

Kortikosteroiders effekt på lungemodning hos premature

**En litteraturstudie og dyreeksperimentell studie
på kylling**

**Hilde Kristine Hagh Sandberg
Johanne Korslund**

**Medisinsk fakultet, Universitetet i Oslo
Mars, 2008**

Veiledere:

Borghild Roald

Professor og leder ved

Senter for barne- og svangerskapsrelatert patologi

Petra Aden

Stipendiat og barnenevrolog

Patologisk anatomisk avdeling, Ullevål Universitetssykehus

Innholdsfortegnelse

Abstract.....	3
Ordliste/forkortelser.....	4
Bakgrunn.....	5
Historikk.....	6
Etikk.....	8
Respirasjonssystemet, embryologi.....	10
Celledød.....	13
Neovaskularisering.....	16
Kortikosteroider: benyttede medikamenter og dose.....	17
Glukokortikoiders virkning på lungemodning.....	20
Steroidbehandling av gravide, enkel kur.....	23
Steroidbehandling av gravide, repeterte kurer.....	24
Steroidbehandlings effekt på modningen av fosterorganer. Et pilotprosjekt med kylling som modell.....	25
Referanser.....	30

Abstract

Children born preterm are at risk of complications due to immature organ systems. The lungs are normally not ready for gas exchange until the 24th gestational week. Numerous studies have shown the beneficial effect of antenatal steroids on lung maturation. To enhance maturation of the lungs, antenatal steroids are now standard treatment for women at risk of preterm birth prior to 34th gestational week. This has significantly increased the possible for a premature child to survive, and to survive without severe lung disease. However, questions still remains as to ideal dosage, type of steroid or form of administration. The relevant literature is reviewed.

The cellular mechanisms of the beneficial steroid therapy are not completely understood. It is known that steroids increase the production of surfactant. We postulated that they additionally increase apoptosis in the interstitial tissue and thus make gas-exchange easier by reduced distance between alveolar epithelium and septal capillaries. The hypothesis was tested in an experimental pilot study.

A series of chick embryo were treated with either steroids or placebo at various stages of late embryonic life. The number of interstitial lung mesenchymal cells in apoptosis was counted in sections immunostained with apoptosis-markers TUNEL and caspase 3. Only small differences were seen between the steroid group and controls. The apoptotic index alone could thus not alone explain the beneficial effects of steroids in the interstitial tissue. Our revised hypothesis additionally includes increases capillary neovascularisation in the interstitial tissue.

Ordlister/forkortelser

AP-1 – aktiverende protein 1

ATP – adenosine trifosfat

CLD – kronisk lungeskade

CPAP – kontinuerlig positivt lufttrykk

DNA – denukleotidsyre

FGF – fibroblast vekstfaktor

GI – gastrointestinal

GR – glukokortikoidreseptor

GRE – glukokortikoidresponsive elementer

HFOV – høy frekvent oscillerende ventilering

IVH – intraventrikulær blødning

NEC – nekrotiserende enterokolitt

NF-kappaB – nukleær faktor kappaB

NIH – national institute of health

PDGF – blodplatederivert vekstfaktor

PVL – periventrikulær leukomalaci

RCT – randomisert kontrollert forsøk

RDS – respiratorisk distress syndrom

ROP – retinopati hos premature

SP – surfaktant-assosiert protein

TNF – tumor nekrose faktor

TUNEL – terminal deoksynukleotidyl tranferasemediert dUTP nick-end markering

VEGF – vaskulær endotelial vekstfaktor

Bakgrunn

Da Liggins i 1969 undersøkte effekten av dexametasone på prematur fødsel hos sauer, forventet han at lungene til de premature lammene skulle være lufttomme. Han fant at alveolene var noe utspilte og postulerte at dexametasone kunne ha ført til en tidligere surfaktantvirkning i fosterlivet. Hypotesen var at steroider frigjør allerede lagret surfaktant, samt at steroider kunne føre til prematur dannelse av surfaktant, mulig via akselerert enzymatisk aktivitet (36).

Liggins videreførte sin forskning på kortikosteroider ved en randomisert klinisk undersøkelse (RCT) i samarbeid med pediateren Howie i 1972. Kvinner med truende prematur fødsel ble randomisert til å motta enten betametasone eller placebo. Betametasone viste seg å signifikant redusere respiratorisk distress syndrom (RDS) hos de nyfødte. Dette styrket Liggins hypotese om at kortikosteroider bidrar til surfaktantproduksjon og dermed minsker risiko for utvikling av RDS (35). Mange kliniske studier har siden verifisert effekten av kortikosteroider på lungemodning. Den første Cochrane-analysen av disse studiene ble publisert i 1990 (9) og konkludert med at kortikosteroiders påvirkning av fostere før en prematur fødsel effektivt reduserer forekomst av RSD hos nyfødte. Dette igjen reduserer neonatal mortalitet.

Fram til 1994 var mange klinikere kritiske til bruk av kortikosteroider ved truende prematur fødsel, til tross for stadig bedre dokumentert effekt (24). Dette endret seg etter en konsensuskonferanse ved National Institutes of Health (NIH) i USA i 1994. Konklusjonen ble anbefalt bruk av en enkelt kur med kortikosteroider ved truende prematur fødsel i gestasjonsuke 24-34 (25).

Tidlige studier hadde antydnet at den gunstige effekten av steroidbehandlingen ble redusert etter 7 dager (35). I kjølvannet av konsensus-konferansen ble det derfor prøvet med repeterte doser steroider ved fortsatt truende prematur fødsel 7 dager etter forrige dose. Gravide kunne derfor motta svært mange doser (25). En RCT og flere små retrospektive studier antydnet beskjeden eller ingen tilleggseffekt av repeterte doser, og det ble stilt spørsmål om farlige langtidsbivirkninger på bl.a. nervesystemets utvikling. En ny konsensusrapport fra NIH i 2000 anbefalte begrenset bruk av repeterte steroiddoser til kontrollerte forsøk (25). I flere land pågår det nå RCTer som sammenligner effekt av enkle doser kortikosteroider versus repeterte doser. Per i dag vet man ikke hva som er optimal enkel dose, ei heller langtidsbivirkninger av repeterte doser. (11)

Historikk

Tiltak i behandlingen av premature i dag inkluderer:

- Antenatale steroider
- Surfaktant
- Kuvøse
- Oksygentilførsel
- Ventilasjonshjelp
- Postnatale steroider
- Miljøtiltak

Antenatale steroider gis som standardbehandling til alle gravide ved truende prematur fødsel før 34. fosteruke. Steroidbehandling ble standard i Norge på slutten av 1980-tallet (38). Det gis nå steroider til over 90 % av de aktuelle gravide. Standardbehandling i dag er 12mg betametason x 2 over 48 timer. Man har gått bort fra tidligere praksis med flere kurer ved fortsatt truende prematur fødsel. Tilsynelatende gir det ikke bedre effekt (25).

Surfaktant produseres naturlig i lungene av type II pneumocytter og er viktig for å hindre kollaps av alveolene ved ende-ekspirasjon. Surfaktantproduksjonen starter i uke 23/24 (41), og kan derfor være utilstrekkelig hos de svært for tidlig fødte. For å kompensere dette kan kunstig produsert surfaktant tilføres premature barn enten via spray eller i innåndingsluften. Behandlingen har redusert forekomst av respiratorisk distress syndrom og kronisk lungesykdom hos premature (45). I 1991 ble dette rutinebehandling av svært premature i Norge (38).

Kuvøser har til hensikt å skape et stabilt miljø rundt barnet. Temperaturen kan være såpass høy at barnet kan ligge avkledd, og er derved lettere å observere for helsepersonell. I tillegg kan man regulere luftfuktigheten og lettere gi oksygenbehandling. Foreldrene kan også ha hudkontakt med barnet (38). Varmluftsinkubatorer på fødeavdelinger ble introdusert av Stephane Tarnier i 1881 (15) og ble demonstrert på verdensutstillingen i Berlin i 1896. Inspirert av dette startet den amerikanske legen Martin Couney ”incubator baby side-show”, der han dro rundt i USA og viste fram premature barn i kuvøser (40). I Norge ble kuvøser del av rutinebehandlingen av premature på 1950-tallet (38).

Oksygentilførsel brukes som supplement til barn som puster dårlig. Man ble etter hvert klart over oksygenets skadelige virkninger, som f.eks dannelse av frie oksygenradikaler. En fryktet komplikasjon er retinopati hos premature (ROP), med blindhet som mulig følge (40). I dag gir man derfor så lite oksygen som mulig. For å motvirke skadevirkninger gir man oksygenradikalfangere til alle barn født før 28. uke, samt til de som får oksygentilførsel. Antioksidantene som brukes er vitamin A, C og E (23).

Ventilasjonshjelp er nødvendig for mange premature. Førstevalget er CPAP, kontinuerlig positivt luftrykk på maske, men der barnet puster på egenhånd. Dersom dette ikke er tilstrekkelig, må barnet intuberes og legges på respirator med lavest mulig trykk. Respiratorbehandling øker faren for lungesykdom og cor pulmonale. (38)

Postnatale steroider brukes i dag mindre enn tidligere. Effekten har ikke har vært overbevisende, og bivirkningene potensielt store. Retningslinjer fra American Academy of pediatrics fra 2002 angir at postnatale steroider ikke skal brukes hos barn med fødselsvekt under 1500g. Bruken skal være begrenset til kontrollerte randomiserte forsøk. For øvrig anbefales postnatale steroider kun i "ekstreme" tilfeller og krever da informert samtykke fra pårørende. Man etterlyser også langtidsoppfølging av barn som har vært behandlet med postnatale steroider for å vurdere deres nevrologiske utvikling (48).

Miljøtiltak rundt premature har vært i fokus de seinere år: Viktigheten av mor-barn hudkontakt, amming og generell kontakt mellom foreldre og barn. Stikkord er musikk, farger, "trygt og koselig miljø" lite stress etc (Newborn Individualized Developmental Care and Assessment Program,- NIDCAP) (40).

Milepæler i neonatalogien gjennom historien: (27)

- 1780- ble oksygen for første gang brukt hos nyfødte.
- 1834- Første beskrivelse av endotrakeal intubasjon for resusitering av nyfødte
- 1857- Første publiserte beskrivelse av inkubator i vestlig litteratur.
- 1880- Introduksjon av "kuvøse" (lukket inkubator, "thermophon") ved Paris Maternité
- 1889- Første bruk av oksygen (O₂) for premature.
- 1891- Termoregulert inkubator, seinere produsert av Paul Altmann i Berlin
- 1914- Inkubator enhet ved Michael Reese Hospital, Chicago.
- 1934- Modifiserte elektrisk oppvarmede inkubatorer for O₂ administrering.
- 1951- Retinopati hos premature (ROP) først linket til O₂ bruk.
- 1953- Oppfinnelse av høy-frekvens oscillerende ventilering (HFOV).
- 1959- Surfaktantmangel identifiseres som årsak til "respiratorisk distress syndrom" (RDS).
- 1971- Bruk av kontinuerlig positivt luftveistrykk (CPAP) for RDS.
- 1972- Kontrollert forsøk: antenatale glukokortikoider for å hindre RDS.
- 1980- Surfaktant som behandling av RDS.
- 2000- Aktuelle temaer: Baby-vennlig miljø, empirisk basert neonatal etikk.

