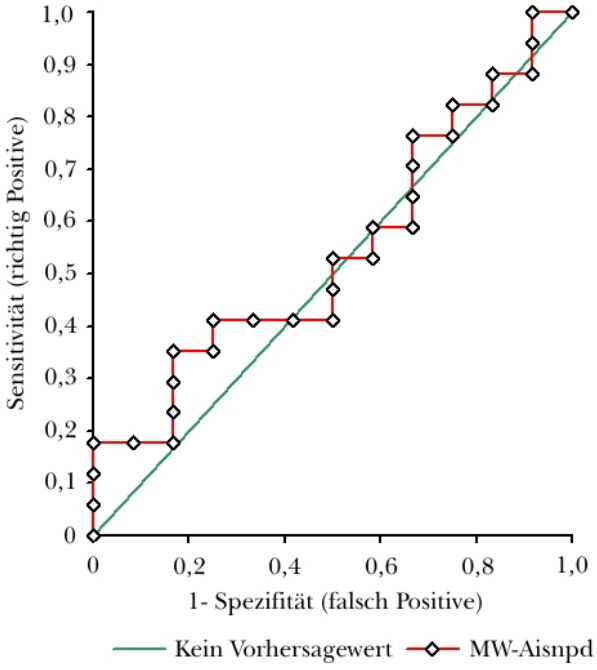

Abbildung 16: ROC-Kurve Aisnpd

Erläuterung der Abkürzungen: ROC = receiver operating characteristics-Kurve, MW-Aisnpd = ROC für die Mittelwerte der pro Proband gemessenen Amilorid-insensitiven Nasenpotenzialdifferenzen

Für den Amilorid-insensitiven Anteil fand sich annähernd die Winkelhalbierende (p = 0,3435) und somit kein Vorhersagewert (Abbildung 16).

3.4.4 Mortalität

Bezüglich der Mortalität zeigte sich mit dem Fisher´s Exact Test kein Unterschied zwischen den Studiengruppen (siehe Tabelle 6).

3.4.5 Hirnblutung

Insgesamt erlitten fünf Probanden eine Hirnblutung Grad III/IV nach Papile [53] (Tabelle 6, siehe auch 2.6.2), drei Frühgeborene waren der Placebogruppe, zwei der Hormongruppe zugeordnet.

Tabelle 6: Mortalität und Hirnblutung (IVH)

	Placebo	Verum	p
verstorben (ja/nein)	0/14 (0 %)	2/13 (13,33 %)	1,00
IVH III/IV (ja/nein)	3/11 (21,42 %)	2/13 (13,33 %)	0,651

Erläuterung der Abkürzungen: IVH = intraventrikuläre Hämorrhagie, Klassifizierung (I-IV) nach Papile [53]

3.4.6 Extubationstag

Die folgende Abbildung 17 zeigt eine Kaplan-Meier-Analyse der Beatmungszeiten in beiden Studiengruppen (p = 0,8325, Log-Rank-Test). Die verstorbenen Probanden wurden als „zensierte Beobachtungen“ („censored observations“, in den Graphiken mit „censored“ bezeichnet) gewertet.

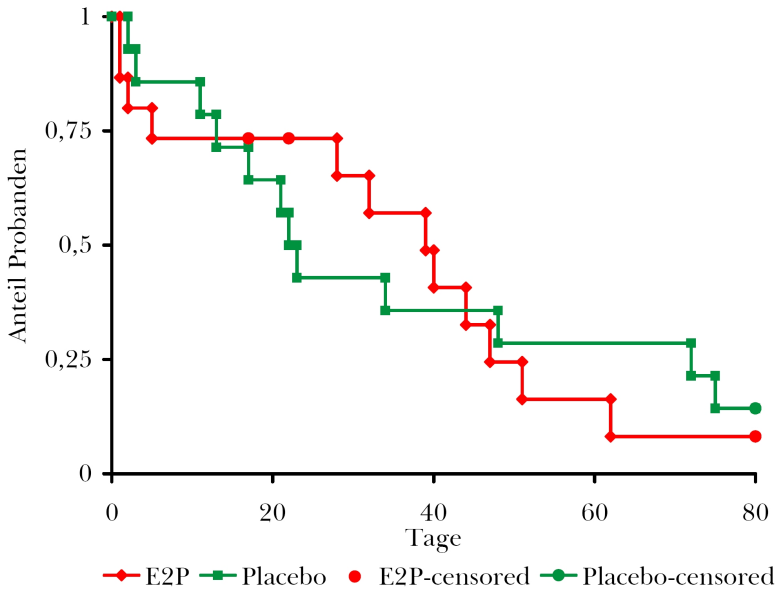

Abbildung 17: Kaplan-Meier-Analyse der Beatmungszeiten

Erläuterung der Abkürzungen: E2P = Verumgruppe, Placebo = Placebogruppe, censored = „zensierte Beobachtung“ = verstorbener Proband

3.4.7 Tag der letzten Sauerstoffgabe

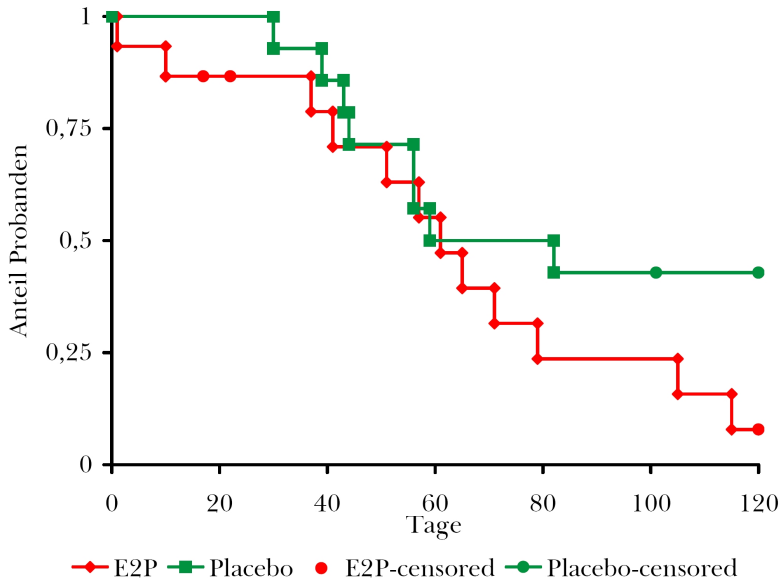

Abbildung 18: Kaplan-Meier-Analyse des Sauerstoffbedarfs

Erläuterung der Abkürzungen: E2P = Verumgruppe, Placebo = Placebogruppe, censored = „zensierte Beobachtung“ = verstorbener Proband

Die Abbildung 18 zeigt die Dauer des Bedarfs von mehr als 21 % Sauerstoff in der Atemluft in der Hormongruppe und in der Placebogruppe. Sechs Probanden der Placebogruppe und zwei Probanden der E2/P-Gruppe wurden mit Sauerstoff nach Hause entlassen.

3.4.8 Oxygenierungsindex

Zur Prüfung auf einen Zusammenhang zwischen den Parametern der Beatmung und der Asnpd wurde der Oxygenierungsindex (OI) nach

$$OI = FiO_2 \cdot MAP / P_{O_2}$$

aus den während den Nasenpotenzialmessungen erhobenen Parametern berechnet. Es wurde dann der Mittelwert der OI pro Proband berechnet und mittels RM-ANOVA geprüft, ob ein Zusammenhang zwischen der Asnpd und dem Beatmungsbedarf bestand. Probanden, die mit einem mittleren OI kleiner als 4 beatmet wurden, hatten im Mittel eine Asnpd von 7,075 mV, und damit eine um 1,914 mV größere Asnpd als Probanden mit einem mittleren OI größer als 4 (p = 0,0409, siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Asnpd und Oxygenierungsindex

Asnpd (mV)		p
OI < 4 (n = 16)	OI > 4 (n = 12)	
7,075 ± 2,528	5,161 ± 2,690	0,0409

Erläuterung: Asnpd = Amilorid-sensitive Nasenpotenzialdifferenz, OI = Oxygenierungsindex, p-Wert nach Two Way RM-ANOVA, n = Anzahl Probanden

Eine höhere Aktivität des ENaC - gemessen als größere Asnpd - scheint folglich einen günstigen Einfluss auf den Beatmungsbedarf zu haben.

Praktische Aspekte der Messungen:

Die Messung wurde am Ort der maximalen transepithelialen Nasenpotenzialdifferenz durchgeführt. Das maximal negative Potenzial konnte bei wiederholten Messungen am selben Proband nicht immer bei der gleichen Eindringtiefe des Nasenkatheters wieder gefunden werden. Als Median der Kathetereindringtiefe erhält man bei beiden Studiengruppen 2 cm.

Es war weder ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (p = 0,451), noch eine Korrelation zwischen dem Messpunkt und der Asnpd (Pearson Correlation r = -0,0362, p = 0,735) zu finden.

Die Änderung des Messaufbaus ab Proband Nr. 72 zur Verringerung der Silberionenkonzentration in der Spüllösung hatte keinen Einfluss auf die Asnpd (p = 0,54) und die NP (p = 0,78).

Die Messung dauerte im Durchschnitt 23 Minuten (Minimum 10, Maximum 55 Minuten). Die Zeit, in der die Probanden intranasal Amilorid erhielten, betrug im Durchschnitt 11 Minuten (Minimum 6, Maximum 28 Minuten). Auf eine (maximale) Perfusionsgeschwindigkeit von 5 ml/h der Amilorid-Ringerlösung (Konzentration c = 10^{-4} mol/l) bezogen, ergibt sich bei

$$Konzentration = \frac{Menge}{Volumen}$$

und

$$Volumen = Volumenfluss \cdot Zeit$$

sowie

$$Menge = Volumenfluss \cdot Zeit \cdot Konzentration$$

eine maximale Amiloriddosis von

$$5ml/h \cdot \frac{28}{60}h \cdot 10^{-4}mol/l = 0,23\mu mol$$

entsprechend maximal 70 μg Amilorid.

4 Diskussion

4.1 Vergleich der Ergebnisse

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der postnatalen Substitution mit Östradiol und Progesteron und der Amilorid-sensitiven Nasenpotenzialdifferenz bei Frühgeborenen in der ersten Lebenswoche nachgewiesen werden. Möglich ist aber auch, dass die Substitution das Nasenpotenzial beeinflusst, dieser Unterschied hier aber nicht gefunden wurde. Dies kann mehrere Ursachen haben:

Fallzahl:
Bedingt durch die Angliederung dieser Studie an die Studie zum Einfluss der Hormone Östradiol und Progesteron auf die Häufigkeit der bronchopulmonalen Dysplasie war die eher kleine Fallzahl vorgegeben und diese Fallzahl reichte nicht aus, um einen Unterschied, der kleiner ausfiel als die angenommenen 2 mV nachzuweisen.

β-Fehler:
Da β mit 0,20 angenommen wurde, besteht eine Wahrscheinlichkeit von 20%, dass ein in der Grundgesamtheit bestehender Unterschied von 2 mV zufällig in dieser Stichprobe nicht gefunden wurde.

Studien bei Frühgeborenen:
Die Messung der Amilorid-sensitiven Nasenpotenzialdifferenz wurde bei Frühgeborenen durchgeführt. Hieraus ergibt sich zwangsläufig, dass die Messung durch Verrutschen des Katheters in Folge von Kindsbewegungen gestört werden konnte. Für die Auswertung der Daten wurde jedoch stets ein Bereich mit möglichst stabiler Ableitung ohne Bewegungsartefakte ausgewählt. Eine weitere Quelle von Fehlern war der Ort der Messung. Der Katheter wurde für die Messung im unteren Nasengang an der Stelle des maximal negativen Potenzials positioniert. Aufgrund der geringen Körpergröße der Probanden, wurde auf eine rhinoskopische Kontrolle der Position des Katheters, wie sie teilweise durchgeführt wird [34], verzichtet. Als nicht-invasive Kontrollmöglichkeit des Messpunkts stand jedoch die Messung der Eindringtiefe des Katheters zur Verfügung. Es fand sich keine Korrelation zwischen dem Ort der

Messung und der Amilorid-sensitiven Nasenpotenzialdifferenz.
Es ergaben sich aus dieser Studie jedoch drei interessante Aspekte:

1. Der relative Anteil des Amilorid-sensitiven Potenzials am Gesamtpotenzial schien sich durch die Applikation von E2 und P zu vergrößern.

2. Es ergab sich die Möglichkeit, durch die Messung der Nasenpotenzialdifferenz sowie des Amilorid-sensitiven Anteils in der ersten Lebenswoche eine Voraussage zum Entstehen einer bronchopulmonalen Dysplasie zu treffen.

