
Samenvatting

Om de plotselinge overgang van gasuitwisseling via de placenta naar gasuitwisseling via de longen te bewerkstelligen moeten er tijdens de perinatale periode belangrijke structurele en functionele veranderingen plaatsvinden in de longcirculatie. Deze veranderingen resulteren in een ongeveer 10-voudige toename van bloeddorstrooming omdat er een belangrijke afname van de weerstand in de longvaten ontstaat. Als deze aanpassing in vaatweerstand niet optreedt spreken we van een persisterende pulmonale hypertensie van de neonat (PPHN). PPHN is een klinisch syndroom dat optreedt bij verschillende cardio-pulmonaire afwijkingen die gekenmerkt worden door een blijvende hoge vaatweerstand in de longvaten na de geboorte. Dit resulteert in een rechts-links shunt van bloed over de Ductus Arteriosus of het Foramen Ovale en zal leiden tot ernstige hypoxie.

Omdat het klinisch beeld van PPHN een uiting is van het uitblijven van de postnatale adaptatie in de longcirculatie is het begrijpen van de basale functie en structurele ontwikkeling van de longcirculatie *in utero* van belang om meer inzicht te krijgen in het klinisch beeld van PPHN en in de behandeling ervan. Vanuit deze achtergrond worden in dit proefschrift enkele aspecten van de pathofysiologie en behandeling van PPHN beschreven. In de hoofdstukken II, III en IV wordt een overzicht van de huidige stand van zaken gegeven en in de hoofdstukken V tot XII worden eigen onderzoeksgegevens gepresenteerd. Omdat PPHN geen duidelijk omschreven ziektebeeld is, maar een klinisch syndroom dat op kan treden bij een diverse groep van afwijkingen met diverse oorzaken is het onderzoek beperkt vanwege het gekozen experimentele model. In het voorliggend onderzoek is gekozen voor een model waarbij is uitgegaan van PPHN veroorzaakt door chronische compressie van de Ductus Arteriosus (hoofdstuk V) en door het bestuderen van de vaatreactiviteit in geïsoleerde longvaten te vergelijken met de vaatreactiviteit in geïsoleerde vaten van de lichaamscirculatie (hoofdstukken VI tot XII).

In **hoofdstuk V** wordt bij foetale lammeren aangetoond dat chronische pulmonale hypertensie veroorzaakt door ductus compressie laat in de zwangerschap kan leiden tot een

afname in productie van eNOS mRNA, eNOS hoeveelheid en eNOS activiteit. Deze bevinding is een bevestiging van eerdere studies die aantoonen dat er in dit experimentele model van PPHN sprake was van een afname van pulmonale vasodilatatie.

In hoofdstuk VI wordt de reactie van de pulmonale vaten op hypoxie beschreven. We hebben bij longvaten van pasgeboren biggen aan kunnen tonen dat hypoxie aanleiding geeft tot een passagère contractie, veroorzaakt door een blokkade van endotheel afhankelijke NO productie. Andere endotheel-factoren, zoals b.v. eicosanoiden, waren in dit proces niet betrokken. Echter, een zelfde reactie op hypoxie als in de longarteriën kon ook worden aangetoond in de longvenen, de coronair-arteriën en in de mesenteriaal arteriën ofschoon normaliter alleen de longarteriën met vasoconstrictie reageren op hypoxie. Daarom adviseren we om voorzichtig te zijn met het leggen van verbanden tussen het optreden van een hypoxische pulmonaire vasoconstrictie en de beschreven reactie op hypoxie bij geïsoleerde longarteriën.

Sepsis is een van de belangrijkste factoren die betrokken zijn bij het ontstaan van PPHN. Door sepsis geïnduceerde veranderingen in contractiliteit van longvaten en van vaten in de systeemcirculatie wordt beschreven in de hoofdstukken VII, VIII, en IX. We bestudeerden de vasculaire respons van long- en mesenteriaal arteriën van biggen op enkele vasoconstrictore agonisten door deze vaten te incuberen met geïnactiveerde groep B *Streptococcus agalactiae* (GBS) en *Escherichia Coli* lipopolysaccharide (LPS). GBS en E. Coli zijn de meest voorkomende verwekkers van sepsis bij pasgeborenen. In deze proefopstelling konden we aantonen dat er in alle vaten sprake was van een verminderde contractile respons op noradrenaline. Dit effect werd nog versterkt door toevoeging van L-arginine (het substraat voor NO synthese), terwijl L-NAME (een NOS-remmer) een tegengesteld effect had. Dit toont aan dat een overproductie van NO verantwoordelijk was voor de verminderde contractile respons. Bovendien toonden we aan dat GBS en LPS een duidelijke toename van iNOS activiteit in de long teweegbrachten. Deze bevindingen wijzen er op dat door GBS en LPS geïnduceerde hyporeactiviteit op noradrenaline veroorzaakt wordt door een toegenomen productie van NO via iNOS inductie.

Pulmonaire hypertensie is de meest uitgesproken circulatoire afwijking die gevonden wordt in iedere proefopzet uitgaande van een sepsis. In ons model vonden wij echter dat als longarteriën geïncubeerd werden met voor pasgeborenen frequent voorkomende pathogenen dat er dan sprake was van een inductie van iNOS en een afgenomen vaatrespons op vasoconstrictieve stoffen. Om een verklaring te vinden voor deze tegenstrijdige bevinding bestudeerden we de respons van longvaten op toevoeging van de thromboxane A₂ analoog U46619, ook weer na incubatie met GBS en LPS. Van thromboxane A₂ is aangetoond dat het verantwoordelijk is voor de vasoconstrictieve respons bij door een sepsis geïnduceerde pulmonaire hypertensie, althans zeker tijdens de eerste fase van het proces. Wij vonden dat met GBS of met LPS geïncubeerde longarteriën geen verminderde reactie vertoonden op U46619. In mesenteriale vaten daarentegen vonden we wel een duidelijk verminderde reactie op door U46619 geïnduceerde vaatconstrictie die weer kon worden opgeheven door NOS remming. Het ontbreken van deze verminderde gevoeligheid van longarteriën op U46619 bij een sepsis zou kunnen bijdragen tot het persisteren van pulmonaire hypertensie, zulks ondanks iNOS inductie in de long.