Etikk

Behandling av for tidlig fødte barn reiser viktige etiske spørsmål. Mange av de overlevende får alvorlige permanente skader og må leve tilrettelagte liv. Er det etisk forsvarlig å behandle de alt for tidlig fødte? Kan ulemper i forhold til overlevelse med alvorlige sekveler oppveies av de mange som overlever uten alvorlige helsemessige konsekvenser?

De etiske retningslinjer som ligger til grunn for vurderingene i klinisk praksis er blant annet FNs barnekonvensjon (28). I artikkel 3 nevnes det at en hver handling som omhandler barn må skje med tanke på barnets beste. Loven om helsepersonell mv. (26) sier at Helsepersonell skal utføre sitt arbeid i samsvar med de krav til faglig forsvarlighet og omsorgsfull hjelp som kan forventes ut fra helsepersonellens kvalifikasjoner, arbeidets karakter og situasjonen for øvrig. Legeetikken baseres også på den Hippokratiske ed som fastslår legens forpliktelse til å ikke drepe pasienten sin under noen omstendigheter. Samlet sett har legen plikt til å respektere barnets liv og helse ved å opprettholde liv og bekjempe sykdom. En hver potensiell behandling skal ideelt sett gi maksimale fordeler og færrest mulig bivirkninger. Noen ganger vil likevel ikke opprettholdelsen av barnets liv være det beste, særlig når man må veie fremtidig lidelse mot livets ende.

Barnets autonomi skal også respekteres. (28) Da det premature barnet ikke kan uttale seg på egne vegne, ligger ansvaret for å bestemme hva som er barnets beste hos foreldrene. Deres mening farges av individuelle moralske, kulturell, sosiale og religiøse normer. I noen tilfeller kan det være vanskelig, særlig når individers personlige meninger og moralske verdier er forskjellige. Barnets helse skal ivaretas av både sykehuspersonale og foreldre, og det er viktig at samarbeidet her er godt. Man forholder seg imidlertid alltid til lovverket i landet behandlingen gis.

Internasjonalt er grensen for premature satt til under 37 ukers gestasjonsalder. Dette tilsvarer 5-6 % av de ca 60 000 årlige fødsler i Norge. Svært premature er definert som født før 28 gestasjonsuker. Internasjonalt sett har Norge god svangerskapskontroll og lav spedbarnsdødelighet, også hos premature (39). I Norge behandler man som hovedregel dem over 23 til 25 gestasjonsuker. Fødselstermin bestemt via ultralyd har et slingringsmoment av 1-2 uker (42). Hvert prematurt barn blir imidlertid vurdert individuelt hovedsakelig fordi organmodningen varierer. Grad av lungemodning er kritisk. Ved en prematur fødsel vurderes derfor barnets vitalitet, ved bl.a. hjerteaksjon og muskeltonus, men også ut fra klinikerens erfaring. Apgar score er vanskelig å bruke på premature, da de i utgangspunktet vil score lavt (38). Ofte igangsettes behandlingen, for så heller å avslutte noen dager senere, dersom det vurderes nytteløst. Derved kan man få vurdert hvorvidt barnet responderer på behandling. Det er viktig at foreldrene vet at man har gjort det man kan for barnet. De kan da forhåpentlig vis forsone seg med at barnets liv ikke stod til å reddes (38).

Den faktiske overlevelsesraten for ekstrem premature gjenspeiles i en undersøkelse av Markestad et al. Alle norske fødsler i 1999 - 2000 av svært premature barn (fra 22-27 fosteruke eller vekt mellom 500 og 999 gram) ble registrert, totalt 636 fødsler. 174 barn (27 %) var dødfødte eller døde på fødestua, 86 (14 %) døde på nyfødtintensiv avdeling, mens 376 (59 %) ble utskrevet. Relatert til gestasjonsalder var overlevelse for de som ble overført til intensivavdelingen 0 % for de under 23 uker, 39 % for de 16 % som var 23 uker, 60 % for de 44 % som var 24 uker, 80 % for de 66 % som var 25 uker, 84 % for de 72 % som var 26 uker og 90 % for de 69 % som var over 27 uker. Forekomsten av prematur retinopati (ROP) var høyere ved lavere gestasjonsalder (forekom kun under 26 uker) og økte med lavere

gestasjonsalder. Dersom man så vekk fra ROP ved alvorlig morbiditet, var det ikke store forskjeller mellom gestasjonsalder, bortsett fra en liten økning ved 25 gestasjonsuker, og noe mer ved 24 gestasjonsuker. Dette antas å skyldes at man er mer restriktive med behandling av de aller minste, derfor overlever færre av disse med alvorlig sekvele.

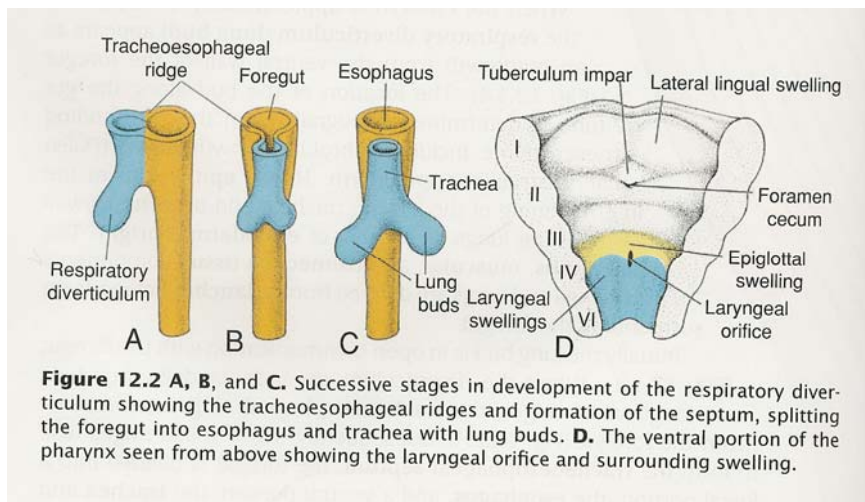
Som Markestad et al antyder, skjer mange dødsfall på neonatalintensivavdelingen som resultat av ikke oppstartet eller avsluttet livsbevarende behandling. Aktuelle intervensjoner er resusitering ved fødsel, kunstig ventilasjon og parenteral ernæring (38). Valget om å avslutte behandling tas på grunnlag av ekspertenes erfaring, i samarbeid med foreldrene (39). Foreldrene blir hørt, og de er i de fleste tilfeller enige i legens avgjørelse (38). God kommunikasjon mellom foreldre og lege er helt avgjørende (6). Hvis det er uenighet mellom partene om hva som er best for barnet, konsulteres spesialister fra andre sykehus/avdelinger. Om nødvendig lar man saken gå til etisk råd (37). Dersom foreldrene ikke er enige i sykehusets avgjørelse om å avslutte behandling, er vanlig praksis i Norge at man fortsetter behandlingen en stund, og legger vekt på informasjon til foreldrene. Til slutt vil foreldrene oftest se at barnet ikke er tjent med videre behandling. Noen ganger ønsker foreldre å avslutte behandlingen mens legene mener at videre behandling er hensiktsmessig. Kommer partene ikke til enighet, må det også her spesialister fra andre sykehus eller etisk råd kobles inn (38).

Vurderingen av barnet inkluderer sjansen til å overleve, eventuelt med sekveler, og foreldrenes ressurser. Miljøet barnet skal vokse opp i tas med i betraktningen (38). Svært premature har en stor overhyppighet av tilpasningsvansker, lærevansker, asosial atferd, cerebral parese, hyperkinetiske forstyrrelser og andre barnepsykiatriske tilstander (16). Dette skyldes en cerebral ”umodenhet” ved fødsel. Mange premature vil på grunn av hypoksi få hjerneskader som intraventrikulær blødninger og periventrikulær leukomalaci. Andre komplikasjoner er nekrotiserende enterokolitt, cor pulmonale og prematur retinopati (ROP) (39). Barn fra ressurssvake hjem sies å ha ”dobbel risiko”. Som premature har de risiko for komplikasjoner, og i ressurssvakt miljø har de risiko for ikke å bli ivaretatt godt nok. Man vil derfor være mer restriktiv med aggressiv behandling av disse barna, for å hindre at de overlever med store sekveler (38).

Vurderingen av hva som er ”et liv verdt å leve” er etisk et vanskelig og et ømtålig tema. Man skal alltid tenke på barnet beste, og hvor mye plager barnet vil få gjennom livet, i form av operasjoner og smertefull behandling (42). Barn som vil ha problemer med å spise, snakke, lære og sitte vil få store vanskeligheter med å klare seg. De fleste barna med slike utsikter vil man være enige om å ikke redde. På den annen side kan barn med døvhet, blindhet eller cerebral parese leve fullverdige liv, og dette vil ikke være grunn til å avslutte behandling.

Respirasjonssystemets embryologi

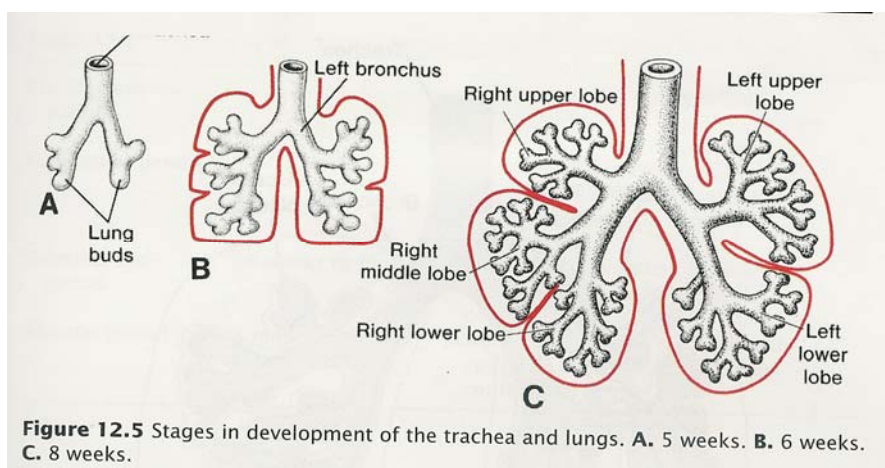
I fjerde fosteruke vokser den respiratoriske divertikkelen frem fra ventrale vegg i fortarmen. Lokalisering av knoppen styres av signaler fra omkringliggende mesenkym som instruerer endodermen med blant annet FGF (fibroblast growth factor). Epitelet på innsiden av larynx, trakea, bronkier og lunger har dermed endodermal opprinnelse. Brusk, muskulatur og bindevev kommer fra den splanchniske mesoderm som omgir fortarmen. Tidlig i forløpet har lungeknoppen åpen kommunikasjon med fortarmen. Når knoppen ekspanderer i kaudal retning danner det seg innbuktninger vertikalt bilateralt som møtes i midtlinjen og deler lungeknopp og fortarm. Innbuktningene kalles tracheoesophageal voller og blir til septum. Åpen kommunikasjon består mellom larynx og spiserør (laryngeal orifice) (45).



I henhold til Moore's Clinically oriented embryology (41) er utviklingen av lungeparenchymet delt i fire stadier: Den pseudoglandulære perioden fra 5-17 uke, den kanalikulære perioden fra 16-25 uke, terminalsekk perioden fra 24 uker til fødsel og den alveolære perioden fra sen føtal periode til ca 8 års alder.