3. Ein höherer Oxygenierungsindex ging mit einer niedrigeren Amilorid-sensitiven Nasenpotenzialdifferenz einher.

Barker et al. untersuchten 31 Frühgeborene mit einem Gestationsalter von maximal 30 Schwangerschaftswochen [8]. Sie untersuchten den Zusammenhang von NP, Asnpd und Aisnpd mit RDS und kamen zu dem Ergebnis, dass Kinder mit RDS weniger negative NP aufweisen (-16,5 $\pm$ 0,6 mV) als lungengesunde Frühgeborene (-22,2 $\pm$ 1,3 mV), die ein ähnliches NP haben wie gesunde Erwachsene [2, 51]. Die Amilorid-sensitive Nasenpotenzialdifferenz war in der RDS-Gruppe mit 3,8 $\pm$ 0,2 mV ($\widehat{=}$ 29,5% $\pm$ 0,8%) kleiner als in der Nicht-RDS-Gruppe (6,1 $\pm$ 0,6 mV, $\widehat{=}$ 38,6% $\pm$ 0,5%). Die Aisnpd war in beiden Gruppen ähnlich [8]. Barker et al. zeigten auch, dass die gemessenen Potenziale vom Geburtsgewicht und Gestationsalter abhängig sind. Das könnte erklären, warum die Frühgeborenen in der hier durchgeführten Studie mit -10,32 mV (Placebogruppe) bzw. -10,04 mV (Hormongruppe) eine erheblich weniger negative Nasenpotenzialdifferenz aufwiesen. Die hier gemessene Amilorid-sensitive Potenzialdifferenz lag bei 6,07 mV ($\widehat{=}$ 54,2%) in der Placebogruppe bzw. 6,51 mV ($\widehat{=}$ 60,2%) in der Hormon-behandelten Gruppe und war damit insgesamt als auch prozentual größer als bei den Probanden der Barker-Studie. Dahingegen konnte in einer Gruppe von Frühgeborenen mit 29 - 36 Schwangerschaftswochen, ebenso wie in der hier untersuchten Kohorte, keine Abhängigkeit von NP und Asnpd vom Gestationsalter festgestellt werden [17]. Jedoch waren die Werte dieser reiferen Kinder deutlich höher, was indirekt doch eine Beziehung zum Gestationsalter, wie auch von Barker gezeigt [8] nahe legt. Eine Abhängigkeit der NP vom postnatalen Alter konnte hier, im Gegensatz zu Barker, der zeigte, dass die Nasenpotenzialdifferenz in der ersten Lebenswoche negativer wird, nicht festgestellt

werden. Es ist denkbar, dass der zu erwartende postnatale Anstieg sich aufgrund der extremen Unreife der Kinder in der hier vorliegenden Studie erst später einstellt.
Der Geburtsmodus hat nach der Studie von Gaillard [17] keinen Einfluss auf die NP, hingegen konnte eine Arbeitsgruppe um Gowen zeigen, dass die Nasenpotenzialdifferenz negativer und der Amilorid-sensitive Anteil bei reifen Neugeborenen mit transitorischer Tachypnoe kleiner ist als bei gesunden Neugeborenen [19]. Die transitorische Tachypnoe wird durch eine verzögerte Flüssigkeitsresorption verursacht. Prädisponiert sind Kinder, die per Sectio geboren wurden, also Kinder, die rasch geboren wurden, und denen so nicht genügend Zeit zur pulmonalen Umschaltung von Flüssigkeitssekretion zu -absorption blieb. Als Ursache wird das Fehlen einer durch die Wehen ausgelösten kindlichen Katecholaminsekretion diskuitert.
Vielleicht wäre es interessant gewesen, ob die Probanden Katecholamine benötigten. Eine Studie zeigt, dass Dopamin über D_1-Rezeptoren die Rückbildung des Lungenödems via transskriptioneller Aktivierung der Na^+, K^+-ATPase fördert [9] und so einen Einfluss auf die Absorptionsvorgänge und die gemessenen Potenziale haben könnte. Die Behandlung mit Hydrocortison, das ebenfalls den Na^+-Transport steigert [16], zur Blutdrucksteigerung wurde erfasst, es konnte jedoch kein Einfluss auf die gemessenen Potenziale nachgewiesen werden.

4.2 Der ENaC und sein Zusammenhang mit der Potenzialdifferenz

Dass der Ionentransport über ENaC für die postnatale Flüssigkeitsclearance wichtig ist, verdeutlichen Knock-out-Experimente von Hummler et al. [27] an Mäusen. Neugeborene αENaC-knock-out-Mäuse, deren αENaC-Gen inaktiviert war, waren nach der Geburt atem-insuffizient und starben alle innerhalb von 40 Stunden nach der Geburt an respiratorischer Insuffizienz. Es kann daher angenommen werden, dass sie nicht in der Lage waren, die Flüssigkeit aus der Lunge zu absorbieren [27]. Neugeborene Meerschweinchen, die vor dem ersten Atemzug eine intratracheale Applikation von Amilorid, welches den ENaC blockiert, erhielten, zeigten dosisabhängig klinische Zeichen der Atemnot und hatten einen höheren Wassergehalt der Lunge als Tiere, denen nur die Trägerlösung appliziert wurde [47].
Aber nicht nur klinisch, sondern auch elektrophysiologisch wird die Bedeutung des αENaC durch die knock-out-Experimente erkennbar, denn in post mortem entnommenen

kultivierten Trachealzysten dieser αENaC-knock-out-Tiere war keine Amilorid-sensitive Potenzialdifferenz messbar, wohingegen dies bei (+/+)- oder (+/-)-Tieren möglich war. Die gemessene gesamte Potenzialdifferenz von (-/-)-Mäusen war kleiner als bei den anderen beiden Gruppen [27]. Die Folgerung aus diesen Tierexperimenten ist, dass der ENaC eine wichtige Funktion für die alveoläre Flüssigkeitsabsorption hat und dass sich seine Aktivität als Amilorid-sensitive Potenzialdifferenz messen lässt [14].

Die Expression und die Aktivität des ENaC sind durch verschiedene Faktoren zu beeinflussen: Bei Ratten nimmt die Expression der αENaC-mRNA ab dem 17. Gestationstag zu und diese ist auch postnatal und bei adulten Ratten weiterhin nachweisbar. Werden Rattenfeten ab dem 18. Gestationstag mit einer Kombination aus TRH und Dexamethason behandelt, dann steigt die αENaC-Expression [48], aber nicht die β- oder γENaC-mRNA in der fetalen Rattenlunge signifikant an [76]. Auch eine zweitägige Dexamethasongabe zwischen dem 17. und 19. Gestationstag allein führt zur vermehrten αENaC-mRNA-Bildung der fetalen Rattenlunge [76]. Der perinatale Anstieg des αENaC-mRNA-Gehalts bei Meerschweinchen verläuft parallel zum Anstieg des Cortisolplasmaspiegels, der rund um den Zeitpunkt der Geburt am größten ist. Die αENaC-Expression fällt bei Inhibition der Cortisolsynthese mit Metyrapon geringer aus. Mit dem Anstieg der αENaC-mRNA nimmt auch die durch Amilorid hemmbare Komponente der Flüssigkeitsclearance der Lunge zu. Diese Studien lassen den Schluss zu, dass die drei Untereinheiten des ENaC unterschiedlich reguliert werden und die α-Untereinheit den entscheidenden Beitrag zum Absorptionsvorgang liefert. Die Spiegel von αENaC-mRNA steigen postnatal bei frühgeborenen und termingeborenen Tieren, die per Sectio geborenen werden, signifikant an, wohin gegen die Spiegel von vaginal geborenen Tieren nur pränatal und nicht postnatal weiter ansteigen. Diese Tatsache lässt vermuten, dass es alternative Wege zur Steigerung der Amilorid-sensitiven Flüssigkeitsabsorption in der Lunge gibt [7]. Aldosteron erhöht ebenfalls die Menge an αENaC-mRNA und steigert wie auch Terbutalin, ein β_2-Agonist, die Permeabilität der apikalen Membran für Na^+-Ionen [42]. Auch der Sauerstoffanteil der Luft beeinflusst den ENaC. An Kulturen fetaler distaler Lungenepithelzellen von Ratten wurde der Kurzschlussstrom (I_{sc}) und dessen Amilorid-sensitiver Anteil (I_{Amil}) gemessen. I_{sc} war in Kulturen, die unter 20% O_2 gezüchtet worden waren, signifikant höher als in unter Hypoxiebedingungen gewachsenen Kulturen.

In Cl^--freier Lösung war der I_{sc} leicht erniedrigt und komplett durch die Zugabe von Amilorid zu blockieren, was folgern lässt, dass der I_{sc} hauptsächlich durch ENaC-vermittelten Na^+-Transport verursacht wird. In Zellkulturen, die mit Corticosteron inkubiert worden waren, waren I_{sc} und I_{Amil} in Cl^--freier Lösung unabhängig vom Sauerstoffgehalt der Luft steigerbar [77]. Zellen, die unter Hypoxie und mit Corticosteron kultiviert wurden, exprimierten alle drei ENaC-Untereinheiten in geringerer Menge [77].

Die Messung der Potenzialdifferenz, als Maß für die Aktivität des ENaC, wurde von Otulakowski et al. [51] durchgeführt. Sie haben den Zusammenhang zwischen dem Gehalt der ENaC-Untereinheiten-mRNA und der nasalen transepithelialen Potenzialdifferenz bei acht gesunden Männern untersucht. Sie erhielten eine maximale Potenzialdifferenz (PD) von -25 ($\pm$ 2) mV, der Amilorid-sensitive Anteil betrug 73% ($\pm$ 3%). Es zeigte sich, im Gegensatz zum Mausexperiment, keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Potenzialdifferenz und der α- bzw. β-Untereinheit-mRNA, jedoch eine negative Korrelation der γ-ENaC-mRNA und der gemessenen Potenzialdifferenz [51]. Über die physiologische Relevanz des Zusammenhangs zwischen Potenzialdifferenz und γ-ENaC-mRNA ist bisher nichts bekannt.

Beim Menschen wurde in einer allerdings nur qualitativen Analyse gezeigt, dass die α-ENaC-Untereinheit bereits in der frühen Embryonalentwicklung in der humanen fetalen Lungenknospe exprimiert wird und dass sie sowohl in der gesunden Lunge als auch bei RDS in ähnlicher Verteilung nachweisbar ist [67]. Eine aktuelle Studie dagegen konnte nachweisen, dass der Gehalt an α-, β- und γ-ENaC-mRNA bei Frühgeborenen von im Durchschnitt 27 Schwangerschaftswochen mit RDS geringer ist als bei Termingeborenen ohne Lungenerkrankung [21]. Hierzu passt die Beobachtung, dass Neugeborene, die an RDS leiden, eine geringere Asnpd zwischen dem respiratorischen Epithel und dem subkutanen Gewebe aufweisen [8]. Dies widerspricht jedoch den Ergebnissen von Otulakowski, die eine negative Korrelation der γ-ENaC-mRNA und der gemessenen Potenzialdifferenz aufzeigten. Somit wird deutlich, dass weitere Untersuchungen notwendig sind, um die komplexen Zusammenhänge zwischen den ENaC-Untereinheiten, ihrer Regulation, ihrem Einfluss auf die Potenzialdifferenz und dem Atemnotsyndrom zu verstehen.

4.3 Messmethodik

In der Literatur wird häufig eine subkutane Lage der Referenzelektrode beschrieben [2, 8, 30, 19]. Southern et al. [71] zeigten, dass der Anschluss der Referenzelektrode nicht zwingend subkutan sein muss, sondern auch ein i. v. - Katheter eine valide Verbindung zur Referenzelektrode darstellt und so das Nadelstichtrauma bei kleinen Kindern umgangen werden kann. Sie verwendeten ebenfalls, wie in der oben beschriebenen Technik, einen einlumigen Katheter, der gleichzeitig der Perfusion und der Elektrodenverbindung diente. Diese Gruppe zeigte auch, dass die Perfusionsgeschwindigkeit des Nasenkatheters niedriger gewählt werden kann, als man sie bei Messungen an Erwachsenen typischerweise wählt, und so die Irritation des Kindes durch herab tropfende Flüssigkeit verringert werden kann.
Das gemessene Potenzial spiegelt evtl. nicht exakt das tatsächliche Potenzial der Nasenschleimhaut wieder, da der Nullabgleich der Elektroden in Ringerlösung erfolgt, jedoch die Referenzelektrode an die Patienteninfusion, die nicht zwangsläufig Ringerlösung enthält, angeschlossen wurde. In der Regel war die verwendete Infusion ein mit NaCl-Lösung gefüllter Nabelarterienkatheter, nur wenn der Proband keinen Nabelarterienkatheter hatte, wurde auf einen anderen i. v. - Zugang zurückgegriffen, dessen enthaltene Elektrolyte, Zucker oder Fette die Leitfähigkeit verändern könnten, wenn diese Lösung die Referenzelektrode durch Diffusion erreicht. Die Diffusionsvorgänge geschehen langsam (siehe Kapitel 2.7), folglich sollte sich das Potenzial durch Rückdiffusion anderer Lösungen kaum ändern. Diese möglicherweise durch Rückdiffusion verursachte Drift wurde aber durch das Messen der Potenzialänderung der Ag^+/AgCl - Halbzellen am Ende der Messung aufgezeichnet und damit in der Auswertung berücksichtigt. Die in der Literatur ebenfalls gebräuchliche Trennung mittels Agar als Salzbrücke [19] wurde, da die Referenzelektrode an einen zentralen Katheter angeschlossen wurde, aus hygienischen Gründen nicht verwendet.
Es besteht des Weiteren ein Problem durch die Potenzialänderung der Ag^+/AgCl-Halbzelle während der Messung. Dieses Problem der „baseline drift“ ist bekannt [8]. Mit dem gewählten Messaufbau ist es nicht möglich, parallel zur stattfindenden Messung diese Potenzialänderung aufzuzeichnen. Deshalb wurde in Messungen ohne Proband eine Aufzeichnung der Potenzialdifferenzänderung der Ag^+-/AgCl-Halbzelle durchgeführt. Hieraus ging hervor, dass die Potenzialdifferenzänderung zu Beginn der Messung am größten ist und gegen

Ende der Messung abflacht. Also ist zu dem Zeitpunkt, in dem auch die Messbereiche ausgewählt werden, annähernd ein Fehler in der Größe der zum Messende gemessenen baseline drift vorhanden. Diese baseline drift wurde daher in der Auswertung der Messdaten und der Berechnung der Asnpd berücksichtigt.