Om het verschil te kunnen verklaren in vasoconstrictie door thromboxane A₂ (d.w.z. door U46619) en door noradrenaline bestudeerden we, zoals beschreven in **hoofdstuk X**, de interacties tussen deze twee stoffen en de NO/cyclisch GMP weg. Hierbij komen ook de mechanismen ter sprake die betrokken zijn bij de door NO/cyclisch GMP geïnduceerde relaxatie. Wij vonden dat diverse stoffen van de cyclisch GMP weg in staat waren om door noradrenaline gecontraheerde arteriën volledig te relaxeren, terwijl dit veel minder het geval was als de arteriën gecontraheerd waren middels U46619. Dit effect was specifiek voor pulmonale longarteriën bij biggen en kon niet worden aangetoond in longarteriën van de rat of bij andere arteriën van biggen. Bovendien had U46619 geen effect op een door N-nitroprusside geïnduceerde cyclisch CMP stijging, of op een door phospho-di-esterase geïnduceerde afbraak van cyclisch GMP. Onze bevindingen wijzen in de richting dat U46619 in staat is om de NO/cyclisch GMP weg tot gladde spier relaxatie meer te remmen dan dat er compensatie via cyclisch GMP aanmaak is.

Omdat het doen dalen van de pulmonale vaatweerstand en het tegelijkertijd handhaven van de systeemdruk van essentieel belang is bij de behandeling van pasgeborenen met PPHN, moet het ideale medicament een stof zijn die een selectieve vasodilatatie in de longvaten geeft. Dit zoeken naar een ideaal medicament is al sinds enkele decennia een doel op zich zelf. In **hoofdstuk XI** beschrijven we een vergelijkend onderzoek naar de relaxerende eigenschappen van een 6-tal mogelijk selectief vasodilatatoire stoffen (acetylcholine, Na-nitroprusside, ATP, PGE₁, tolazoline en nifedipine) op long- en mesenteriale arteriën bij biggen. Afhankelijk van de onderzochte arterie of van de vooraf gebruikte vasoconstrictor (noradrenaline of U46619), of van beiden, vonden we duidelijke verschillen in relaxerend vermogen van deze stoffen. ATP was het enige medicament dat onafhankelijk van de gebruikte concentratie in alle gevallen een sterker relaxerend effect op longarteriën dan op mesenteriaal arteriën had. Zoals al bekend uit klinisch onderzoek waren met name tolazoline en nifedipine niet selectief in relaxerend effect op arteriën van verschillende orgaansystemen.

Van magnesiumsulfaat (MgSO₄) wordt gesuggereerd dat het mogelijk een goed en veilig alternatief medicament voor vaatrelaxatie zou zijn. In **hoofdstuk XII** beschrijven we *in vitro* experimenten om het relaxerend effect van MgSO₄ te meten. We vonden dat MgSO₄ een sterker relaxerend effect heeft op systeem arterien dan op pulmonaal arteriën en dat het in fysiologische concentraties zelfs het relaxerend effect van NO remt. MgSO₄ lijkt geen belangrijke rol te spelen in de reactieve processen die betrokken zijn in de gladde spieren van de longvaten. Immers, veranderingen in extracellulaire Mg²⁺ concentraties hebben geen invloed op vasoconstrictieve effecten van U46619 of op de relaxerende effecten van acetylcholine of Na-nitroprusside. Gezien deze bevindingen menen we te mogen concluderen dat MgSO₄ *in vitro* geen specifiek relaxerend effect op de longarteriën heeft en suggereren we dat het mogelijk klinisch effect op een ander mechanisme berust.

De opzienbarende ontdekking dat het door endotheelcellen geproduceerde simpele molecuul NO verantwoordelijk is voor vaatverwijding heeft geleid tot veel onderzoek naar een mogelijk specifieke behandeling van PPHN. Als NO wordt toegevoegd aan de inademingslucht zijn er door de zeer korte halfwaarde-tijd geen effecten op de

systeemcirculatie en wordt deze therapie thans veelvuldig toegepast bij de behandeling van PPHN. Een ander gas, koolstof monoxide (CO) heeft een vergelijkbaar effect als NO. In **hoofdstuk XIII** beschrijven we een studie die de vasorelaxerende effecten van NO vergelijkt met die van CO. We vonden dat bij beide gassen het relaxerend effect ontstaat via activatie van guanylaat cyclase in de vaatwand. Echter, het vasorelaxerend effect van CO is slechts een fractie (minder dan 1000-voud) vergeleken met dat van NO. Bovendien nam het relaxerend effect van NO toe met de postnatale leeftijd, terwijl dat van CO afnam. Dit suggereert dat de weg waarlangs de guanylaat cyclase activatie verloopt voor beide gassen een andere is. Veranderingen in de pO_2 hadden geen invloed op het relaxerend effect van NO. Maar dit effect werd wel versterkt onder invloed van superoxide dismutase, terwijl de effectiviteit van CO niet beïnvloed werd door activiteit van oxidanten. Hieruit mogen we concluderen dat als deze reacties op CO een afspiegeling zijn van het relaxerend vermogen *in vivo*, dat het dan onwaarschijnlijk is dat CO een directe rol speelt in de regulatie van de pulmonale vaattonus.