Den pseudoglandulære perioden (5-17 uker)

På dette tidlige stadiet likner lungene en eksokrin kjertel, med forgrenede ganger med kubisk epitel. Ved uke 17 er lungenes anatomiske hovedtrekk utviklet. Unntaket er strukturene som er nødvendige for gassutveksling. Respirasjon er derfor ikke mulig. Barn som blir født i denne perioden vil ikke kunne overleve.



Den kanalikulære perioden (16-25 uker)

Denne perioden overlapper med den pseudoglandulære fordi de kraniale delene av lungen utvikler seg raskere enn de kaudale. I løpet av perioden øker diameteren av lumen i bronkiene og de terminale bronkiolene, og lungevevet blir i økende grad vaskularisert. Ved 24. uke har hver terminale bronkiole gitt opphav til to eller flere respiratoriske bronkioler. Mot slutten av denne perioden utvikles tynnveggede terminalsekker i enden av de respiratoriske bronkiolene. Dette blir til de primitive alveolene. Områdene rundt disse øker i vaskularisering og kapillærene legger seg inn mot epitelet. Derved er en fremtidig gassutveksling mulig. Barn født i slutten av denne perioden kan med intensiv behandling overleve. Ofte dør de på grunn av for lite utviklet respirasjonssystem og iskemiske organskader.

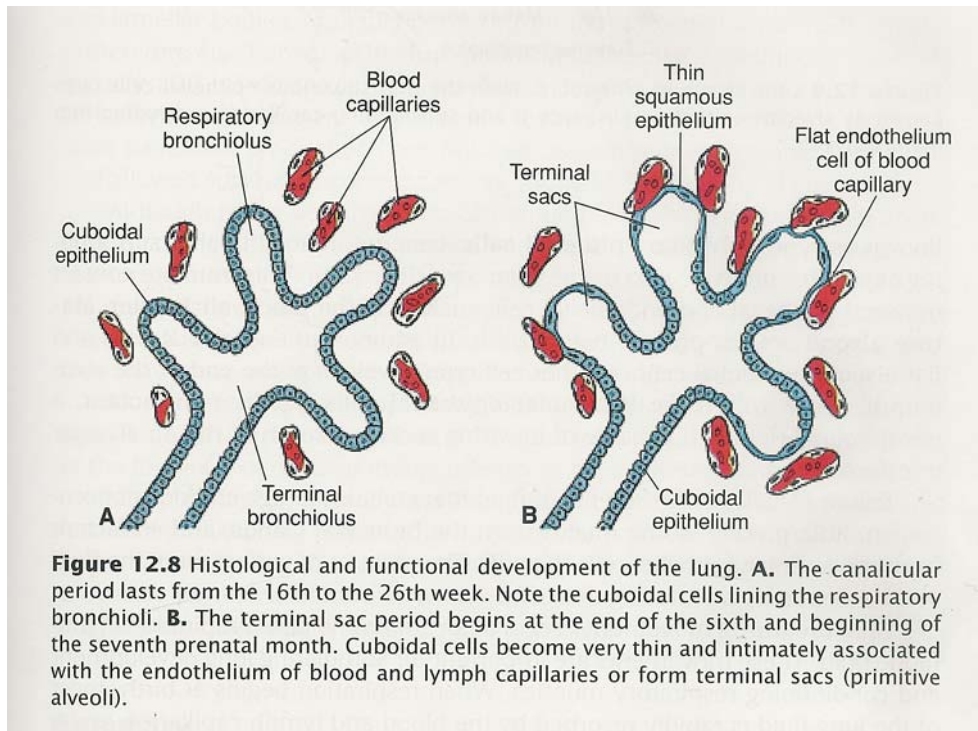


Figure 12.8 Histological and functional development of the lung. **A.** The canalicular period lasts from the 16th to the 26th week. Note the cuboidal cells lining the respiratory bronchioli. **B.** The terminal sac period begins at the end of the sixth and beginning of the seventh prenatal month. Cuboidal cells become very thin and intimately associated with the endothelium of blood and lymph capillaries or form terminal sacs (primitive alveoli).

Terminalsekk perioden (24 uker - fødsel)

I denne perioden utvikles mange flere terminale sekker. Epitelet som avgrensner dem blir tynt med kapillærer tett mot epitelet. Ved uke 24 er terminalsekkene hovedsakelig kledd av type I alveolære celler eller pneumocytter. Kapillærnettverket prolifrerer hurtig i det løsmaskede mesenkymet rundt de primitive alveolene. Det utvikles også lymfekarillærer. Spredt i mellom pneumocytterne utvikles rundere celler som kalles sekretoriske epitelceller eller type II pneumocytter. Disse produserer og sekreterer surfaktant, som legger seg som et tynt lag på innsiden av terminalsekkene. Surfaktant senker overflatespenningen i alveolepitelet og muliggjør ekspansjonen av de primitive alveolene. Surfaktantmengden øker med økende gestasjonsalder. Ved 26. til 28. gestasjonsuke veier fosteret rundt 1000 g og har tilstrekkelig antall terminalsekker med nok produksjon av surfaktant til overlevelse. Fostre forløst 24 uker etter befruktning kan derfor overleve med adekvat behandling av surfaktanttilskudd. Graden av vaskularisering av lungevevet spiller også inn mht overlevelse.

Den alveolære perioden (36 uker – 8 års alder)

Terminalsekkenes epitellag blir tynnere, mengde interstitielt mesenchym reduseres og kontaktflaten mellom epitel og kapillærene øker. De strukturelle forberedelsene til gassutvekslingen som skal skje etter fødselen er ferdige. I begynnelsen av den alveolære perioden ender hver respiratoriske bronkiolen i en klynge av tynnveggede terminalsekker skilt fra hverandre av løst bindevev. Den modne alveolen dannes ikke før etter fødsel. Før fødselen ligner de umodne alveolene små utposninger i veggen av terminalsekkene og de respiratoriske bronkiolene. Etter fødselen øker alveolene i størrelse ettersom lungene fylles med luft. Det meste av lungenes vekst skyldes imidlertid at flere alveoler og respiratoriske bronkioler dannes. Alveolene fortsetter å dannes ved utposninger helt opp i åttende leveår. Primitive alveoler slutter å deles, vokser i størrelse og blir til modne alveoler. Antallet alveoler ved åtte års alder er åtte ganger så mange som ved fødsel eller ca 300 millioner. Fosterets pustebevegelser starter før fødselen. Fosteret aspirerer noe fostervann, som er viktig for normal lungeutvikling og modning. Ved fødselen er lungene ca halvfyllt av væske. Denne absorberes, med unntak av surfaktant, og erstattes med luft ved babyens første skrik. Væsken forsvinner gjennom tre ulike kanaler. Noe hostes opp gjennom munn og nese ved presset på thorax i fødselsøyeblikket, noe tas opp i pulmonale kapillærer, resten forsvinner gjennom lymfesystemet.

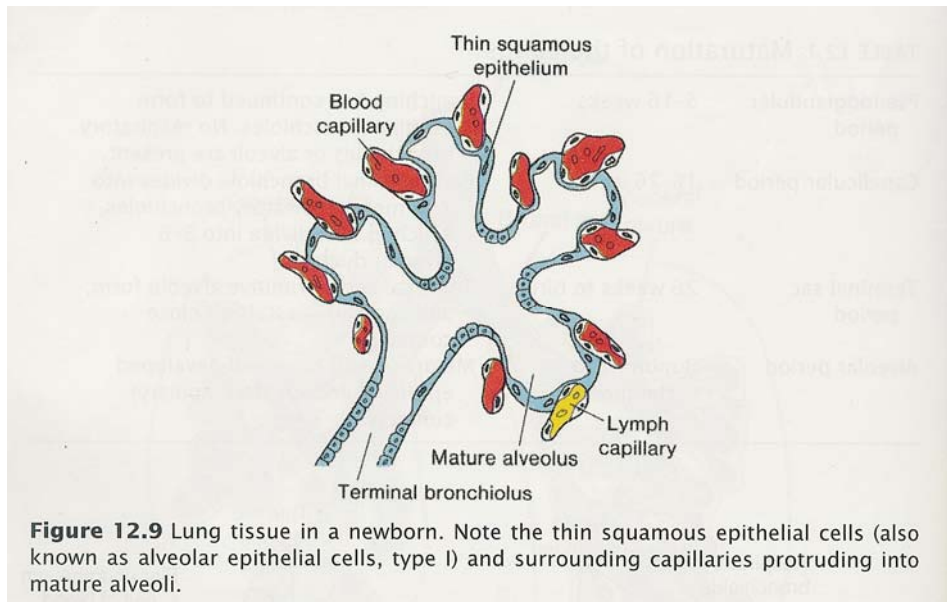


Figure 12.9 Lung tissue in a newborn. Note the thin squamous epithelial cells (also known as alveolar epithelial cells, type I) and surrounding capillaries protruding into mature alveoli.

Kliniske aspekter

Surfaktant er spesielt viktig for overlevelsen til premature barn. Ved utilstrekkelig mengde vil luft-vann(blod) overflatemembranspenningen bli for høy og alveolene kan kollabere ved ekspirasjon. Det blir ischemiske forandringer med fibrinutfellinger i alveolene. Barnet utvikler hyaline membraners sykdom, også kalt respiratory distress syndrome (RDS). Dette er en vanlig dødsårsak blant ubehandlede premature. Utvikling av kunstig surfaktant og behandling av truende prematur fødsel med glukokortikoider for å stimulere surfaktantproduksjon har redusert mortaliteten assosiert med RDS. Dette har fått premature ned til 22. gestasjonsuke til å overleve (45).

Celledød

Celler kan dø på tre forskjellige måter; ved apoptose, nekrose eller autofagi.

Apoptose er fysiologisk eller programert celledød. Alle celler har evne til apoptotisk død, det vil si at cellene har en innebygget selvmordsmekanisme (4).

Nekrose er kommet av det greske ordet lik (gr. Nekros = lik) og er en type celledød som skyldes en ytre abnormal påvirkning som ischemi eller kjemisk skade, og er alltid patologisk. Nekrose gir inflammasjon. (33)

Autofagi er en intracellulær degraderingsprosess der deler av cytoplasma avsondres i autofagosomer, som videre binder seg til lysosomer (13).

Den genetiske og molekylære mekanismen for apoptose ble først oppdaget på 1980-tallet (32). Siden da har interessen økt voldsomt. Økt eller redusert apoptose oppfattes som viktige prosesser ved for eksempel kreftutvikling, autoimmune sykdommer og nevrodegenerative sykdommer. Apoptose er også viktig i organogenesen. Det genereres ofte overtallige celler ved organdannelse. Disse blir redusert til riktig antall celler via apoptose. Vevsforbindelser mellom fingre og tær fjernes for eksempel ved apoptose.

Apoptose regulerer normalceller som har levd sitt tilmålte liv. Celler som ikke lenger mottar overlevelsessignaler vil gå i apoptose. Hypotesen er at "the signal to live is that other cells tell you not to die". Apoptose er også viktig i kroppens immun- og betennelsesforsvar.