Außerdem gibt es in der Literatur Hinweise darauf, dass Silberionen, die von der Messelektrode in Lösung gehen, das Potenzial beeinflussen [33]. Im unter Kapitel 2.7 beschriebenen Messaufbau wurde die Ringerlösung an der Ag^+/AgCl - Halbzelle der Messelektrode entlang gelenkt, so dass trotz der hohen Chloridkonzentration geringe Mengen an Silberionen in Lösung gehen können: Bei der verwendeten Ringerlösung mit einer Chloridkonzentration c(Cl^-) von 156 mmol/l und dem Löslichkeitsprodukt (Lp) von $1,78 \cdot 10^{-10}$ mol^2/l^2 [37] ergibt sich mit

$$Lp = c(Ag^+) \cdot c(Cl^-)$$

eine Silberkonzentration c(Ag^+) von maximal $1,14 \cdot 10^{-9}$ mol/l in einer stehenden Lösung. Klyce et al. beobachteten jedoch nur mit Silberionenkonzentrationen von mindestens 10^{-7} mol/l einen Anstieg des Kornealpotenzials, die ED_{50} (Dosis in der Häufigkeitsverteilungskurve, bei der in 50% der Fälle eine Wirkung eintritt) lag bei $2,0 \cdot 10^{-6}$ mol/l [33]. Trotzdem wurde der Messaufbau ab Proband Nr. 72 so verändert, dass die Perfusionslösung nicht mehr an der Ag^+/AgCl - Halbzelle vorbeifloss. Im neuen Messaufbau wurde die Leitung mit der Messelektrode als Seitenarm angekoppelt, so dass Silberionen nur noch durch die, wie oben beschrieben, langsameren Diffusionsvorgänge die perfundierende Leitung erreichen konnte (Abbildungen 5, 6).

Um die zu erwartende Silberionenkonzentration zu berechnen, wurde auf das 2. Fick´sche Gesetz zurückgegriffen, das als eine Differentialgleichung 2. Ordnung eine Beziehung zwischen zeitlichen und örtlichen Konzentrationsunterschieden darstellt:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \cdot \Delta c$$

mit c = Konzentration, D = Diffusionskoeffizient, t = Zeit.

Eine Standardlösung dieser Differentialgleichung erhält man unter der Annahme, dass am Ort x = 0 unbeschränkt Atome zur Diffusion bereit stehen. Der Ort x = 0 ist im gegebenen Fall die Silber/Silberchloridelektrode, von der Silberionen mit der nach dem Löslichkeitsprodukt

maximal möglichen Konzentration von $c_0 = 1,14 \cdot 10^{-9}$ mol/l in Lösung gehen und so zur Diffusion zur Verfügung stehen. Die Konzentration an der Nasenschleimhaut lässt sich als Konzentration am Ort x (c(x)) berechnen, in dem die Gleichung nach c(x) aufgelöst wird [15].

$$c(x) = c_0 \cdot \left(1 - erf\left(\frac{x}{\sqrt{(D \cdot t)}}\right)\right)$$

Der Diffusionskoeffizient ist mit der Einstein-Beziehung definiert als [5]:

$$D = \frac{u \cdot R \cdot T}{z \cdot F}$$

Mit den Naturkonstanten R (Gaskonstante 8,314510 J/(mol · K)) und F (Faradaykonstante 9,6485309 $\cdot 10^4$ C/mol) [38], der Ionenmobilität von Silber u = 6,4 $\cdot 10^{-8}$ cm^2/Vs [75], der Ladung von Silberionen z = 1 und der Temperatur T = 310K = 37 °C errechnet sich D zu $1,71 \cdot 10^{-9} m^2/s$. Die maximale Messdauer (t) betrug 55 Minuten, entsprechend 3300 Sekunden.

Die Konzentrationen, die man bei der Berechnung (durchgeführt mit *Maple*, Version 7.00®) erhält, sind sehr gering (Abbildung 19).

Beispielsweise ergibt sich im Abstand von einem Zentimeter von der Silber/Silberchloridelektrode nach 3300 s eine Konzentration von $0,296 \cdot 10^{-17}$ mol/l. Oder: in 3300 s Diffusionszeit diffundieren Silberionen so langsam, dass die mit *Maple 7.00*® minmal berechenbare Konzentration von 10^{-25} mol/l nach einer Diffusionsstrecke x von nur 1,397 cm von der Elektrode erreicht wird. Die Strecke zwischen Silber/Silberchloridelektrode und Nasenschleimhaut betrug während den Messungen jedoch 25 cm, so dass die Silberkonzentration mit dem neuen Messaufbau (Abbildung 5) um ein mehr als 10 Zehnerpotenzen geringer als bei Klyce [33] und damit vernachlässigbar gering sind.

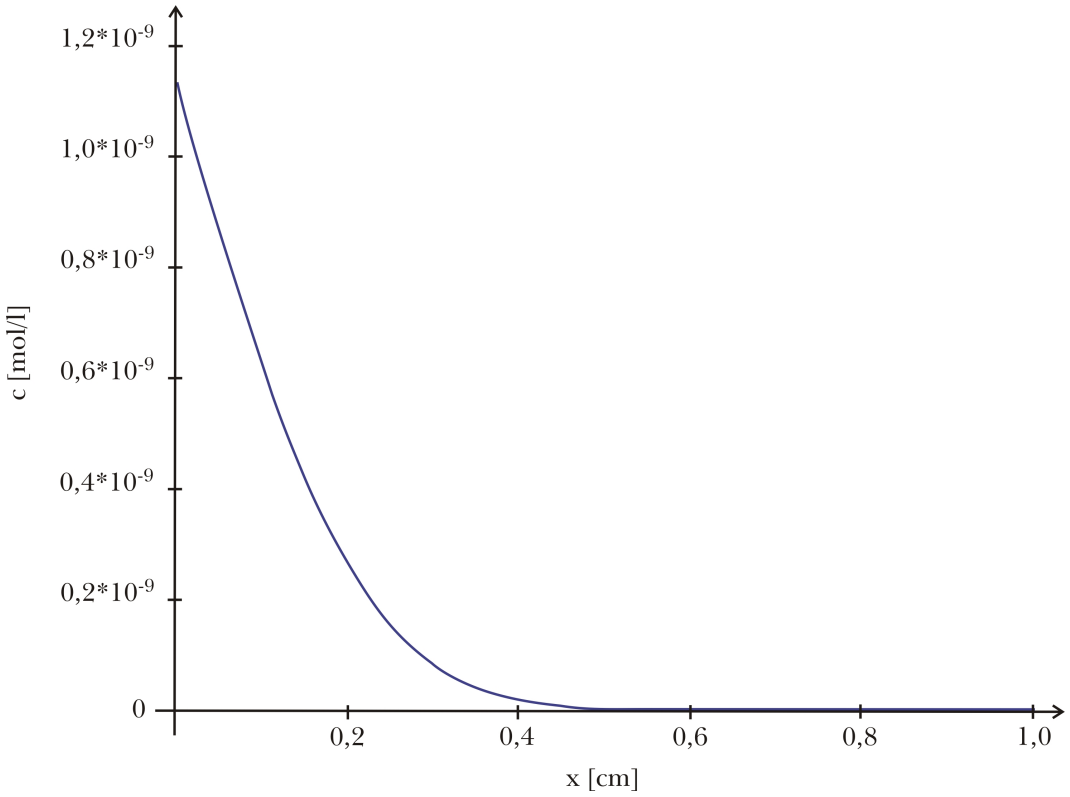

Abbildung 19: Silberionenkonzentration c in Abhängigkeit vom Ort x

4.4 Medikamente

Es wurden während dieser Studie die drei Substanzen Östradiol, Progesteron und Amilorid appliziert. Ihre Wirkungen und ihre Pharmakokinetik sollen im Folgenden erörtert werden.

4.4.1 Östradiol und Progesteron

Sekretion und physiologische Wirkungen:

Östrogene werden im Ovar unter der Regulation des hypothalamisch-hypophysären Systems mit zyklischen Schwankungen gebildet. In der Schwangerschaft steigt die Sekretion [45], und Östrogen wird dann auch von der Plazenta in zunehmender Menge produziert. Es führt unter anderem zur Ausbildung der primären und sekundären weiblichen Geschlechtsmerkmale, zu Wachstum von Uterus und Brust, zur gesteigerten Durchblutung der Plazenta in der Schwangerschaft [59] und zu Calcium-Einlagerung in den Knochen sowie zum Schluss der Epiphysenfuge im Knochen in der Pubertät. Die beim Erwachsenen bekannten Einflüsse auf

die Geschlechtsorgane, die regulatorischen Hormone und den Knochenstoffwechsel wurden auch bei Frühgeborenen untersucht (siehe unten).

Progesteron wird in der Follikelphase in geringen und in der Gelbkörperphase in größeren Mengen sezerniert. In der Schwangerschaft wird es zunächst vom Corpus luteum, ab ca. der 5. SSW von der Plazenta [65] in vielfach größeren und mit der Dauer der Schwangerschaft ansteigenden Mengen produziert [65, 62], um die Schwangerschaft aufrecht zu erhalten.

Progesteron wirkt unter anderem auf die Sekretionsphase des Endometriums, hemmt die LH-Ausschüttung der Hypophyse und damit die Ovulation, fördert die Drüsenbildung in den Mammae und verringert das Ansprechen der Uterusmuskulatur auf Oxytocin [45]. Bei Neugeborenen sind zwei weitere Effekte von Progesteron bekannt: die Brustdrüsenschwellung und die Entzugsblutung gegen Ende der ersten Lebenswoche [58].

Es wird vermutet, dass Östrogen und Progesteron andere Mediatoren, die bei der Geburt eine Rolle spielen, wie z. B.Prostaglandine und Oxytocin, modulieren [65].

Durch Studien bekannte Effekte bei Neugeborenen:

Shanklin et al. führten eine klinische Studie an 287 Neugeborenen durch, um die Effekte einer einmaligen i. m.-Injektion von 8 mg/kg Östrogen auf die Häufigkeit des Atemnotsyndroms, die Morbidität und Mortalität zu untersuchen. Die Dosis war auf Grund der bekannten Ausscheidung von Östrogen in den Urin pro Tag und voran gegangener Tierexperimente, die keine toxischen Effekte bei dieser Dosierung ergaben, gewählt worden. Die Probanden erhielten in der ersten Lebensstunde eine i. m.-Injektion von 8 mg/kg Östrogen oder der Trägerflüssigkeit als Placebo. Es zeigte sich eine Reduktion der Häufigkeit des Atemnotsyndrom auf ca. ein Drittel nach Östrogeninjektion. Männliche Neugeborene, die Östrogen erhielten, hatten eine geringere Morbidität und Mortalität als die Jungen der Placebogruppe. Für weibliche Neugeborene ergab sich eine Reduktion der Morbidität, aber keine Veränderungen bei der Mortalität. Die Effekte waren um so deutlicher, je früher die Östrogengabe erfolgte [64].

In einer kontrollierten Pilotstudie wurden 30 weibliche Frühgeborene mit einem Gestationsalter von weniger als 29 Schwangerschaftswochen und einem Geburtsgewicht von weniger als 1000 g nach der Geburt randomisiert und erhielten dann entweder eine Östradiol- und Progesteron-haltige Lipidemulsion oder eine hormonfreie Lipidemulsion. Ziel hierbei war,

in der Verumgruppe Hormonspiegel im kindlichen Blut zu erreichen, wie sie intrauterin vorkommen. Es wurden Beobachtungen an verschiedenen Organen dokumentiert:

- Einfluss von E2 und P auf Uterus und Brustdrüsen:
  Das Uterusvolumen nahm während der Substitution zu und das Uterusbreitenwachstum der Probanden entsprach dem bei normalen Schwangerschaften intrauterin gemessenem Wachstum. Hormon-Substituierte Frühgeborene hatten einen größeren Brustdrüsendurchmesser als die Probanden der Placebogruppe. Nach Beendigung der Substitution verkleinerten sich sowohl Uterus als auch die Brustdrüse wieder [85].