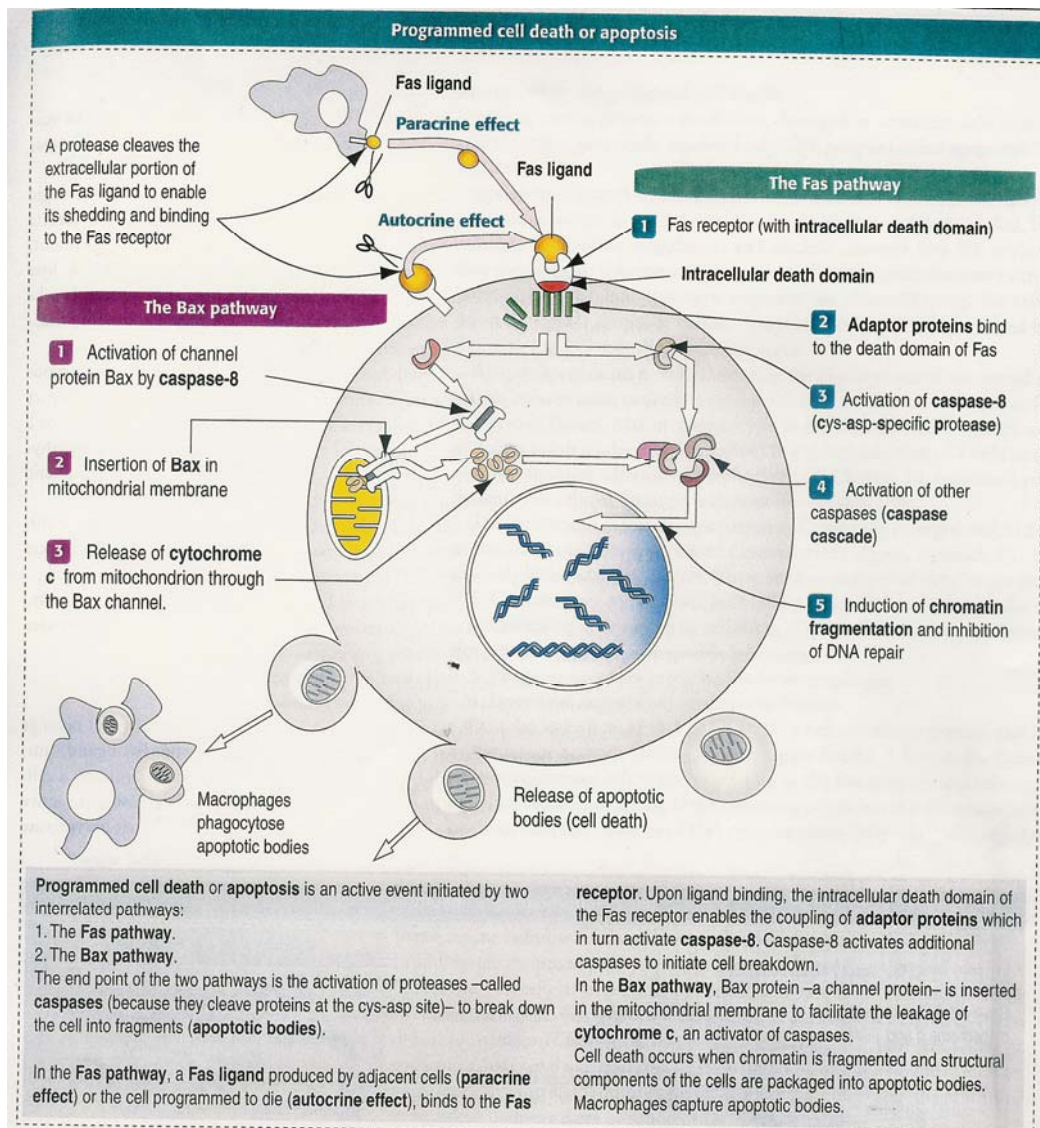
Cytotoksiske T-lymfocytter dreper målcellen ved apoptose. Apoptose kan induseres ved visse cytokiner, ved patologiske tilstander som DNA-skade ved for eksempel UV-lys og annen stråling, og påvirkning av visse cellegifter/cytostatika (4).

Det er fire steg på vei til apoptose.

- 1) Cellen får beskjed om at den skal dø, enten fra ekstracellulære eller intracellulære faktorer.
- 2) Caspaser (intracellulære proteaser) aktiveres og bryter ned cellen til fragmenter.
- 3) Fragmentene (apoptotiske legemer) blir fagocyttert av makrofager.
- 4) Lysosomer i makrofagene degenererer de apoptotiske legemene.

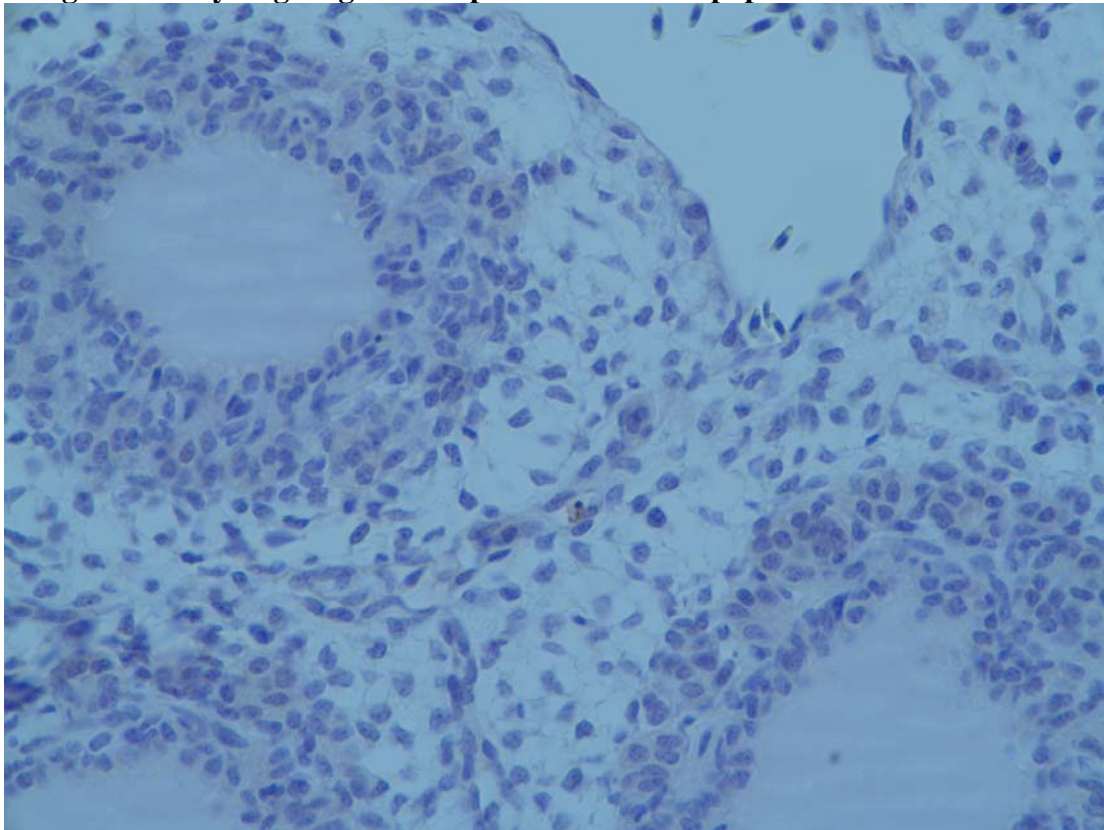
Ved ekstracellulære apoptosesignaler vil Fas-reseptoren aktiveres. Denne tilhører tumor nekrose faktor (TNF) reseptor familien, og er et cellemembranprotein med et intracellulært morderdomene. En ligand, Fas-ligand, initierer programert celledød ved å binde seg til Fas-reseptoren. En intracellulær signalkaskade startes og ender med aktivering av flere caspaser (intracellulære proteaser) og spesielt caspase 8. Den intracellulære signalvei startes ved at proteinet Bax tar imot intracellulære signaler og inducerer lekkasje av mitokondriell cytokrom c inn i cytosol, som i sin tur aktiverer flere caspase og spesielt caspase 9. Både caspase 8 og 9 fører til aktivering av caspase 3 som ansees som sentralt i den cellulære fragmenteringsprosessen (32).

Cellen krymper og avsnører små biter av seg selv, apoptotiske legemer. Restriksjonsenzymmer klipper opp cellens DNA. De apoptotiske legemene inneholder fragmenter av det oppklippede DNA og annet celleinnhold. På denne måten kan man si at cellen smuldrer opp. De små blærene blir fagocyttert av makrofager. Membranene forblir intakte slik at skadelige stoffer inne i cellen ikke lekker ut. Det oppstår derfor ingen betennelsesreaksjon slik som ved nekrose. Prosessen er aktiv og krever energi i form av ATP (32).

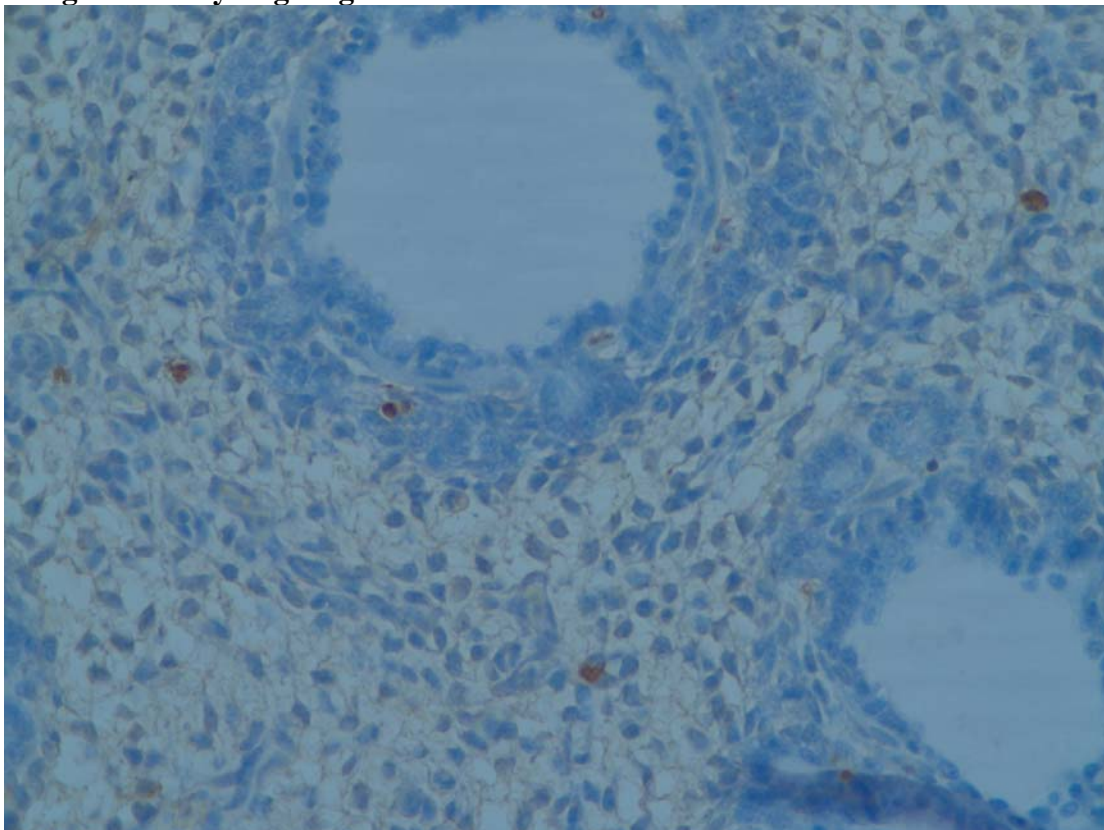


Apoptose kan sees mikroskopisk i vevssnitt, både lymfisk og elektronmikroskopisk. Lymfisk vil man se kjernekonkondensasjon, eosinofilt cytoplasma og eventuelle apoptotiske legemer. Elektronmikroskopisk kan man tydelig se apoptotiske legemer og cellefragmenter. Apoptoseprosessen kan synliggjøres immunhistokjemisk. To mye brukte metoder er merking av TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) og Caspase 3. TUNEL kan identifisere DNA fragmentering, som er karakteristisk for apoptotiske celler, men denne finnes også i nekrotiske celler. For å skille apoptose og nekrose kan man immunfarge f. eks. med antistoff mot aktiv caspase 3. Man kan telle antall positive celler i seriesnitt eller i dobbeltfargede snitt. De TUNEL/caspase 3 positive cellene angir da de apoptotiske (29).

Lungevev fra kylling farget av caspase 3 for å vise apoptotiske celler



Lungevev fra kylling farget av TUNEL



Neovaskularisering

Neovaskularisering betyr dannelse av nye blodårer via knoppskyting fra eksisterende årer. Blodårer perfunderer alle kroppens organer og sørger for oksygen og næringsutveksling. Nyere forskning tyder på en direkte parakrin signalisering mellom blodårene og målorganene (8). Endotelet har organspesifikke antigener (1) som modellerer blodårer spesifikke for hver vevstype slik at de passer til vevets funksjon. Endotelet produserer også humorale,- og vekstfaktorer, cytokiner og celleoverflatemolekyler. PDGF (blodplatederivert vekstfaktor) og parakrin faktor produsert via stimulering av den endoteliale reseptoren tyrosin kinase Tie-2 er identifisert som viktige endoteliale faktorer for nydannelse av blodårer i embryo (8).

I det tidlige embryo er det direkte kontakt mellom endotelet og vev, både i kapillærsengen og før dannelsen av blodårenes vegger. Dette gir muligheten til gjensidig signalisering (8). I det tidlige embryoet eksisterer ikke organspesifikke antigener, men ganske tidlig oppstår molekylære forskjeller mellom arterier og vener (34). Senere oppstår de vevsspesifikke forskjeller i kapillærsengen på bakgrunn av signaler fra vevet til endotelet (8). Vev regulerer vaskulær arkitektur via lokale angiogene stoffer som bl.a VEGF (vaskulær endotelial vekstfaktor). I modningen av lungene vil neovaskularisering i interstitiet være nødvendig for bedret gassutveksling. Mekanismen for hvordan dette foregår er lite kjent
I det tidlige embryo er det direkte kontakt mellom endotelet og vev, både i kapillærsengen og før dannelsen av blodårenes vegger. Dette gir muligheten til gjensidig signalisering (8).

Kortikosteroider: Benyttede medikamenter og dose

Etter NIHs konsensuskonferanse i 1994 ble det standardbehandling å gi alle gravide med truende for tidlig fødsel før 34. fosteruke en enkelt kur med kortikosteroider for å akselerere lungemodningen og å hindre RDS. (25)

Anbefalingen var betametason (løsning av betametasonacetat og betametasonfosfat) eller dexametason (som dexametasonfosfat). Betametason ble anbefalt gitt som 2 intramuskulære injeksjoner med 24 timer mellomrom, hver på 12 mg. Dexametason som 4 intramuskulære injeksjoner med 12 timers intervall, hver på 6 mg. Totaldosen av hvert steroid ble da 24 mg over 48 timer (31).

Betametason og dexametason er gunstige steroider av flere årsaker. De går lett over placenta, er aktive lenger enn kortisol, har lite immunsupprimerende aktivitet og har ikke mineralkortikoid virkning (52).

Betametason og dexametason er strukturelt svært like steroider. Forskjellen ligger i at dexametason har sin metylgruppe i posisjon 16 i alfakonfigurasjon, mens betametason har metylgruppen i betakonfigurasjon. De har lik biologisk aktivitet (50), men farmakokinetikken er litt forskjellig. Betametason har en lengre halveringstid, noe som avspeiler seg i de forskjellige doseringsregimene for behandling av gravide. Varigheten av økt kortikosteroid aktivitet i vevet er 60 timer for dexametason og 72 timer for betametason (14). Dexametason varierer også mer i sirkulerende steroidnivå. Prenatal betametasonbehandling er sammenlignbar med en fysiologisk stressreaksjon. Dyrestudier har antydnet at betametason er 2-3 x mer potent enn placebo til å akselerere lungemodning (14)

Problemet med både betametason og dexametason er tilgjengeligheten. Ingen av steroidene er patentert, og legemiddelfirmaene har vært lite villige til å produsere stoffene for antenatal bruk (31). På grunn av manglende tilgjengelighet, har det vært antydnet at man som et alternativ kan bruke 2g hydrokortison. Dosen må være så høy fordi placentaenzymet 11beta-hydroksysteroid dehydrogenase bryter ned hydrokortison. Enzymet skal beskytte fosteret mot maternelt kortisol (9). Klinisk forskning på dette har vært begrenset, og konsensuskonferansen anbefalte kun bruk av betametason og dexametason (24). Hydrokortison er kun å regne som et siste alternativ der de anbefalte steroidene ikke er tilgjengelig.

Liggins og Howie brukte betametason i sin RCT, fordi det går lett over placenta, og fordi acetatsaltene muligens har noe lengre virkning enn dexametason (35). Dexametason ble valgt i forsøk i USA i etterkant, fordi de ikke fant noe placebo med likt utseende som betametason (31).

I USA er det anbefalt at man enten bruker dexametason eller betametason i behandling av prematur fødsel. Det har blitt diskutert i hvorvidt man skulle foretrekke enten dexametason eller betametason. Av de 18 forsøkene i Crowleys metaanalyse over effekten av antenatale steroider, brukte 11 betametason, 5 dexametason og 2 kortisol (10). Jobe et al brukte data fra Crowleys metaanalyse til å sammenligne betametason og dexametason. De så på utfallene respiratorisk distress syndrom (RDS), intraventrikulær blødning (IVH), føtal eller neonatal infeksjon, død, dødfødsel og maternell infeksjon. Alle utfallene favoriserte betametason, som var signifikant bedre enn dexametason. Unntaket var maternell infeksjon, der utfallet var omtrent det samme som dexametason. Betametason ga en liten nedgang i dødelighet, mens dexametason ikke gjorde det sammenlignet med kontrollene. Særlig store forskjeller fantes ved IVH, der betametason ga en forholdsvis stor reduksjon i forekomst, mens dexametason ga en mye mindre reduksjon (31).

Baud et al rapporterte i en retrospektiv studie at dexametason var assosiert med en kvalitativ økning av periventrikulær leukomalaci, men betametason ga en reduksjon (3). I andre studier er det ikke vist økning av PVL med dexametason, kun samme forekomst som hos kontrollene (50). Betametason er derimot vist å gi en midlertidig signifikant reduksjon av fosterets hjertefrekvens, pustefrekvens og bevegelse. Dette kan feiltolkes som fosterstress og bidra til unødvendige intervensjoner, og er noe man må være klar over i klinikken.

Spørsmålet om hvorvidt 24 mg er optimal dose har vært forholdsvis lite diskutert. Man vet at kortikosteroider er stoffer med mangeartet virkning, og komplikasjonene øker med dose og behandlingstid. Jobe et al diskuterer muligheten for at det eksisterende doseregimet er for høyt, og at doseringen (2 x 12mg/ 4 x 6mg over 48 timer) ikke er optimal. De stiller også spørsmål om nødvendigheten av at 50 % av betametason gis som det sakte absorberte betametasonacetat. De etterlyser forsøk der det testes ut en enkeltdose av kun 6 mg betametason eller dexametason og sammenligner med dagens standardbehandling. Forsøk på sauer antyder at dette kan være nok til å indukere lungemodning (31).

Alternative administrasjonsmåter har blitt testet. Forsøk med dexametason i oral form ble stanset da det ble oppdaget at neonatal sepsis og IVH ble signifikant forhøyet. Man har ingen forklaring på hvorfor dette skjedde. I dyreforsøk har man prøvd å gi intramuskulære føtale injeksjoner. Dette har gitt mindre effekt på lungemodning, men i motsetning til maternelle injeksjoner har det ikke gitt veksthemming av fosteret. Intraamniotisk betametason førte til økt fosterdød hos sauer (31).

Når det gjelder varigheten av effekten fra steroidene fant Liggins at den positive virkningen kortikosteroidene hadde på lungemodning var maksimal mellom 1 og 7 dager etter dosen. Dessuten avtok effekten betydelig etter 7 dager (35). Disse funnene er bakgrunnen for den utstrakte bruken av repeterte kurer, særlig mellom 1994 og 2000. Man ga da en ny steroiddose en uke etter den første til de kvinnene som fortsatt stod i fare for å føde for tidlig. Denne praksisen var ikke basert på velkontrollerte forsøk i motsetning til enkeltdosen med antenatale steroider, men heller tuftet på en teori om at "mer er bedre" (25). Etter NIHs konsensuskonferanse i 2000, ble det sendt ut en anbefaling som sa at repeterte doser antenatale steroider skulle begrenses til RCT, grunnet mulighetene for alvorlige bivirkninger.

Bakgrunnen for utstrakt bruk av repeterte doser kortikosteroider, særlig mellom 1994 og 2000 er Liggins funn (35) som tilsier at den positive effekten av kortikosteroider på lungemodning er maksimal mellom 1 og 7 dager etter dosen, og at effekten avtar betydelig etter 7 dager. Man ga da en ny steroiddose en uke etter den første i de tilfellene der det fortsatt var truende for tidlig fødsel. Denne praksisen var utbredt, men i motsetning til enkeltdosen med antenatale steroider ikke basert på velkontrollerte forsøk (25).

Steroidenes reduserte effekt etter 7 dager var et allment akseptert faktum, men en studie i 2005 (43) stilte spørsmål om hvor stor denne reduksjonen i effekt egentlig er. Studien var en retrospektiv studie som inkluderte 197 barn, 98 født innen 7 dager etter steroiddosen, og 99 født over 7 dager etter steroiddosen. Resultatet var at blant de barna som ble født innen 7 dager etter steroiddosen var det færre som trengte ventilatorisk assistanse, men det var ikke signifikant forskjell når det gjaldt behov for surfaktantbehandling, bruk av mekanisk ventilasjon, nekrotiserende enterokolitt, IVH, oksygenbehov 28 dager etter fødsel, lengde på sykehusopphold eller død. Dette indikerer at reduksjonen i effekt etter 7 dager, ikke er så markert som man tidligere har antatt (43).

Etter NIHs konsensuskonferanse i 2000 med gjennomgang av evidens for repeterte doser ble i konferanse statement publisert at repeterte doser ikke kan anbefales grunnet bl. a. mulighetene

Konklusjonen på forsøkene så langt antyder at betametason er det beste steroidet, selv om konsensuskonferansen har anbefalt både betametason og dexametason som relativt likeverdige stoffer (31). Optimal dosering og form, acetat eller fosfatform samt eventuelt behovet for repetert dosering er fortsatt uavklart. Her er det behov for randomiserte kontrollerte forsøk.