- Einfluss von E2 und P auf die regulatorischen Hormone:
  Während der Substitution waren die Plasmaspiegel von FSH und LH in der Hormonsubstitutionsgruppe signifikant niedriger als in der Placebogruppe [80].

- Einfluss von E2 und P auf die Knochenmineralisation:
  Die Knochenmineralisation wurde mittels Photonenabsorptionsdensometrie bestimmt. Die höchste Mineralisation war in der Verumgruppe bei Probanden mit suffizienter Kalzium- und Phosphatversorgung zu finden (Unterschied nicht statistisch signifikant) [82].

- Einfluss von E2 und P auf die Inzidenz chronischer Lungenerkrankungen:
  Keines der Kinder, die E2 und P erhalten hatten, entwickelte eine chronische Lungenerkrankung, wohingegen dies bei vier Probanden (29%) der Placebogruppe der Fall war ($p = 0{,}097$) [80].

Unerwünschte Wirkungen von E2 und P wurden nicht beobachtet.
Bei einer Nachuntersuchung dieser Probanden im korrigierten Alter von 15 Monaten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Studiengruppen, aber es konnten die folgenden Trends aufgezeigt werden [83]:

- Einfluss von E2 und P auf das Knochenalter:
  Das Knochenalter der Hormon-Substituierten Probanden entsprach dem korrigierten Alter, jedoch lag das Knochenalter der Placebogruppe im Durchschnitt um 1,7 Monate zurück (Unterschied nicht statistisch signifikant).

- Einfluss von E2 und P auf die mentale und psychomotorische Entwicklung:
  Zur Beurteilung der Entwicklung wurde der Bayley scale of infant development verwendet. Die Probanden, die E2 und P erhalten hatten, hatten einen mentalen und psychomotorischen Entwicklungsindex von durchschnittlich 89 bzw. 101. Bei den Probanden der Kontrollgruppe lag der mentale Entwicklungsindex mit 93 knapp über dem der Hormon-Behandelten Gruppe, aber der psychomotorische Entwicklungsindex mit 71 deutlich unter dem der E2-P-substituierten Kinder (Unterschiede nicht statistisch signifikant).

Durch Studien bekannte Effekte bei Tieren:

Zeitlin et al. zeigten an Zellkulturen des Trachealepithels von Kaninchen, dass Zellen von nicht-trächtigen Kaninchen Natrium-Ionen absorbieren, wohingegen fetale Zellen Chlorid sezernierten [87]. Zellen von trächtigen Kaninchen wiesen Chloridsekretion und Natriumabsorption auf. Um den Einfluss von Östrogen und Progesteron auf das veränderte Sekretionsverhalten zu untersuchen, wurden tracheale Zellen nicht-trächtiger Kaninchen mit verschiedenen Östrogen-Progesteron-Kombinationen für sieben Tage kultiviert. Bei einem Verhältnis von Progesteron zu Östrogen von 600:1 stieg die Chloridsekretion an und Natriumabsorption sank ab, so dass die Ionen-Transportvorgänge in dieser Zellkultur derjenigen bei Zellen fetalen oder trächtigen Ursprungs ähnelte [87].

Weitere Untersuchungen zur Absorption von Natrium, der Aktivität des epithelialen Natriumkanals und dem mRNA-Gehalt der Rattenlunge wurden von einer Arbeitsgruppe um Sweezey durchgeführt [72]. Sie konnten zeigen, dass weibliche nicht-trächtige Ratten mehr αENaC-mRNA haben als weibliche trächtige oder männliche. Der Gehalt an βENaC war abhängig davon, ob das Rattenweibchen trächtig war und in welcher Zyklusphase es sich befand. Die γENaC-Menge war unabhängig von Geschlecht, Trächtigkeit und hormonellem Zyklus. Unreife Rattenweibchen erhielten eine kombinierte Injektion von Progesteron und Östradiol subkutan. Es zeigte sich ein Anstieg der αENaC-mRNA acht Stunden nach der Injektion, ein Anstieg der γENaC-mRNA nach 48 Stunden bei Tieren, die Progesteron und Östradiol im Verhältnis 500:1 bis 750:1 injiziert bekommen hatten. Es gab jedoch keinen Unterschied in Bezug auf die Aktivität des ENaC, gemessen als Amilorid-sensitiver Kurz-

schlussstrom der Zellen, die von Hormon-Behandelten Tieren bzw. den Tieren der Placebogruppe isoliert wurden. Wurden jedoch Zellen von bisher nicht behandelten Tieren fünf Tage lang in Progesteron- und Östradiol-haltiger Lösung inkubiert, dann nahm der Amilorid-sensitive Kurzschlussstrom dosisabhängig mit dem αENaC-mRNA-Gehalt zu.[72].

Pharmakokinetische Aspekte:

Steroidhormone werden bei oraler Applikation im Darm resorbiert und durchwandern den enterohepatischen Kreislauf. Die Hormone unterliegen einem first-pass-effect, die gebildeten Metabolite werden vorwiegend über die Niere ausgeschieden. Bei Umgehung der Leber durch dermale, i. m. - oder i. v. - Applikation können daher geringere Dosen verwendet werden, so dass weniger östrogenbedingte Nebenwirkungen auftreten. Wegen der besseren Steuerbarkeit ist die intravenöse Gabe gegenüber der dermalen bzw. intramuskulären Verabreichung zu bevorzugen. Das Problem hierbei liegt in der Verfügbarkeit einer zur i. v. -Applikation bestimmten E2/P-haltigen Lösung. Trotter et al. fanden eine Möglichkeit, ausreichende Mengen an E2 und P in einer Fettemulsion zu lösen [81, 84].

Geschlechtsspezifische Unterschiede der Hormonkonzentrationen bei Neugeborenen und Dosierung der Hormone:

Männliche Neugeborene weisen signifikant höhere Progesteron- und 17-Hydroxyprogesteron-Spiegel im Nabelschnurblut auf als weibliche Neugeborene. Dies geht aus einer Studie von Sippel et al. hervor, die das Blut von 12 gesunden Müttern und ihren Neugeborenen nach unauffälliger Schwangerschaft und spontaner Entbindung untersuchten [66]. Antonipillai kam zu gegenteiligen Ergebnissen [3]. Es gibt folglich keine gesicherten Erkenntnisse, die zu einer unterschiedlichen Dosierung bei Jungen und Mädchen Anlass geben.

4.4.2 Amilorid

Wirkungen von Amilorid:

Amilorid ist ein Pyrazinoylguanidinderivat und wird therapeutisch meist in Kombinationspräparaten mit anderen Diuretika als kalium-sparendes Diuretikum eingesetzt. Es wirkt in

der Niere an den luminalen Membranen der Hauptzellen im spät-distalen Tubulus und im Sammelrohr über eine Blockade der epithelialen Na^+-Kanäle (ENaC). Die Na^+-Kanäle transportieren Na^+ entlang eines von der basalen Na^+, K^+-ATPase erzeugten Gradienten nach intrazellulär und über die Na^+, K^+-ATPase weiter ins Interstitium, wodurch negative Ladungen zurückgelassen werden und eine lumen-negative transepitheliale Potenzialdifferenz entsteht. Diese ist der Motor für die Sekretion von K^+ und H^+. Werden die Na^+-Kanäle blockiert, erhöht sich die Ausscheidung von Na^+ um ca. 2% der gefilterten Menge und die Ausscheidung von K^+, H^+ und anderen Kationen wie Mg^{2+} und Ca^{2+} wird verringert [28]. Amilorid hat diese Wirkung nicht nur an renalen ENaC, sondern auch an Na^+-Kanälen in der Nasenschleimhaut und der Lunge [47]. Bei nasaler Applikation werden ebenfalls die ENaC blockiert und die lumen-negative transepitheliale Potenzialdifferenz sinkt. Diese Wirkung wurde bei den Messungen im Rahmen dieser Arbeit genutzt.

In höheren Konzentrationen werden auch die Transportprozesse von Na^+/H^+-Antiportern und Na^+/Ca^{2+}-Antiportern beeinflusst [52].

Die Wirkung von inhalativ appliziertem Amilorid auf Schleimhäute des Respirationtraktes kann auch verwendet werden, um die Clearance des Respirationstrakts bei CF zu steigern [4]. Bei CF wird ein zäheres Sekret gebildet, da durch den Mangel an funktionstüchtigem CFTR eine gesteigerte Na^+-Permeabilität durch ENaC resultiert und damit Natrium vermehrt absorbiert wird. Dadurch sinkt der Salzgehalt und damit der Wassergehalt von Sekreten [11]. Inhalation einer 10^{-3} M Amilorid-Lösung 4x/d über einen Zeitraum von 25 Wochen führt zu einer gesteigerten Konzentration von Natrium-Ionen und Chlorid-Ionen im Sputum [79] und so zur Verflüssigung des Schleims [11].

Pharmakokinetik:

Amilorid wird nach oraler Gabe zu 15-25% resorbiert und überwiegend über die Niere unverändert ausgeschieden [28]. Die Halbwertszeit von Amilorid beträgt nach oraler Applikation je nach Literaturangabe 6 - 21 Stunden [28, 52], nach Inhalation an der Oberfläche der Bronchien nur 35 - 40 Minuten [52]. Bei den hier durchgeführten Messungen mit etwa 48 Stunden Abstand und lokaler Applikation sollte daher kein Effekt der vorhergegangen Amiloridapplikation mehr vorhanden gewesen sein.

Applikation und Wirkung von Amilorid in dieser Studie:

Die therapeutische Dosierung von Amilorid als Diuretikum liegt bei 2,5 - 10 mg/d [46], entsprechend bis zu 0,14 mg/kg für einen Erwachsenen mit 70 kg Körpergewicht. Wie bereits im Kapitel 3.3 dargestellt, wurden in dieser Studie maximal 70 μg Amilorid pro Messung appliziert, was bei einem mittleren Geburtsgewicht von 0,65 kg 0,107 mg/kg Amilorid entspricht. Die Elektrolyte wurden routinemäßig kontrolliert und der Bedarf über die parenterale Ernährung zugeführt. Eine potentielle Gefährdung des Kindes durch Beeinflussung des Elektrolyt- und Wasserhaushalts konnte so ausgeschlossen werden.

4.5 Epithel der Nase und der tieferen Atemwege

Es wurden folgende Gemeinsamkeiten von Nasen- und Luftwegsepithelien aufgezeigt: Zylinderepithel, ähnliche Zelltypen [34], ähnliche Zusammensetzung des Oberflächensekrets [39], vergleichbare mukoziliäre Clearance [56]. Gowen folgert, dass Studien an Nasenepithelien zum Verständnis der Funktion der tieferen Atemwege beitragen können und er beschrieb den Zusammenhang zwischen der Potenzialdifferenz und dem Vorhandensein Zilientragender Zellen, konnte aber nicht erklären, warum bei gleich bleibender Anzahl Zilientragender Zellen in der Nase die Potenzialdifferenz im Alter absinkt [34]. Er konnte des Weiteren zeigen, dass die Messung der Potenzialdifferenz in den tieferen Atemwegen zur Diagnose einer CF den bekannten Unterschied in der PD in der Nase zwischen Gesunden und CF-Patienten wiederspiegelt [35]. Eine Arbeitsgruppe um Knowles hat die Amilorid-sensitiven Potenzialdifferenzen entlang des Respirationstrakts gemessen und kam hierbei zu dem Ergebnis, dass das Potenzial von der Trachea zu den distalen Segmenten der Bronchien hin absinkt [36].
Messungen des mRNA-Gehalts der ENaC-Untereinheiten in nasalem, bronchialem und alveolarem humanem Gewebe haben gezeigt, dass der Gehalt der mRNA der einzelnen Untereinheiten im Respirationstrakt variiert. Der relative Anteil der β- und γ-ENaC-mRNA in Bezug auf den Gehalt an α-Untereinheit-mRNA nimmt vom proximalen zum distalen Respirationstrakt hin zu [55].
Gowen et al. [18] konnten zeigen, dass die epitheliale Potenzialdifferenz von Neugeborenen mit CF größer ist als bei gesunden. Außerdem hatten Neugeborene mit transistorischer Tachypnoe eine negativere und Patienten mit RDS eine positivere Nasenpotenzialdifferenz.

Aus dem Zusammenhang zwischen der klinischen Lungenfunktion und den gemessenen Potenzialdifferenzen folgern sie, dass die Messung der nasalen epithelialen Potenzialdifferenz als nicht-invasive Technik zur Beurteilung der Ionen-Transportvorgänge in den oberen und unteren Atemwegen genutzt werden könnte [18].