Glukokortikoiders virkning på lungemodning

Endogent kortisol er dannet fra kolesterol. Kortisol kontrollerer hastigheten av produksjonen av ulike proteiner, ved å binde seg til cytoplasmatiske reseptorer og danne steroid-reseptor-kompleks. Komplekset beveger seg inn i cellekjernen og bindes til DNA, og kan derved regulere proteinproduksjonen (7).

Kortikosteroider har et vidt spekter av farmakologiske effekter, på bl.a. tverrstripet muskulatur, det kardiovaskulære system, nyrer og nervesystemet. De modulerer enzymatiske prosesser og påvirker inflammatorisk respons og immunsystemet. Det hemmer også celledeling i flere vevstyper og bidrar til regulering av elektrolyttbalansen. Steroider har også virkning på karbohydrater, lipider, og proteiner (46).

Dexametason og betametason er de foretrukne kortikosteroidene for behandling av gravide i den antenatale perioden. De krysser lett placenta i biologisk aktiv form, har lite immunosuppressive egenskaper eller mineralkortikoid effekt og har lengre halveringstid enn kortisol. Dosen av kortikosteroid hos fosteret er ca 25-30% av maternell venøs konsentrasjon (31).

Glukokortikoiders evne til å øke surfaktantproduksjonen i lungene er relativt vel dokumentert, Det er også sterke bevis for andre gunstige virkninger, bl.a. stimulering av celledifferensiering og modning, hemming av DNA-syntese, endringer i interstitielt vev, stimulering av antioksidant-enzymmer, påvirkning av inflammasjonsmediatorer samt endring av lungevæskemetabolismen (49).

Fordi glukokortikoidreseptoren (GR) er til stede i hele fosterlungen antar man at steroider har en essensiell regulatorisk rolle i lungemodningen (5). Seint i fosterlivet skjer en naturlig økning av endogen kortisolsekresjon som man antar er nødvendig for anatomisk og funksjonell lungemodning (45). Svært premature barn går glipp av denne naturlige kortisolpåvirkningen,. Man har derfor antatt at det kan være gunstig å gi steroider for å akselerere lungemodningen.

Mekanismen bak kortikosteroiders virkning er ikke helt klarlagt, men nyere kunnskap innen molekylærgenetikk har bidratt til at man nå har gode hypoteser om mekanismene bak steroidenes gunstige effekt på lungemodningen.

Surfaktant

Surfaktant produseres i pneumocyt type II celler, og består av fosfolipider (hovedsaklig fosfatidylkolin) og flere surfaktant-assosierte proteiner (SP), SP-A, SP-B, SP-C og SP-D. Surfaktant er nødvendig for å redusere overflatespenningen i alveolene ved ende-ekspirasjonen.

Surfaktant er til stede i betydelige mengder i lungene fra 23-30 fosteruke. SP-B og SP-C er to hydrofobe proteiner som bedrer spredning av surfaktant-fosfolipidene utover vannfasen, mens SP-B i tillegg regulerer proteinmetabolismen. SP-B-mangel i knockout-mus gir alvorlig og letal RDS, samtidig som det gir en mangel på SP-C.

SP-A-mangel gir derimot økt mottakelighet for lungeinfeksjoner og, man antar at SP-A og SP-D er mindre viktig i prosessering av surfaktant, men heller spiller en immunmodulerende rolle (5).

Glukokortikodreseptorer i den umodne lungen

Glukokortikoider fungerer ved at de bindes til en intracellulær, hovedsakelig cytoplasmatisk reseptor, GR, en 94-polypeptid med et steroidbindende og et DNA-bindende domene, kodet av kromosom 5. Ved splicing dannes en alfa og beta variant, der beta-GR hemmer alfa-GR's aktivitet, og det antas at beta-GR kan motvirke alfa-GR's veksthemmende virkning.

Når kortikosteroider ikke er til stede, bindes GR i kompleks med "heat shock proteiner". Når steroider aktiverer GR, bindes de til C-terminalen av reseptoren, og det aktiverte komplekset transporteres inn i kjernen og bindes til glukokortikoresponsive elementer (GRE) i ulike gener. Dette kan resultere i økt/ redusert gentranskripsjon og proteindannelse (5).

Glukokortikoider og lungeutvikling

Siden Liggins' forsøk på slutten av 60-tallet, har det vært kjent at antenatale steroider har redusert frekvens og dødelighet av RDS. Den viktigste patofysiologiske årsak til RDS er umodne pulmonære strukturer, særlig umodne type II pneumocytter, og derved relativ mangel på surfaktant. (2) Det er derfor gjort særlig mye forskning på steroiders påvirkning av surfaktantproduksjon. Steroider oppregulerer nivå av SP-A, -B, -C og -D proteiner. Den økte fosfolipidsyntesen skyldes at steroidene oppregulerer aktiviteten til det hastighetsregulerende enzymet fosfatidylkolin. Den eksakte mekanismen er ukjent (5).

Antenatale kortikosteroider akselererer også den strukturelle lungemodningen. Det stimulerer modningen av lungeepitel og differensieringen av pneumocytt type II celler (49), trolig ved at steroidene hemmer DNA-syntese og dermed celleproliferasjon, noe som igjen bidrar til økt differensiering. (5) Steroider gir også tynnere interstitielt vev, noe som bidrar til tynnere alveolevegger, som igjen fasiliterer gassutveksling (49).

Oksidativ skade oppstår lett i lungene hos premature med behov for mekanisk ventilering. Studier på lam og rotte har vist at steroidene har også innvirkning på antioksidierende enzymer (bl.a. superoksid dismutase, katalase og glutation) Dette beskytter lungene mot oksidativ skade fra frie radikaler (49).

Steroidene bidrar også til å redusere lungeødem. I lam og kanin er det vist redusert nivå av plasmaprotein akkumulert i alveolene og interstitiet. Dette kan skyldes redusert pulmonær vaskulær motstand mediert via adenylyl cyklase-mediert, eller en regulering av væskereabsorpsjons-systemet via steroidindusert økning i Na⁺ kanaler i lungeepitelet eller steroidinduserte akvaporin-1 kanaler (5).

Glukokortikoider og lungeutvikling hos premature

Hovedsekvele hos de barna som overlever RDS og langvarig mekanisk ventilasjon er kronisk lungesykdom (CLD). CLD klassifiseres som behov for oksygensupplement etter 36 fosteruke (47). De morfologiske forandringene ved CLD er svært heterogene, men i barnas lunger sees både interstitielle -, luftveis- og vaskulær forandringer. Det antas at en viktig faktor for å utvikle CLD, er akutt inflammasjon som respons på for eksempel mekanisk ventilasjon eller oksygenbehandling. Den umodne lungen er utsatt pga primitiv struktur og manglende forsvarsmekanismer. Det er f.eks vist at den inflammatorisk responsen er korrelert direkte med lengde av mekanisk ventilasjon

Når det oppstår inflammasjon, skjer det rask influks av nøytrofile granulocytter etterfulgt av alveolære makrofager som bidrar til økning av pro-inflammatoriske cytokiner og kjemokiner. Det er vist at barn som blir ventilert pga RDS og som senere utvikler CLD, har høyt nivå av pro-inflammatoriske cytokiner, men også muligens lavt nivå av anti-inflammatoriske cytokiner (5). Glukokortikoider er svært effektive i å kontrollere inflammasjon. Dette skjer ved at glukokortikoid-GR-komplekset hemmer AP-1 og NF-kappaB, intracellulære transkripsjonsfaktorer, som begge øker transkripsjonene av pro-inflammatoriske cytokiner (5). Det forklarer til dels hvorfor steroidene motvirker CLD. Man vet imidlertid lite om langtidsvirkningene av glukokortikoider (25).

Ugunstige virkninger av kortikosteroidbehandling hos premature

Korttidsvirkningene av steroidbehandling er hypertensjon, hyperglykemi, GI-blødning, intestinal perforasjon, hemmet vekst og hypertrofisk kardiomyopati. Langtidsvirkningene er fortsatt uklare delvis fordi det finnes få kvalitativt gode langtidsstudier (5). En Cochranestudie av Halliday et al (2003) varsler om mulig abnormal nevrologisk utvikling og anbefaler flere randomiserte kliniske studier med langtidsoppfølging (22).

Negative virkninger av glukokortikoider på lungen er en reduksjon i antall alveoler, samt hemmet lungevekst (49). Dette er vist både hos aper og rotter. Hos rotter er det vist en delvis bedring ved sekundær alveolarisering. Resultatet ble likevel et redusert antall alveoler, som individuelt er større enn normalt, sannsynligvis pga hemmet dannelse av alveolære septa som deler alveolene i mindre enheter (5). Langtidsoppfølging av premature barn som er behandlet med steroider tyder på at lungeutviklingen ikke skades/hemmes av standardbehandlingen med antenatale steroider. Det er mulig at den reduserte "septeringen" kan skyldes selve prematuriteten og mekanisk ventilasjon, og ikke steroidene (5).

Man har spesielt vært opptatt av steroiders virkning på hjernen hos prematurt fødte. Hos dyr ser man også endret oppførsel. Hos gnagere ser man hemmet evne til romlig læring, defekt koordinasjon, endret oppførsel og redusert cerebellar vekt (19). Slike humane studier mangler. Det er vist høyere insidens av nevrologisk dysfunksjon og redusert psykomotorisk utviklingsindex hos 2-åringer (53), men dette er ikke verifisert i andre tilsvarende studier (5).

Fordi så få studier med lang oppfølgingstid er blitt gjort på mennesker, er man fortsatt usikker på mulige langtidsvirkningene av steroider. Man vet heller ikke hva som er optimal dose, optimal type steroid, timing eller varighet av behandling (25, 5).

Enkel kur med antenatale kortikosteroider til kvinner med truende for tidlig fødsel

I 2006 publiserte D Roberts og S Dalziel en metaanalyse (44) der de inkluderte de randomiserte kontrollerte forsøk som sammenlignet kortikosteroider (dexametason, betametason eller hydrokortison) med placebo eller ingen behandling hos gravide med truende for tidlig fødsel. Søket var gjort i "Cochrane Pregnancy and Childbirth Group Trials" Register. Metaanalysen inkluderte 21 studier, med 3885 kvinner og 4269 babyer totalt. (6 av studiene ble publisert etter Crowleys metaanalyse fra 1990). Dette er dermed den mest omfattende oppsummering av tilgjengelig forskning på antenatale steroider til dags dato.

Målet med studien var å undersøke behandlingens effekt på føtal og neonatal morbiditet og mortalitet, samt eventuelle bivirkninger av behandlingen seinere i livet. Man var interessert i om steroider var mer effektive enn placebo eller ingen kortikosteroidbehandling når det gjaldt å redusere forekomst av RDS, neonatal død, IVH, nekrotiserende enterokolitt, kronisk lungesykdom, behovet for surfaktant, kostnaden på den neonatale behandlingen og varigheten på sykehusoppholdet. Studien så også på steroidenes virkning på risiko for dødfødsel, føtal/neonatal infeksjon, maternell infeksjon og langtidsbivirkninger hos de overlevende.