4.6 Schlussfolgerung

Die Messung der Nasenpotenzialdifferenz bei extrem kleinen Frühgeborenen mit der verwendeten Technik ist möglich. Durch die postnatale Substitution von Östradiol und Progesteron bei extrem kleinen Frühgeborenen werden das Nasenpotenzial sowie der Amilorid-sensitive Anteil nicht signifikant vergrößert. Kleinere Veränderungen können nicht ausgeschlossen werden. Allerdings zeigte sich, dass Kinder, die später eine bronchopulmonale Dysplasie entwickeln, bereits in der ersten Lebenswoche geringere Amilorid-sensitive Nasenpotenziale aufweisen. Außerdem scheint sich durch die Substitution der Hormone der Amilorid-sensitive Anteil des Nasenpotenzials zu vergrößern. Die in dieser Studie gemessenen Nasenpotenzialdifferenzen waren geringer als die in der Literatur für diese Probandengruppe gefundenen, und der Amilorid-sensitive Anteil war größer. Des Weiteren ergaben sich Hinweise darauf, dass die gemessene Asnpd den Beatmungsbedarf wieder spiegelt. Durch die intravenöse Substitution von Östradiol und Progesteron, wobei keine unerwünschte Wirkungen beobachtet wurden, gelang es weitest gehend, Hormonkonzentrationen, wie sie intrauterin vorkommen, zu erzielen. Es wurde kein Unterschied in der Amilorid-sensitiven Nasenpotenzialdifferenz gefunden. Hierfür könnte auch die geringe Probandenanzahl, die bedingt ist durch die Angliederung dieser Studie an die Studie zum Zusammenhang zwischen der Hormonsubstitution und der Entwicklung einer bronchopulmonalen Dysplasie, verantwortlich sein. Denkbar ist auch, dass Östradiol und Progesteron die Atmung über andere, noch näher zu untersuchende, Wege, z. B. eine gesteigerte Surfactant-Produktion beeinflusst. Da dies die erste Studie ist, die den Zusammenhang der Hormone Östradiol und Progesteron auf die Nasenpotenzialdifferenz von Frühgeborenen untersucht, und diese an einem eher kleinen Kollektiv durchgeführt wurde, werden weitere Studien notwendig sein, die hier gefundenen Daten zu überprüfen und die Funktion und Regulation der Ionenkanäle vollständig zu verstehen.

5 Zusammenfassung

Trotz Surfactant-Therapie bleiben viele kleine Frühgeborenen ateminsuffizient und entwickeln eine chronische Lungenerkrankung. In vorangegangen Studien ergaben sich Hinweise darauf, dass eine postnatale Substitution von Östradiol und Progesteron mit dem Ziel, physiologische Hormonplasmakonzentrationen zu erreichen, wie sie im weiteren Verlauf der Schwangerschaft intrauterin vorkommen, die Inzidenz von chronischen Lungenerkrankungen verringert. Es ist bekannt, dass der epitheliale Natriumkanal, der bei der peripartalen Absorption der pränatal alveolär gebildeten Flüssigkeit eine wichtige Rolle spielt, durch Steroidhormone beeinflusst wird. Die Funktion dieses Kanals lässt sich durch den veränderten Ionen-Transport in einer veränderten transepithelialen Potenzialdifferenz messen. Da der epitheliale Natriumkanal nicht nur in den Alveolen, sondern auch in der Nasenschleimhaut exprimiert wird, kann die Aktivität dieses Amilord-sensitiven Natriumkanals wenig invasiv als Amilorid-sensitiver Anteil der Nasenpotenzialdifferenz gemessen werden. Die durchgeführte Doppelblindstudie untersuchte den Einfluss einer postnatalen Substitution von Östradiol und Progesteron auf die Amilorid-sensitive Nasenpotenzialdifferenz von extrem kleinen Frühgeborenen am ersten, dritten, fünften und siebten Lebenstag. Randomisiert wurden Kinder, die mit einem Geburtsgewicht von weniger als 1000 g (Mittelwert 640g) und einem Gestationsalter unter 29 Schwangerschaftswochen (Mittelwert 25+3 SSW) geboren wurden und innerhalb der ersten 12 Lebensstunden intubiert und beatmet werden mussten. Diese erhielten intravenös entweder eine Östradiol- und Progesteronhaltige oder eine hormonfreie Lipidemulsion, um so in der Verumgruppe dem weiteren Verlauf der Schwangerschaft entsprechend physiologische Hormonplasmakonzentrationen zu erzielen.

Durch die postnatale Substitution mit Östradiol und Progesteron konnten weitest gehend die erwünschten Plasmahormonkonzentrationen erzielt werden. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Amilorid-sensitiven Nasenpotenzialdifferenz von Hormon-behandelten (6,51 mV) und Placebo-behandelten (6,07 mV) Frühgeborenen (p=0,638). Auch die maximal negative Nasenpotenzialdifferenz war in den beiden Studiengruppen nicht signifikant verschieden (Verumgruppe -10,04 mV, Placebogruppe -10,32 mV, p=0,903) und die Probanden der Hormon-substituierten Gruppe litten nicht statistisch signifikant seltener an einer chro-

nischen Lungenerkrankung (p=0,462). Jedoch scheint sich durch die Hormonsubstitution der Amilorid-sensitive Anteil an der Gesamtpotenzialdifferenz zu vergrößern (Verumgruppe 62,6%, Placebogruppe 53,2%, p=0,028). Die gemessene Amilorid-sensitive Nasenpotenzialdifferenz ist bei Frühgeborenen, die mit niedrigerem Oxygenierungsindex beatmet werden, größer und spiegelt so den Beatmungsbedarf wieder. Des Weiteren scheint bei Kindern, die im weiteren Verlauf eine bronchopulmonale Dysplasie entwickeln, in den ersten Lebenstagen eine geringere Amilorid-sensitive Nasenpotenzialdifferenz messbar zu sein (p=0,036) und so könnte mit der Messung der Amilorid-sensitiven Nasenpotenzialdifferenz in den ersten Lebenstagen das Risiko der Entstehung einer chronischen Lungenerkrankung abgeschätzt werden. Zur Bestätigung dieser Hypothesen sind jedoch weitere Studien notwendig, denn diese Studie wurde an einem eher kleinen Kollektiv durchgeführt.

Literatur

[1] Alcorn, D., Adamson, T. M., Lambert, T. F., Maloney, J. E., Ritchie, B. C., Robinson, P. M.: Morphological effects of chronic tracheal ligation and drainage in the fetal lamb lung; J Anat, 123: 649-660, 1977

[2] Alton, E. W. F. W., Currie, D., Logan-Sinclair, R., Warner, J. O., Hodson, M. E. und Geddes, D. M.: Nasal potential difference: a clinical diagnostic test for cystic fibrosis; Eur Respir J, 3: 922-926, 1990

[3] Antonipillai I., Pearson Murphy, B. E.: Serum oestrogens and progesterone in mother and infant at delivery; Br J Obstet Gynaecol, 84: 179-185, 1977

[4] App, E. M., King, M., Helfesrieder, R., Kohler, D., Matthys, H.: Acute and long-term amiloride inhalation in cystic fibrosis lung disease. A rational approach to cystic fibrosis therapy; Am Rev Respir Dis, 141: 605-612, 1990

[5] Atkins, P. W.: Die Bewegung von Molekülen, in: Höpfner, A. (Hrsg): Physikalische Chemie, 3. korr. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, New York, Chichester, 772-812, 2004

[6] Avery, M. E., Mead, J.: Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease; Am J Dis Child, 97: 517-523, 1959

[7] Baines, D. L., Folkesson, H. G., Norlin, A., Bingle, C. D., Hai Tao Yuan, Olver, R. E.: The influence of mode of delivery, hormonal status and postnatal O_2 environment on epithelial sodium channel (ENaC) expression in perinatal guinea-pig lung; J Physiol, 522: 147-157, 2000

[8] Barker, P. M., Gowen, C. W., Lawson, E. E., Knowles, M. R.: Decreased sodium ion absorption across nasal epithelium of very premature infants with respiratory distress syndrome; J Pediatr, 130: 373-377, 1997

[9] Barnard, M. L., Ridge, K. M., Saldias, F., Friedman, E., Gare, M., Guerrero, C., Lecuona, E., Bertorello, A. M., Katz, A. I., Sznajder, J. I.: Stimulation of the dopamine

1 receptor increases lung edema clearance; Am J Respir Crit Care Med, 160: 982-986, 1999

[10] Boucher, R. C. JR, Bromberg, P. A., Gatzy, J. T.: Airway transepithelial electric potential in vivo: species and regional differences; J Appl Physiol, 48: 169-176, 1980

[11] Braun, J.: Mukoviszidose. In: Renz-Polster, H., Braun, J. (Hrsg): Basislehrbuch Innere Medizin, Kompakt - greifbar - verständlich, 2. Auflage, Urban & Fischer, München, Jena, 440-442, 2001

[12] Brown, M. J., Olver, R. E., Ramsden, C. A., Strang, L. B., Walters, D. V.: Effects of adrenaline and spontaneous labour on the secretion and absorption of lung liquid in fetal lamb; J Physiol, 344: 137-152, 1983

[13] Eisler, G., Hjertberg, R., Lagercrantz, H.: Randomised controlled trial of effect of terbutaline before elective caesarean section on postnatal respiration and glucose homeostasis; Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 80: F88-92, 1999

[14] Flemmer, A., Simbruner, G., Muenzer, S., Proquitte, H., Haberl, C., Nicolai, T., Leiderer, R.: Effect of lung water content, manipulated by intratracheal furosemide, surfactant, or a mixture of both, on compliance and viscoelastic tissue forces in lung-lavaged newborn piglets; Crit Care Med, 28: 1911-1917, 2000

[15] Föll, H.: Einführung in die Materialwissenschaft I, Kinetik - Atomare Betrachtung der Diffusion - Die Fickschen Diffusionsgesetze, Christian-Albrechts-Universität Kiel, Technische Fakultät, http://www.tf.uni-kiel.de/matwis/amat/mw1_ge/kap_6/backbone/r6_2_2.html, Stand 19.05.2005

[16] Folkesson, H. G., Norlin, A., Wang, Y., Abedinpour, P., Matthay, M. A.: Dexamethasone and thyroid hormone pretreatment upregulate alveolar epithelial fluid clearance in adult rats; J Appl Physiol, 88: 416-424, 2000

[17] Gaillard, E. A., Shaw, N. J., Wallace, H. L., Subhedar, N. V., Southern, K. W.: Nasal potential difference increases with gestation in moderately preterm neonates on the first postnatal day; Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 90: F172-F173, 2005

[18] Gowen, C. W. , Lawson, E. E., Gingras-Leatherman, J., Gatzy, J. T., Boucher, R. C., Knowles, M. R.: Increased nasal potential difference and amiloride sensitivity in neonates with cystic fibrosis; J Pediatr, 108: 517-521, 1986

[19] Gowen, C. W. J., Lawson, E. E., Gingras, J., Boucher, R. C., Gatzy, J. T., Knowles, M. R.: Electrical potential difference and ion transport across nasal epithelium of term neonates: correlation with mode of delivery, transient tachypnea of the newborn, and respiratory rate. J Pediatr, 113: 121-127, 1988

[20] Hays, J., Ockene, J. K., Brunner, R. L., Kotchen, J. M., Manson, J. E., Patterson, R. E., Aragaki, A. K., Shumaker, S. A., Brzyski, R. G., LaCroix, A. Z., Granek, I. A., Valanis, B. G.: Effects of estrogen plus progestin on health-related quality of life; N Engl J Med, 348: 1839-1854, 2003

[21] Helve, O., Pitkänen, O. M., Andersson, S., O´Brodovich, H., Kirjavainen, T., Otulakowski, G.: Low expression of human epithelial sodium channel in airway epithelium of preterm infants with respiratory distress; Pediatrics, 113: 1267-1272, 2004

[22] Helve, O., Pitkänen, O., Kirjavainen, T., Andersson, S.: Sodium transport in airway epithelium correlates with lung compliance in healthy newborn infants; J Pediatr, 146: 273-276, 2005

[23] Herbst, A. L., Ulfelder, H., Poskanzer, D. C.: Adenocarcinoma of the vagina - association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women; N Engl J Med; 284: 878-881, 1971

[24] Hercz, P.: Quantitative changes in steroid and peptide hormones in the maternal-fetoplacental system between the 28th-40th weeks of pregnancy; Acta Med Hung, 42: 29-39, 1985

[25] Hercz, P., Ungar, L., Siklos, P., Farquharson, R. G.: Unconjugated 17ß-oestradiol and oestriol in maternal serum and in cord vein and artery blood at term and preterm delivery; Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 27: 7-12, 1988

[26] Herruzo, A. J., Mozas, J., Alarcon, J. L., Lopez, J. M., Molina, R., Molto, L., Martos, J.: Sex differences in serum hormone levels in umbilical vein blood; Int J Gynaecol Obstet, 41: 37-41, 1993

[27] Hummler, E., Barker, P., Gatzy, J., Beermann, F., Verdumo, C., Schmidt, A., Boucher, R., Rossier, B. C.: Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in αENaC-deficient mice; Nat Genet, 12: 325-328, 1996

[28] Jackson, E. K.: Diuretika. In: Dominiak, P., Harder, S., Paul, M., Unger, T. (Hrsg): Goodman & Gilman - Pharmakologische Grundlagen der Arzneimitteltherapie - Übersetzung der 9. Auflage, McGraw-Hill International, London, 705-734, 1998

[29] Kenny, F. M., Angsusingha, K., Stinson, D., Hotchkiss, J.: Unconjugated estrogens in the perinatal period; Pediatr Res, 7: 826-831, 1973

[30] Kersting, U., Schwab, A., Hebestreit, A.: Measurement of human nasal potential difference to teach the theory of transepithelial fluid transport; Advan Physiol Edu, 275: 72-77, 1998

[31] Khosla, S. S., Rooney, S. A: Stimulation of fetal lung surfactant production by administration of 17β-estradiol to the maternal rabbit; Am J Obstet Gynecol, 133: 213-216, 1979

[32] Khosla, S. S., Walker Smith, G. J., Parks, P. A., Rooney, S. A: Effects of estrogen on fetal rabbit lung maturation: morphological and biochemical studies; Pediatr Res, 15: 1274-1281, 1981

[33] Klyce, S. D., Marshall, W. S.: Effects of Ag^+ on ion transport by the corneal epithelium of the rabbit; J Membr Biol, 66: 133-144, 1982

[34] Knowles, M. R., Carson, J. L., Collier, A. M., Gatzy, J., und Boucher, R. C.: Measurements of nasal transepithelial electric potential differences in normal human subjects in vivo; Am Rev Respir Dis, 124: 484-490, 1981

[35] Knowles, M., Gatzy, J., Boucher, R.: Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis; N Engl J Med, 305: 1489-1495, 1981

[36] Knowles, M. R., Buntin, W. H., Bromberg, P. A., Gatzy, J. T., Boucher, R. C.: Measurements of transepithelial electric potential differences in the trachea and bronchi of human subjects in vivo; Am Rev Respir Dis, 126: 108-112, 1982

[37] Kolditz, L.: Die wichtigsten Reaktionstypen in der anorganischen Chemie. In: Kolditz, L. (Hrsg): Anorganikum: Lehr- und Praktikumsbuch der anorganischen Chemie mit einer Einführung in die physikalische Chemie, Band 1, 10. Auflage, Dt. Verlag der Wissenschaften, Berlin, 351-418, 1993

[38] Kuchling, H.: Konstanten der Physik, in: Kuchling, H.: Taschenbuch der Physik, 16. Auflage, Fachbuchverlag Leipzig im Carl-Hanser-Verl., München, Wien, 714, 1999

[39] Lorin, M. I., Gaerlan, P. F., Mandel, I. D.: Quantitative composition of nasal secretions in normal subjects; J Lab Clin Med, 80: 275-281, 1972

[40] Ma, T., Fukuda, N., Song, Y., Matthay, M. A., Verkman, A. S.: Lung fluid transport in aquaporin-5 knockout mice; J Clin Invest, 105: 93-100, 2000

[41] Manson J. E., Hsia, J., Johnson, K. C., Rossouw J. E., Assaf, A. R., Lasser, N. L., Trevisan, M., Black, H. R., Heckbert, S. R., Detrano, R., Strickland, O. L., Wong, N. D., Crouse, J. R., Stein, E., Cushman, M.: Estrogen plus progestin and the risk of coronary heart disease; N Engl J Med, 349: 523-534, 2003

[42] Matalon, S., O'Brodovich, H.: Sodium channels in alveolar epithelial cells: Molecular characterization, biophysical properties and physiological significance; Annu Rev Physiol, 61: 627-661, 1999

[43] McCray, P., B., Bettencourt, J. D., Bastacky, J.: Developing bronchopulmonary epithelium of the human fetus secretes fluid; Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 262: L270-279, 1992

[44] Moessinger, A. C., Harding, R., Adamson, T. M., Singh, M., Kiu, G. T.: Role of lung fluid volume in growth and maturation of the fetal sheep lung; J Clin Invest, 86: 1270-1277, 1990

[45] Mutschler, E.: Gonaden. In: Mutschler, E.(Hrsg): Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 7. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 363-384, korrigierter Nachdruck 1997 a

[46] Mutschler, E.: Diuretika: Cycloamidin-Derivate. In: Mutschler, E.(Hrsg): Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 7. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 582-592, korrigierter Nachdruck 1997 b

[47] O'Brodovich, H., Hannam, V., Seear, M. und Mullen, J.B.M.: Amilorid impairs lung water clearance in newborn guinea pigs; J Appl Physiol, 68: 1758-1762, 1990

[48] O'Brodovich, H., Canessa, C., Ueda, J., Rafii, B., Rossier, B. C., Edelson, J.: Expression of the epithelial Na^+ channel in the developing rat lung; Am J Physiol Cell Physiol, 265: C491-C496, 1993

[49] O'Brodovich, H. M.; Immature epithelial Na^+ channel expression is one of the pathogenetic mechanisms leading to human neonatal respiratory distress syndrome; Proc Assoc Am Physicians, 108: 345-355; 1996

[50] Olivera, W. G., Ridge, K. M., Sznajder, J. I.: Lung liquid clearance and Na,K-ATPase during acute hyperoxia and recovery in rats; Am J Respir Crit Care Med, 152: 1229-1234, 1995

[51] Otulakowski, G., Flueckiger-Staub, S., Ellis, L., Ramlall, K., Staub, O., Smith, D., Durie, P., O´Brodovich, H.: Relation between α, β, and γ human amiloride-sensitive epithelial Na^+ channel mRNA levels and nasal epithelial potential difference in healthy men; Am J Respir Crit Care Med, 158: 1213-1220, 1998

[52] Palmer, L. G., Kleyman, T. R.: Potassium-retaining diuretics: amiloride. In: Greger, R. F., Knauf, H., Mutschler, E. (Hrsg): Handbook of experimental pharmacology, Vol. 117, Diuretics, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 363-394, 1995

[53] Papile, L.-A., Burstein, J., Burstein, R., Koffler, H.: Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: A study of infants with birth weights less than 1,500 gm; J Pediatr, 92: 529-534, 1978

[54] Pitkänen, O., Tanswell, A. K., Downey, G., O'Brodovich, H.: Increased P_{O2} alters the bioelectric properties of fetal distal lung epithelium; Am J Physiol, 270: L1060-L1066, 1996

[55] Pitkänen, O. M., Smith, D., O´Brodovich, H., Otulakowski, G.: Expression of α-, β-, and γ-hENaC mRNA in the human nasal, bronchial, and distal lung epithelium; Am J Respir Crit Care Med, 163: 273-276, 2001

[56] Quinlan, M. F., Salman, S. D., Swift, D. L., Wagner, H. N. JR., Proctor, D. F.: Measurement of mucociliary function in man; Am Rev Respir Dis, 99: 13-23, 1969

[57] Ramminger, S. L., Baines, D. L., Olver, R. E., Wilson, S. M: The effects of P_{O2} upon transepithelial ion transport in fetal rat distal lung epithelial cells; J Physiol, 524: 539-547, 2000

[58] Reynolds, J. W.: Feto-placental and neonatal steroid endocrinology. In: Smith, C. A., Nelson, N. M. (Hrsg): The physiology of the newborn infant, 4. Auflage, Charles C Thomas, Springfield IL, 664-735, 1976

[59] Rosenfeld, C. R.: The placenta: Regulation of the placental circulation,. In: Polin, R. A., Fox, W. W. (Hrsg): Fetal and neonatal physiology, 2. Auflage, Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, 70-77, 1998

[60] Rossouw, J. E., Anderson, G. L., Prentice, R. L., LaCroix, A. Z., Kooperberg, C., Stefanick ,M. L., Jackson, R. D., Beresford, S. A., Howard, B. V., Johnson, K. C., Kotchen, J. M., Ockene, J.: Writing group for the women´s health initiative investigators: Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women - principal results from the women´s health initiative randomized controlled trial; The Journal of the American Medical Association, 288: 321-333, 2002

[61] Sartori, C., Matthay, M. A: Alveolar epithelial fluid transport in acute lung injury: new insights; Eur Respir J, 20: 1299-1313, 2002

[62] Schwabe, U.: Gynäkologie und Geburtshilfe. In: Scholz, H., Schwabe, U. (Hrsg.): Taschenbuch der Arzneibehandlung - Angewandte Pharmakologie, 12. Auflage, Urban & Fischer, München, Jena, 64-78, 2000

[63] Scommegna, A., Burd, L., Bieniarz, J.: Progesterone and pregnenolone sulfate in pregnancy plasma; Am J Obstet Gynecol, 113: 60-65, 1972

[64] Shanklin, D. R., Wolfson, S. L.: Aqueous estrogens in the management of respiratory distress syndrom; J Reprod Med, 5: 11-29, 1970

[65] Siler-Khodr, T. M.: The placenta: Endocrine and paracrine function of the human placenta. In: Polin, R. A., Fox, W. W. (Hrsg): Fetal and neonatal physiology, 2. Auflage, Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, 89-102, 1998

[66] Sippell, W. G., Becker, H., Versmold, H. T., Bidlingmaier, F., Knorr, D.: Longitudinal studies of plasma aldosterone, corticosterone, deoxycorticosterone, progesterone, 17-hydroxyprogesterone, cortisol and cortisone determined simultaneously in mother and child at birth and during the early neonatal period i. Spontaneous delivery; J Clin Endocrinol Metab, 46: 971-985, 1978

[67] Smith, D. E., Otulakowski G., Yeger, H., Post, M., Cutz, E., O´Brodovich, H. M: Epithelial Na^+ channel (ENaC) expression in the developing normal and abnormal human perinatal lung; Am J Respir Crit Care Med, 161: 1322-1331, 2000

[68] Smith, O. W.: Diethylstilbestrol in the prevention and treatment of complications of pregnancy; Am J Obstet Gynecol, 56: 821-834, 1948

[69] Soll, R. F., Blanco F.: Natural surfactant extract versus synthetic surfactant for neonatal respiratory distress syndrome (Cochrane Review). Cochrane Database Syst Rev, CD000144, 2001

[70] Song, Y., Fukuda, N., Bai, C., Ma, T., Matthay, M. A., Verkman, A. S: Role of aquaporins in alveolar fluid clearance in neonatal and adult lung, and in oedema formation following acute lung injury: studies in transgenic aquaporin null mice; J Physiol, 525: 771-779, 2000

[71] Southern, K. W., Noone, P. G., Bosworth, D. G., LeGrys, V. A., Knowles, M. R., Barker, P. M.: A modified technique for measurement of nasal transepithelial potential difference in infants; J Pediatr, 139: 353-358, 2001

[72] Sweezey, N., Tchepichev, S., Gagnon, S., Fertuck, K., und O'Brodovich, H.: Female gender hormones regulate mRNA levels and function of the rat lung epithelial Na channel; Am J Physiol Cell Physiol, 274: C379-386, 1998

[73] Sznajder, J. I., Olivera, W. G., Ridge, K. M., Rutschman, D. H.: Mechanisms of lung liquid clearance during hyperoxia in isolated rat lungs; Am J Respir Crit Care Med, 151: 1519-1525, 1995

[74] Tayama, C., Ichimaru, S., Ito, M., Nakayana, M., Maeyama, M., Miyakawa, I.: Unconjugated estradiol, estriol and total estriol in maternal peripheral vein, cord vein, and cord artery serum at delivery in pregnancies with intrauterine growth retardation; Endocrinol Jpn, 30: 155-162, 1983

[75] Tanner's General Chemistry, Electrochemistry, ions in solution, ion speeds and conductivity, 1997, http://www.tannerm.com/IonSpeeds.htm, Stand 19.05.2005

[76] Tchepichev, S., Ueda, J., Canessa, C., Rossier, B. C., O'Brodovich, H.: Lung epithelial Na channel subunits are differentially regulated during development and by steroids; Am J Physiol Cell Physiol, 269: C805-C812, 1995

[77] Thome, U. H., Davis, I. C., Nguyen, S. V., Shelton, B. J., Matalon, S.: Modulation of sodium transport in fetal alveolar epithelial cells by oxygen and corticosterone; Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 284: L376-L385, 2003

[78] Thuresson-Klein, A., Moawad, A. H., Hedqvist, P.: Estrogen stimulates formation of lamellar bodies and release of surfactant in the rat fetal lung; Am J Obstet Gynecol, 151: 506-514, 1985

[79] Tomkiewicz, R. P., App, E. M., Zayas, J. G., Ramirez, O., Church, N., Boucher, R. C., Knowles, M. R., King, M: Amiloride inhalation therapy in cystic fibrosis. Influence on

ion content, hydration, and rheology of sputum; Am Rev Respir Dis, 148: 1002-1007, 1993