Resultatet av analysen var at steroidbehandling gir en total reduksjon av føtal/neonatal dødelighet, i all hovedsak på grunn av en reduksjon av neonatal død. Steroidbehandling reduserte behovet for oksygenbehandling og surfaktant, forekomst av respiratorisk distress syndrom (både moderat og alvorlig RDS) og behov for og behandlingstid ved mekanisk ventilasjon/CPAP. Behandlingen ga færre innleggelse på nyfødtintensiven. Ingen statistisk signifikant forskjell kunne registreres angående tilfeller av kronisk lungesykdom mellom de steroidbehandlede pasienter versus kontrollgruppen.

Forfatterens konklusjon var at man nå har gode bevis for at en enkel kur med antenatale kortikosteroider er gunstig for å akselerere lungemodning hos fostre med risiko for prematur fødsel, fra 26-34 gestasjonsuker. Dette gjelder også for undergrupper der mor har utviklet preeklampsi eller prematur membranruptur. De konkluderer videre med at det ikke lenger er behov for randomiserte kontroller der man forsker på effekt av en enkel kur steroider versus placebo/ikke steroider, men anbefaler heller at man driver videre forskning på steroiders effekt på graviditeter med flere enn et foster. I tillegg ser Roberts et al. et behov for videre forskning for å finne optimal dose og type kortikosteroid, samt fordeler og ulemper ved gjentatte kurer med steroider og langtidseffekt av behandling.

Repeterte kurer med antenatale kortikosteroider til kvinner med risiko for prematur fødsel

Liggins og Howie fant i 1972 at kortikosteroidenes positive effekt ikke lenger var til stede etter 7 dager, og postulerte dermed at en repetert kur kunne være hensiktsmessig (35). Det er nå satt spørsmålsteget ved dette, men det er fortsatt behov for å kartlegge effekten og ikke minst bivirkninger ved repeterte kurer.

Dyrestudier har antydnet at repeterte kurer med kortikosteroider kan være mer effektivt enn en enkelt kur med tanke på å redusere risiko for respiratorisk distress syndrom (11). Hos sauefostre er det en doseavhengig forbedring av lungefunksjonen ved repeterte doser betametason (30).

Crowther et al publiserte i 2007 en Cochrane review artikkel, der multiple steroidkurer ble sammenlignet med en enkelt kur. 5 studier (Aghajafari 2002, Crowther 2006, Guinn 2002, McEvoy 2002, Wapner 2006), med over 2000 kvinner, gravide i 23. til 33. gestasjonsuke ble inkludert. Resultatet av analysen var at behandling med repeterte doser kortikosteroider var assosiert med en reduksjon av forekomst og alvorlighetsgrad av neonatal lungesykdom og alvorlig spedbarnsmorbiditet. I tillegg hadde disse barna mindre behov for mekanisk ventilasjon, oksygenbehandling og surfaktant. Fordelene kom imidlertid på bekostning av en reduksjon i vekt og hodeomkrets ved fødselen.

French fant i en studie påvirkning av barnets atferd i negativ retning, med økt risiko for aggressivitet og destruktiv oppførsel, samt økt forekomst av hyperkinetiske forstyrrelser (18). Andre studier har ikke vist forskjell mellom steroidbehandlede med multiple doser og mottakere av enkeltdose (17). Det har blitt funnet vekstreduksjon hos de som hadde mottatt repeterte doser, men denne forskjellen var ikke lenger tilstedet ved 3 og 6 års alder (21).

Det er fortsatt ikke publisert longitudinale studier som undersøker nevrologisk utvikling hos barn som har mottatt flere kurer med antenatale steroider. Både Wapner og Crowther har planer om å følge barna i sine studier hhv 24 mnd etter fødsel/ 2 års korrigeret alder samt ved skolealder (11)

Konklusjonen fra Crowthers metaanalyse ble at multiple kurer med steroider virker positivt med henblikk på kortsiktig reduksjon av neonatal lungesykdom i forhold til en enkelt kur. Man vet ikke nok om langtidseffekter, verken positive eller negative, til å kunne sikkert anbefale dette som behandling utenfor kontrollerte studier. Det er behov for flere studier, og diverse slike er i gang (Wapner, Crowther, MACS 2001, Obstetrix 2003, TEAMS 1999) (11).

Steroidbehandlings effekt på modningen av fosterorganer, med fokus på lungeutvikling. En dyreeksperimentell pilotstudie på kylling.

Bakgrunn

Etter konsensuskonferansen i 1994 har det vært standardbehandling å gi alle gravide med truende for tidlig fødsel før 34 fosteruke en enkelt dose med kortikosteroider for å akselerere lungemodningen og hindre RDS (25). Det er fortsatt uavklart hvilke cellulære mekanismer i lungene som ligger til grunn for den kliniske gunstige virkningen.

Hypotese

Steroider påvirker lungemodningen gunstig ved økning av apoptose i mesenchymet mellom de epiteliale lungeelementene i umodne lunger, i tillegg til økt antall og produksjon av surfaktant i pneumocyt type II celler. Virkningene er doseavhengige.

Hensikt

Vi ønsket å sammenligne antall apoptotiske interstielle celler i fosterlunger fra kylling som hadde vært behandlet med dexametason, med kylling behandlet med placebo (NaCl).

Metode

Nylagte, befruktede kyllingegg (Gallus gallus) ble levert fra Samvirkekylling i Våler. Eggene var maksimalt 4-5 dager gamle da de ble undersøkt etter etablerte retningslinjer og lagt til ruging i rugemaskin. Eggene ble gjennomlyst for å verifisere at fostrene levde og beveget seg. Man etablerte en kontrollserie og en steroidserie. I steroidserien injiserte man dexametason i egget ved hjelp av en kanyle, mens eggene i kontrollserien ble injisert med samme volum NaCl. Man etablerte to parallelle serier med egg fra dag 14, 15, 16 og 17, den siste uken før klekking. Et døgn etter injeksjonen ble fostrene avlivet ved anestesering i isvann i 7 min.

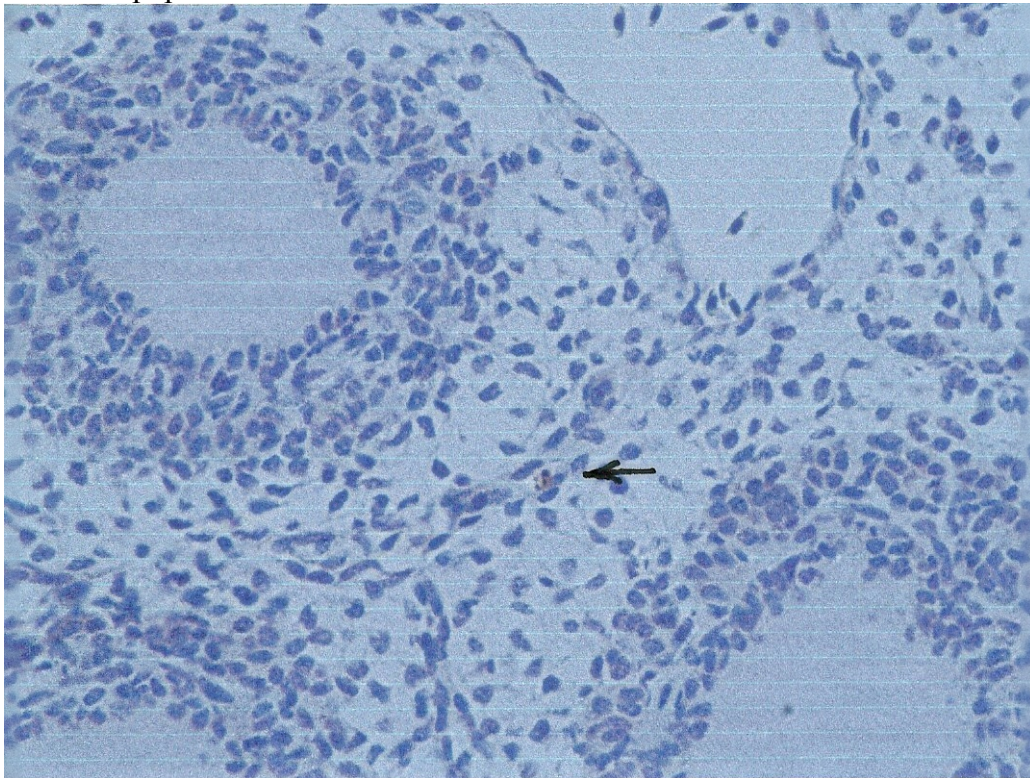
I pilotstudien vurderte vi først hvilken innstøpningsmetode som var best egnet for å få oversikt over utviklingen i lungene. Vi sammenlignet organdisseksjon, helkropp frontalsnitt og helkropp tverrsnitt. Helkropp frontalsnitt ble valgt fordi det ga størst organflate samt best oversikt over organenes plassering i forhold til hverandre. Fremgangsmåten ved høsting, sparing og fremføring av vevsmaterialet fra kyllingembryo var som følger:

Etter avlaving ble det først lagt et snitt langs kyllinghodets sutura sagittalis, et lite kutt mellom de occipitale lappene samt et lite kutt på abdomen, inn i bukhulen, like over navlesnoren. Dette ble gjort for å bedre fikseringen. Kyllingen ble deretter lagt i 4 % bufret formalin i ca 48 timer. Etter ca 48 timer ble hodet klippet av høyt oppe på halsen. Kyllingembryo ble tusjet langs dorsal halscolumna for å lette orientering senere. Halsen ble skilt fra kroppen. Ben, vinger, fjær og hud ble fjernet og den ribbede kyllingtorsoen ble veid. Halsvevet ble innstøpt i lengderetningen, med umerket side ned, kroppen ble innstøpt med forsiden ned. Materialet ble rutinemessig innstøpt i paraffin. Det ble skåret 5µm snitt i serie (seriesnitt) etter at det var etablert hvilken dybde som skulle undersøkes. I tillegg til rutinefarging med Hematoxylin og Eosin ble snitt reagert med apoptosemarkørene TUNEL og caspase 3. For å synliggjøre immunreaksjonene benyttet vi en standard peroxidase teknikk (DAB [3,3'-diaminobenzidin] deteksjonskit) i et automatisert immunfargingssystem (Ventana Medical Systems, Tucson).

Områdene i snittene med umodent lungevev ble undersøkt med 100 x forstørrelse, dvs med 40 x objektivitet. Antall celler med sikker positiv immunreaktivitet i det interstitielle bindevevet i lungene ble telt i 10 vilkårlige synsfelt (HPF) fra hver kyllinglunge. Som intern positiv kontroll ble apoptotiske celler i thymus brukt i alle pilotkasus bortsett fra en (nr 739), der thymus manglet.