[80] Trotter, A., Maier, L., Grill, H.-J., Kohn, T., Heckmann, M., Pohlandt, F.: Effects of postnatal estradiol and progesterone replacement in extremely preterm infants; J Clin Endocrinol Metab, 84: 4531-4535, 1999 a

[81] Trotter, A., Maier, L., Grill, H.-J., Wudy, S. A., Pohlandt, F.: 17ß-estradiol and progesterone supplementation in extremely low-birth-weight infants; Pediatr Res, 45: 489-493, 1999 b

[82] Trotter, A., Pohlandt, F.: The replacement of oestradiol and progesterone in very premature infants; Ann Med, 32: 608-614, 2000

[83] Trotter, A., Bokelmann, B., Sorgo, W., Bechinger-Kornhuber, D., Heinemann, H., Schmücker, G., Oesterle, M., Köhntop, B., Brisch, K.-H., Pohlandt, F.: Follow-up examination at the age of 15 month of extremely preterm infants after postnatal estradiol and progesterone replacement; J Clin Endocrinol Metab, 86: 601-603, 2001

[84] Trotter, A., Maier, L., Pohlandt, F.: Management of the extremely preterm infant: Is the replacement of estradiol and progesterone beneficial? Pediatr Drugs, 3: 629-637, 2001

[85] Trotter, A., Maier, L., Kohn, T., Böhm, W., Pohlandt, F.: Growth of the uterus and mammary glands and vaginal cytologic features in extremely premature infants with postnatal replacement of estradiol and progesterone; Am J Obstet Gynecol, 186: 184-188, 2002

[86] Wodopia, R., Ko, H. S., Billian, J., Wiesner, R., Bärtsch, P., Mairbäurl, H.: Hypoxia decreases proteins involved in epithelial electrolyte transport in A549 cells and rat lung; Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 279: L1110-L1119, 2000

[87] Zeitlin, P. L., Wagner, M., Markakis, D., Loughlin, G. M., Guggino, W. B.: Steroid hormones: Modulators of Na^+ absorption and Cl^- secretion in cultured tracheal epithelia; Proc Natl Acad Sci USA, 86: 2502-2505, 1989

Anhang

Excel-Makro

```
1
Sub Datenverarbeitung()
'
' Makro Datenverarbeitung
' Makro am 20.03.2002 von Aileen aufgezeichnet
6 '
' Tastenkombination: Strg+d

' Variablendeklaration

11 Static meinDateiname As String
Dim MeinSheet As String
Dim AktiveZelle
Dim AbsStartzeit
Dim TeilAktiveZelle
16 Dim Zaehler
Dim ErsteMessung
Dim Startzeit
Dim Endzeit
Dim DivZeit
21 Dim GesAnzMesswerte
Dim GesMesszeit
Dim ZeitAchse
Dim ZeitSchritt
Dim DiagrammNr
26 Dim MinutenAchse
Dim AlteMinute
Dim AusgabeMinutenAchse



31 ErsteMessung = True
DivZeit = 0
GesAnzMesswerte = 0
AbsStartzeit = 0

36 'Datei laden und formatieren

meinDateiname = Application.GetOpenFilename("MWT-Dateien (*.MWT), *.MWT", , "Messdaten einlesen")

MeinSheet = Left(Right(meinDateiname, 8), 4)
41 If meinDateiname <> "Falsch" Then
    Workbooks.OpenText Filename:=meinDateiname, _
```

```
        Origin:=xlWindows, StartRow:=1, DataType:=xlDelimited, TextQualifier _
        :=xlDoubleQuote, ConsecutiveDelimiter:=False, Tab:=True, Semicolon:= _
        False, Comma:=False, Space:=False, Other:=False, FieldInfo:=Array(1, 1) _
46      , DecimalSeparator:=".", ThousandsSeparator:="'"
        Worksheets(1).Select
        Worksheets(1).Name = "Tabelle1"
    End If

51  ' Erste Zelle auswählen

    Range("A1").Select
    ActiveCell.Select
    Selection.Copy
56  AktiveZelle = Selection()
    TeilAktiveZelle = Left(Selection(), 4)

    ' Hauptschleife, die das Datenende erkennt

61  While (AktiveZelle) <> ""

        'Start der Messung erkennen

        If (TeilAktiveZelle = "Page") Then
66          If (Mid(AktiveZelle, 37, 1) = "B") Then

                ' Startzeit heraussuchen

                ActiveCell.Offset(1, 2).Range("A1").Select
71              ActiveCell.FormulaR1C1 = Mid(AktiveZelle, 45, 8)
                Selection.NumberFormat = "h:mm:ss;@"
                AktiveZelle = ActiveCell.Value

                ' Startzeit in Sekunden umrechnen und Absolute Startzeit (in Sekunden) festlegen
76
                ActiveCell.Offset(0, 1).Range("A1").Select
                If (ErsteMessung = True) Then
                    Startzeit = 60 * 60 * Hour(AktiveZelle) + 60 * Minute(AktiveZelle) + Second(AktiveZelle)
                    AbsStartzeit = Startzeit
81                  ErsteMessung = False
                Else
                    Startzeit = 60 * 60 * Hour(AktiveZelle) + 60 * Minute(AktiveZelle) + Second(AktiveZelle)

                    ' Zeitsprung berechnen
86
                    ActiveCell.Offset(-2, 0).Range("A1").Select
                    AlteEndZeit = ActiveCell.Value
```

```
        ActiveCell.Offset(2, 5).Range("A1").Select

91      DivZeit = Startzeit - AlteEndZeit
        ActiveCell.FormulaR1C1 = DivZeit
        ActiveCell.Offset(0, -5).Range("A1").Select

        ' Neue Startzeit berechnen
96
        Startzeit = 60 * 60 * Hour(AktiveZelle) + 60 * Minute(AktiveZelle) + Second(AktiveZelle)
        - DivZeit

    End If
101
    ActiveCell.FormulaR1C1 = Startzeit

    ' Zeile mit Startzeit löschen

106 ActiveCell.Offset(-1, -3).Range("A1").Select


    ActiveCell.Rows("1:1").EntireRow.Select
    Selection.Delete Shift:=xlUp
111 ActiveCell.Offset(0, 0).Range("A1").Select

    'Schleife zum Zählen der Messwerte

    Zaehler = 0
116 ActiveCell.Select
    AktiveZelle = Selection()

    While ((AktiveZelle) <> "") And (Mid(AktiveZelle, 39, 1) <> "E")

121     If (((AktiveZelle) <> "*")) Then
            Zaehler = Zaehler + 1
            GesAnzMesswerte = GesAnzMesswerte + 1
            ActiveCell.Value = CVar(AktiveZelle) * 10
        Else
126         ActiveCell.Rows("1:1").EntireRow.Select
            Selection.Delete Shift:=xlUp
            ActiveCell.Offset(-1, 0).Range("A1").Select
        End If

131     ActiveCell.Offset(1, 0).Range("A1").Select
        ActiveCell.Select
        Selection.Copy
        AktiveZelle = Selection()
```

```
136             Wend

            End If

            ' Ende der Messung erkennen
141
            If (Mid(AktiveZelle, 39, 1) = "E") Then

                ' Endpunkt heraussuchen

146             ActiveCell.Offset(-1, 2).Range("A1").Select
                ActiveCell.FormulaR1C1 = Mid(AktiveZelle, 45, 8)
                Selection.NumberFormat = "h:mm:ss;@"
                AktiveZelle = ActiveCell.Value

151             ' Endzeit in Sekunden umrechnen

                ActiveCell.Offset(0, 1).Range("A1").Select
                Endzeit = 60 * 60 * Hour(AktiveZelle) + 60 * Minute(AktiveZelle) + Second(AktiveZelle)
                - DivZeit
156
                ActiveCell.FormulaR1C1 = Endzeit

                ' Messdauer berechnen

161             ActiveCell.Offset(0, 1).Range("A1").Select
                ActiveCell.FormulaR1C1 = Endzeit - Startzeit
                ActiveCell.Offset(0, 1).Range("A1").Select
                ActiveCell.FormulaR1C1 = Zaehler

166             ' Zeile mit EndZeit löschen

                ActiveCell.Offset(1, 0).Range("A1").Select
                ActiveCell.Rows("1:1").EntireRow.Select
                Selection.Delete Shift:=xlUp
171             ActiveCell.Offset(0, 0).Range("A1").Select
            End If
        End If

        ActiveCell.Select
176     Selection.Copy
        AktiveZelle = Selection()
    Wend

    ' Ausgabe von Gesamtmesszeit und der Anzahl der Messwerte
```

```
181
    ActiveCell.Offset(0, 1).Range("A1").Select
    ActiveCell.FormulaR1C1 = "GesAnzMesswerte"
    ActiveCell.Offset(0, 1).Range("A1").Select
    ActiveCell.FormulaR1C1 = GesAnzMesswerte
186
    ActiveCell.Offset(0, 2).Range("A1").Select
    ActiveCell.FormulaR1C1 = "GesMesszeit"
    ActiveCell.Offset(0, 1).Range("A1").Select
    GesMesszeit = Endzeit - AbsStartzeit
191 ActiveCell.FormulaR1C1 = GesMesszeit

    ' Frequenz der Messaufzeichnung

    ActiveCell.Offset(0, 2).Range("A1").Select
196 ActiveCell.FormulaR1C1 = "Zeit pro Schritt"
    ActiveCell.Offset(0, 1).Range("A1").Select
    ZeitSchritt = GesMesszeit / (GesAnzMesswerte - 1)

    ActiveCell.FormulaR1C1 = ZeitSchritt
201
    'Spalte für Zeitachse einfügen

    Columns("A:A").Select
    Application.CutCopyMode = False
206 Selection.Insert Shift:=xlToRight

    'Zeitachse einfügen

    ZeitAchse = 0
211 MinutenAchse = 0
    AusgabeMinutenAchse = 0
    AlteMinute = 0
    Range("A1").Select
    I = 0
216 While (I < GesAnzMesswerte)
        I = I + 1
        ActiveCell.FormulaR1C1 = AusgabeMinutenAchse
        Selection.NumberFormat = "0"
        ActiveCell.Offset(1, 0).Range("A1").Select
221     AlteMinute = MinutenAchse
        MinutenAchse = Int(ZeitAchse + ZeitSchritt) - (Int(ZeitAchse + ZeitSchritt) Mod 60)
        If (MinutenAchse <> AlteMinute) Then
            AusgabeMinutenAchse = (MinutenAchse / 60)
        Else
226         AusgabeMinutenAchse = ""
```

```
        End If
        ZeitAchse = ZeitAchse + ZeitSchritt
    Wend

' 1. Zeile formatieren

    Columns("A:A").Select
    Range("A2305").Activate
    Selection.NumberFormat = "0.0"

' Startwert und Amiloridwert – Zeilen einfügen

    Columns("D:D").Select
    Application.CutCopyMode = False
    Selection.Insert Shift:=xlToRight

    Columns("E:E").Select
    Application.CutCopyMode = False
    Selection.Insert Shift:=xlToRight

    Columns("F:F").Select
    Application.CutCopyMode = False
    Selection.Insert Shift:=xlToRight

' Statistik einfügen

    Range("A1").Select
    ActiveCell.Offset(3, 8).Range("A1").Select
    ActiveCell.FormulaR1C1 = "Messzeit"
    ActiveCell.Offset(0, 1).Range("A1").Select
    ActiveCell.FormulaR1C1 = "Datenanzahl"
    ActiveCell.Offset(0, 1).Range("A1").Select
    ActiveCell.FormulaR1C1 = "Nullpunktsverschiebung"
    ActiveCell.Offset(0, 1).Range("A1").Select
    ActiveCell.FormulaR1C1 = "Startwert"
    ActiveCell.Offset(0, 1).Range("A1").Select
    ActiveCell.FormulaR1C1 = "Amiloridwert"
    ActiveCell.Offset(0, 1).Range("A1").Select
    ActiveCell.FormulaR1C1 = "Potentialdifferenz"
    ActiveCell.Offset(0, 1).Range("A1").Select
    ActiveCell.FormulaR1C1 = "Potentialdifferenz normiert"

    Range("A1").Select                          ' Gesamtmesszeit eintragen
    ActiveCell.Offset(4, 8).Range("A1").Select
    ActiveCell.FormulaR1C1 = GesMesszeit
```

```
    ActiveCell.Offset(0, 1).Range("A1").Select      ' Anzahl der Messwerte eintragen
    ActiveCell.FormulaR1C1 = GesAnzMesswerte

    ActiveCell.Offset(0, 1).Range("A1").Select      ' Nullpunktsverschiebung eintragen
    ActiveCell.FormulaR1C1 = "=AVERAGE(C[-8])"
    Selection.NumberFormat = "0.00"

    ActiveCell.Offset(0, 1).Range("A1").Select      ' Startwert eintragen
    ActiveCell.FormulaR1C1 = "=AVERAGE(C[-7])"
    Selection.NumberFormat = "0.00"

    ActiveCell.Offset(1, 0).Range("A1").Select      ' Standardabweichung des Startwerts eintragen
    ActiveCell.FormulaR1C1 = "=STDEV(C[-7])"
    Selection.NumberFormat = "0.00"
    ActiveCell.Offset(-1, 0).Range("A1").Select


    ActiveCell.Offset(0, 1).Range("A1").Select      ' Potential mit Amilorid eintragen
    ActiveCell.FormulaR1C1 = "=AVERAGE(C[-7])"
    Selection.NumberFormat = "0.00"

    ActiveCell.Offset(1, 0).Range("A1").Select      ' Standardabweichung des Amiloridwerts eintragen
    ActiveCell.FormulaR1C1 = "=STDEV(C[-7])"
    Selection.NumberFormat = "0.00"
    ActiveCell.Offset(-1, 0).Range("A1").Select


    ActiveCell.Offset(0, 1).Range("A1").Select      ' Potentialdifferenz eintragen
    ActiveCell.FormulaR1C1 = "=abs(RC[-2]-RC[-1])"
    Selection.NumberFormat = "0.00"

    ActiveCell.Offset(0, 1).Range("A1").Select      ' Normierte Potentialdifferenz eintragen
    ActiveCell.FormulaR1C1 = "=abs(RC[-1]/RC[-3])"
    Selection.NumberFormat = "0.00"

    'Diagramme mit 500 Messwerten pro Seite erstellen

    Dim A As Variant
    A = Array("=Tabelle1!R1C1:R500C1", "=Tabelle1!R1C2:R500C2", "Chart1", _
              "=Tabelle1!R500C1:R1000C1", "=Tabelle1!R500C2:R1000C2", "Chart2", _
              "=Tabelle1!R1000C1:R1500C1", "=Tabelle1!R1000C2:R1500C2", "Chart3", _
              "=Tabelle1!R1500C1:R2000C1", "=Tabelle1!R1500C2:R2000C2", "Chart4", _
              "=Tabelle1!R2000C1:R2500C1", "=Tabelle1!R2000C2:R2500C2", "Chart5", _
              "=Tabelle1!R2500C1:R3000C1", "=Tabelle1!R2500C2:R3000C2", "Chart6", _
              "=Tabelle1!R3000C1:R3500C1", "=Tabelle1!R3000C2:R3500C2", "Chart7", _
              "=Tabelle1!R3500C1:R4000C1", "=Tabelle1!R3500C2:R4000C2", "Chart8", _
```

```
            "=Tabelle1!R4000C1:R4500C1", "=Tabelle1!R4000C2:R4500C2", "Chart9", _
            "=Tabelle1!R4500C1:R5000C1", "=Tabelle1!R4500C2:R5000C2", "Chart10", _
            "=Tabelle1!R5000C1:R5500C1", "=Tabelle1!R5000C2:R5500C2", "Chart11", _
            "=Tabelle1!R5500C1:R6000C1", "=Tabelle1!R5500C2:R6000C2", "Chart12", _
            "=Tabelle1!R6000C1:R6500C1", "=Tabelle1!R6000C2:R6500C2", "Chart13")

DiagrammNr = 0

Do While ((GesAnzMesswerte / 500) * 3 > DiagrammNr)

    If (DiagrammNr = 0) Then
        Charts.Add
    Else
        Charts.Add After:=Charts(Charts.Count)
    End If

    ActiveChart.ChartType = xlLine
    ActiveChart.SetSourceData Source:=Sheets("Tabelle1").Range("A1:A5000"), _
        PlotBy:=xlColumns

    ' Wertebereich

    ActiveChart.SeriesCollection(1).XValues = A(DiagrammNr)
    DiagrammNr = DiagrammNr + 1
    ActiveChart.SeriesCollection(1).Values = A(DiagrammNr)
    DiagrammNr = DiagrammNr + 1
    ActiveChart.SeriesCollection(1).Name = "=""Daten"""
    ActiveChart.Location Where:=xlLocationAsNewSheet, Name:=A(DiagrammNr)
    DiagrammNr = DiagrammNr + 1

    ' Beschriftungen

    With ActiveChart
        .HasTitle = True
        .ChartTitle.Characters.Text = MeinSheet + " Chart " + CStr((DiagrammNr) / 3)
        .Axes(xlCategory, xlPrimary).HasTitle = True
        .Axes(xlCategory, xlPrimary).AxisTitle.Characters.Text = "Zeit"
        .Axes(xlValue, xlPrimary).HasTitle = True
        .Axes(xlValue, xlPrimary).AxisTitle.Characters.Text = "Nasenpotential"
    End With

    ' Formatierungen

    ActiveChart.PlotArea.Select
    With Selection.Border
        .ColorIndex = 16
```

```
        .Weight = xlThin
        .LineStyle = xlContinuous
    End With
    With Selection.Interior
        .ColorIndex = 2
        .PatternColorIndex = 1
        .Pattern = xlSolid
    End With
    ActiveChart.Axes(xlValue).Select
    With ActiveChart.Axes(xlValue)
        .MinimumScale = -15
        .MaximumScale = 2
        .MinorUnitIsAuto = True
        .MajorUnitIsAuto = True
        .Crosses = xlAutomatic
        .ReversePlotOrder = False
        .ScaleType = xlLinear
        .DisplayUnit = xlNonec
    End With
    ActiveChart.Legend.Select
    Selection.Delete
    ActiveChart.ChartTitle.Select
    Selection.Delete

'Titel

    ActiveChart.PlotArea.Select
    With ActiveChart
        .HasTitle = True
        .ChartTitle.Characters.Text = MeinSheet + " Chart " + CStr((DiagrammNr) / 3)
    End With
    ActiveChart.ChartTitle.Select
    Selection.Font.Bold = False
    Selection.AutoScaleFont = True
    With Selection.Font
        .Name = "Arial"
        .Size = 10
        .Strikethrough = False
        .Superscript = False
        .Subscript = False
        .OutlineFont = False
        .Shadow = False
        .Underline = xlUnderlineStyleNone
        .ColorIndex = xlAutomatic
        .Background = xlAutomatic
    End With
```

```
        Selection.Left = 1
        Selection.Top = 429
        ActiveChart.PlotArea.Select
        Selection.Top = 8
        Selection.Width = 685
        Selection.Height = 414

        ' Umbenennen
        Charts(Charts.Count).Name = MeinSheet + " Chart " + CStr((DiagrammNr) / 3)

Loop

'Worksheets(1).Name = "Daten " + MeinSheet
End Sub


Sub NullkorrekturAWert()
'
' Makro: Korrektur der Werte um Nullverschiebung
' Makro am 26.09.2002 von Aileen aufgezeichnet
'
' Tastenkombination: Strg+n
'

' Variablendeklaration

Dim GesAnzMesswerte
Dim x
Dim Zaehler
Dim Nullverschiebung
Zaehler = 0

' Nullpunktsverschiebung

Range("K5").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "=AVERAGE(C[-8])"
Selection.NumberFormat = "0.00"

' Vorbereitung des Sheets

Range("J5").Select
ActiveCell.Select
GesAnzMesswerte = Selection()

Range("K5").Activate
```

```
    ActiveCell.Select
    Nullverschiebung = Selection()

    Columns("H:H").Select
    Selection.ClearContents

    Columns("G:G").Select
    Selection.ClearContents

    Range("F1").Select
    ActiveCell.Select

    ' Amiloridwert neu berechnen

    Do While (Zaehler < GesAnzMesswerte)
        x = Selection()
        If ActiveCell <> "" Then
            ActiveCell.Offset(0, 2).Range("A1").Select
            ActiveCell.FormulaR1C1 = x - Nullverschiebung
            Selection.NumberFormat = "0.00"
            ActiveCell.Offset(0, -2).Range("A1").Select
            ActiveCell.Select
            Zaehler = Zaehler + 1
        End If
        ActiveCell.Offset(1, 0).Range("A1").Select
        ActiveCell.Select
        Zaehler = Zaehler + 1
    Loop


    ' Startwert neu berechnen


     Zaehler = 0

     Range("E1").Select
     ActiveCell.Select

    Do While (Zaehler < GesAnzMesswerte)
        x = Selection()
       If ActiveCell <> "" Then
          ActiveCell.Offset(0, 2).Range("A1").Select
          ActiveCell.FormulaR1C1 = x - Nullverschiebung
          Selection.NumberFormat = "0.00"
          ActiveCell.Offset(0, -2).Range("A1").Select
           ActiveCell.Select
```

```
        Zaehler = Zaehler + 1
    End If
    ActiveCell.Offset(1, 0).Range("A1").Select
    ActiveCell.Select
    Zaehler = Zaehler + 1
Loop

Range("L5").Select
Selection.Copy
Hilfe = Selection()
Range("L8").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = Hilfe
Selection.NumberFormat = "0.00"

' Ausgabe der Werte

Range("L7").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "NP Korr"
ActiveCell.Offset(0, 1).Range("A1").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "Nach Amilorid korr"
ActiveCell.Offset(0, 1).Range("A1").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "Potentialdifferenz korr"
ActiveCell.Offset(0, 1).Range("A1").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "Potentialdifferenz normiert korr"


Range("L8").Select                          ' Startwert nach Umschalten korr ausgeben
ActiveCell.FormulaR1C1 = "=AVERAGE(C[-5])"
Selection.NumberFormat = "0.00"

ActiveCell.Offset(1, 0).Range("A1").Select  ' Standardabweichung des Startwerts eintragen
ActiveCell.FormulaR1C1 = "=STDEV(C[-5])"
Selection.NumberFormat = "0.00"
ActiveCell.Offset(-1, 0).Range("A1").Select

Range("M8").Select                          ' Amiloridwert korr ausgeben
ActiveCell.FormulaR1C1 = "=AVERAGE(C[-5])"
Selection.NumberFormat = "0.00"

ActiveCell.Offset(1, 0).Range("A1").Select  ' Standardabweichung des Amiloridwerts eintragen
ActiveCell.FormulaR1C1 = "=STDEV(C[-7])"
Selection.NumberFormat = "0.00"
ActiveCell.Offset(-1, 0).Range("A1").Select

ActiveCell.Offset(0, 1).Range("A1").Select  ' Potentialdifferenz ausgeben
ActiveCell.FormulaR1C1 = "=abs(RC[-2]-RC[-1])"
```

```
    Selection.NumberFormat = "0.00"

551 ActiveCell.Offset(0, 1).Range("A1").Select      ' Potentialdifferenz normiert ausgeben
    ActiveCell.FormulaR1C1 = "=abs(RC[-1]/RC[-3])"
    Selection.NumberFormat = "0.00"


556 End Sub
```

Abbildungsverzeichnis

1 Pränatale Flüssigkeitssekretion des Lungenepithels 7
2 Postnatale Flüssigkeitsabsorption des Lungenepithels 8
3 Messaufbau, Nullwertkalibrierung 18
4 Messaufbau bei der Messaufzeichnung 19
5 Messaufbau mit Messelektrodenanschluss im Nebenschluss 21
6 Kalibrierung des Messaufbaus mit Messelektrodenanschluss im Nebenschluss 22
7 Skizze einer Messaufzeichnung 23
8 Excel-Graphiken einer Nasenpotenzial-Messung 27
9 Östradiol-Plasmakonzentrationen 33
10 Progesteron-Plasmakonzentrationen 34
11 Amilorid-sensitive Nasenpotenzialdifferenz, intention to treat-Analyse . . . 35
12 Amilorid-sensitive Nasenpotenzialdifferenz, according to protocol-Analyse 36
13 Nasenpotenzialdifferenz, intention to treat-Analyse 37
14 ROC-Kurve Asnpd 40
15 ROC-Kurve NP 41
16 ROC-Kurve Aisnpd 41
17 Kaplan-Meier-Analyse der Beatmungszeiten 43
18 Kaplan-Meier-Analyse des Sauerstoffbedarfs 43
19 Silberionenkonzentration c in Abhängigkeit vom Ort x 54

Tabellenverzeichnis

1 Von Excel-Makro erzeugte Tabelle mit Daten einer Messung 28

2 Charakterisierung der Studiengruppen 31

3 Ergebnisse der Studiengruppen im Vergleich als intention to treat und according to protocol-Analyse 38

4 Häufigkeit der bronchopulmonalen Dysplasie 39

5 Asnpd und Bronchopulmonale Dysplasie 39

6 Mortalität und Hirnblutung (IVH) 42

7 Asnpd und Oxygenierungsindex 44

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Dipl. chem. F. Pohlandt und Herrn PD Dr. med. A. Trotter für die Möglichkeit der Durchführung dieser Studie, Herrn PD Dr. med. U. Thome für die exzellente Betreuung dieser Arbeit, die Flexibilität bei der Vereinbarung der Messzeitpunkte und die konstruktive Kritik, Herrn L. Maier von der Klinikumsapotheke für die Bereitstellung der Studienlösungen, außerdem den Ärzten und dem Pflegepersonal der Kinderintensivstation für ihr Entgegenkommen und ihre unermüdliche Unterstützung.