Histosnitt farget med caspase 3

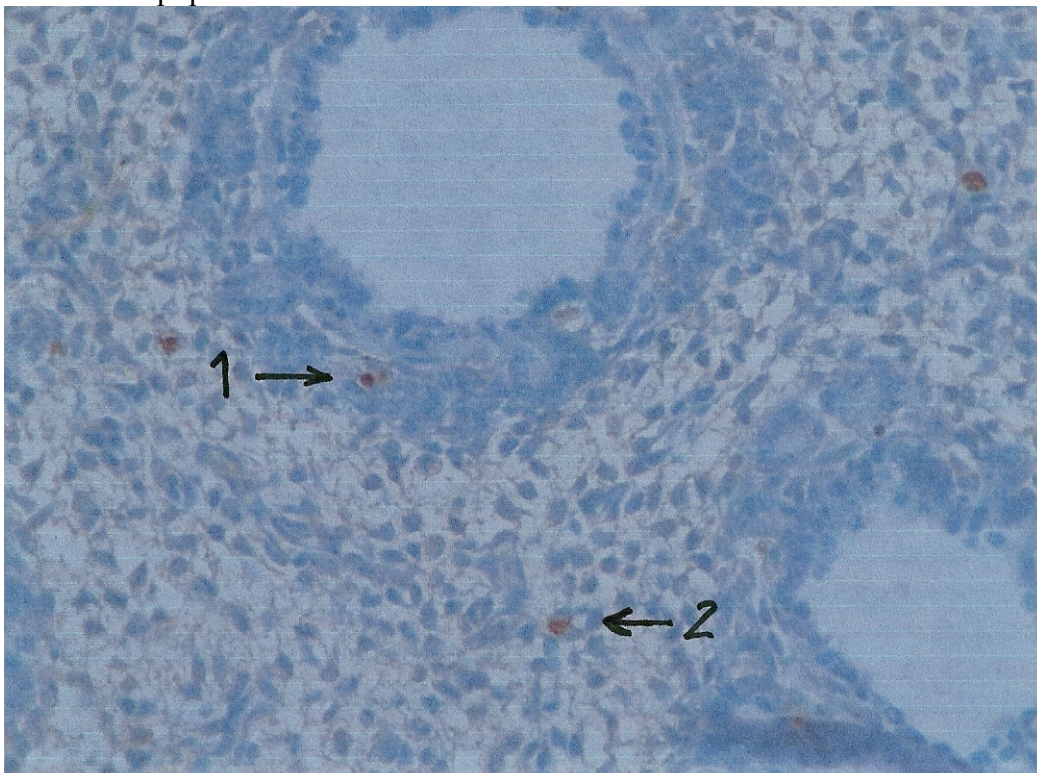
Pil viser apoptotisk celle i interstitiet



Histosnitt farget med TUNEL

Pil 1 viser apoptotisk celle i epitel (ble ikke telt)

Pil 2 viser apoptotisk celle i interstitiet



Resultater

Generelt påviste vi få apoptotiske celler, dvs celler med positiv immunreaktivitet for caspase 3 eller TUNEL. Jevnt over var det flere celler positive for TUNEL enn caspase 3. I noen snitt fant vi clustere av positive celler i enkelte synsfelt. I andre snitt var det få eller ingen positive celler i interstitiet.

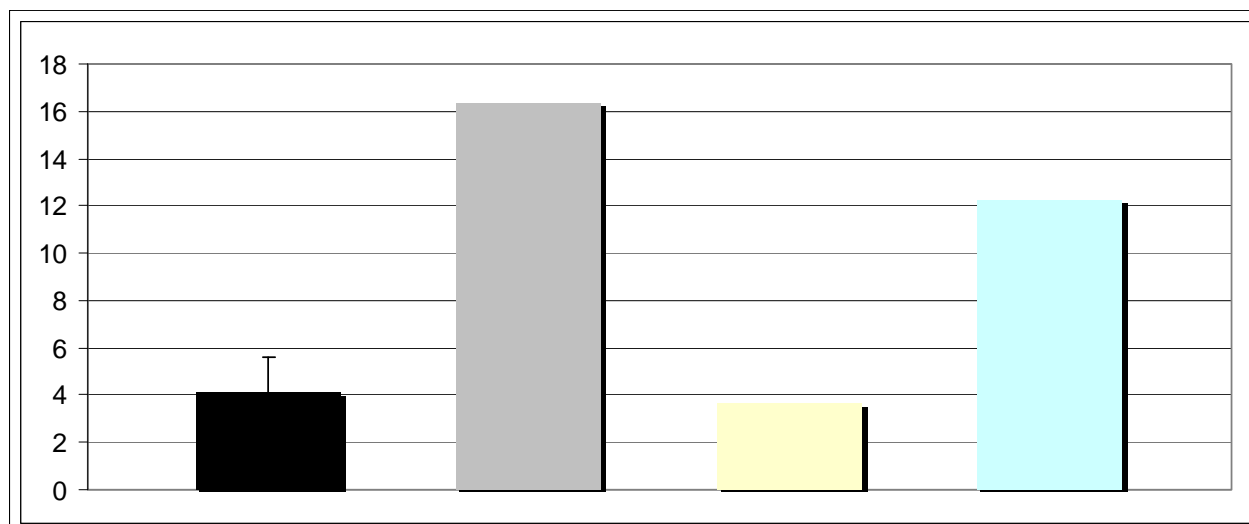
Tabell 1: Totalt antall celler i interstitiet med positiv immunreaktivitet for apoptosemarkører i 10 HPF i samtlige undersøkte kyllingfosterlunger

Snitt nr	Gestasjons- dag	Markør	Antall positive celler
737	14	Caspase-3	1
737	14	TUNEL	2
738	14	Caspase-3	4
738	14	TUNEL	20
739	14	Caspase-3	2
739	14	TUNEL	teknisk feil
740	14	Caspase-3	2
740	14	TUNEL	13
741	15	Caspase-3	1
741	15	TUNEL	19
742	15	Caspase-3	1
742	15	TUNEL	0
743	15	Caspase-3	4
743	15	TUNEL	13
744	15	Caspase-3	4
744	15	TUNEL	13
745	16	Caspase-3	3
745	16	TUNEL	13
746	16	Caspase-3	14
746	16	TUNEL	38
747	16	Caspase-3	7
747	16	TUNEL	9
748	16	Caspase-3	5
748	16	TUNEL	28
749	17	Caspase-3	3
749	17	TUNEL	15
750	17	Caspase-3	6
750	17	TUNEL	24
751	17	Caspase-3	6
751	17	TUNEL	4
752	17	Caspase-3	1
752	17	TUNEL	9

**Tabell 2: Antall apoptotiske celler (caspase 3 og TUNEL),
steroidebehandlet versus kontroller**

Steroide/kontroll Gestasjonsdag	Steroidebeh caspase 3	Steroidebeh TUNEL	Kontroll caspase 3	Kontroll TUNEL
Dag 14	1	2	2	
Dag 14	4	20	2	13
Dag 15	1	19	4	13
Dag 15	1	0	4	13
Dag 16	3	13	7	9
Dag 16	14	38	5	28
Dag 17	3	15	4	1
Dag 17	6	24	1	9
Gj.snittlig apoptoserate	4,125	16,375	3,625	12,2857143

**Figur 1. Gjennomsnittlig apoptoserate for steroidegruppen versus kontrollene
Dexametasongruppen reagert med caspase 3 (svart kolonne) og TUNEL (grå kolonne)
Kontrollgruppen reagert med caspase 3 (gul kolonne) og TUNEL (turkis kolonne)**



Diskusjon

Vi har valgt å bruke kyllingembryoer som modell av flere årsaker: Metoden er enkel og billig uten lovpålagte krav til dyrestall-fasiliteter. Embryoet kan lett manipuleres medikamentelt på ulike utviklingstrinn fordi det ligger inne i et egg. Rugetiden er kort (20-21 dager) med rask organutvikling der den siste uken tilsvarer cirka siste delen av andre og siste trimester hos mennesket.

Ut fra vår hypotese forventet vi å se signifikant flere apoptotiske celler i steroidserien sammenlignet med kontrollene. Vår pilot verifiserte ikke dette. Det var jevnt over flere celler positive for TUNEL enn celler positive for caspase-3. Dette kan skyldes at TUNEL ikke diskriminerer mellom apoptose, nekrose og autolytisk celledød (20). I caspase-3 fargede snitt fant vi hos enkelte kyllinger fokale klustre av positive celler. I andre snitt var det få eller ingen positive celler i interstitiet. Tallene er små, men der er ingen sikker gradient relatert til gestasjonsalder. Forskjellen vi fant mellom steroidegruppen og kontrollene er ikke overbevisende nok til å forklare steroidenes klinisk gunstige effekt. Hypotesen er dermed svekket, og må forkastes som cellebiologisk viktigste grunn.

Vi har derfor vurdert andre mulige steroidevirkninger i tillegg til øket antall pneumocytt type II og øket produksjon av surfaktant. Vår nye hypotese inkluderer neovaskularisering som mulig mekanisme for gunstig steroidvirkning i interstitiet.

Dette vil bli testet i en ny pilotundersøkelse.

Referanser

1. Auerbach R. Vascular endothelial cell differentiation: organ-specificity and selective affinities as the basis for developing anti-cancer strategies. *Int. J. Radiat. Biol.* 1991, 60; 1-10
2. Ballard PL, Hormonal regulation of pulmonary surfactant. *Endocr rev* 1989;10;165-181
3. Baud O. Antenatal glucocorticoid treatment and cystic periventricular leukomalacia in very premature infants. *N Engl J med.* 1999; 341;1190-1196
4. Benestad HB, Blichfeldt E. Kompendium i Cellecyklus, Vekst og Differensiering. www.med.uio.no/imb/fysiologi 1997;14-15
5. Bolt RJ, Van Weissenbruch MM, Lafeber HN, Delemarre-Van de Waal HA. Glucocorticoids and Lung Development in the Fetus and Preterm Infant. *Pediatric Pulmonology* 2001;32;76-91
6. Brinchmann, BS. Foreldres erfaringer med liv-død-beslutninger hos premature barn *Tidsskr Nor Lægeforen* 2002; 122
7. Champe PC, Harvey RA, Lippincotts illustrated reviews Biochemistry 2nd edition. Lippincott Williams & Wilkins 1994;222-226
8. Cleaver O, Melton DA. Endothelial signaling during development. *Nature medicine* 2003; 9 (6); 661-668
9. Crowley P, Chalmers I, Keirse MJNC. The effects of corticosteroid administration before preterm delivery: An overview of the evidence from controlled trials. *Br J Obstet Gynaecol* 1990; 97; 11-25.
10. Crowley, PA. Antenatal corticosteroid therapy: a meta analysis of the randomized trials 1972-1994. *Am J Obstet Gynecol*, 1995; 173(1);322-334
11. Crowther CA, Harding JE. Repeat doses of prenatal corticosteroids for women at risk of preterm birth for preventing neonatal respiratory disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2007, Issue 3. Art. No.: CD003935. DOI: 10.1002/14651858.CD003935.pub2.
12. Crowther CA, Harding JE. Repeat doses of prenatal corticosteroids for women at risk of preterm birth for preventing neonatal respiratory disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2000, Issue 2. Art. No.: CD003935. DOI: 10.1002/14651858.CD003935.
13. Di Gioacchino M et al. Autophagy as an ultrastructural marker of heavy metal toxicity in human cord blood hematopoietic stem cells. *Sci Total Environ.* 2007 Dec 29
14. Dudley DJ, Waters TP, Nathanielsz PW. Current Status of Single-Course Antenatal Steroid Therapy. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 2003;46:1;132-149
15. Dunn PM. Stéphane Tarnier (1828–1897), the architect of perinatology in France. *Archives of Disease in Childhood Fetal and Neonatal Edition* 2002;86:F137-F139
16. French NP, Hagan R, Evans SF, Mullan A, Newnham JP. Repeated antenatal corticosteroids: Effects on cerebral palsy and childhood behavior. *Am J of Obstetrics and Gynecology* 2004;190;588-95
17. French NP, Hagan R, Evans SF, Godfrey M, Newnham JP. Repeated antenatal corticosteroids: Size at birth and subsequent development. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:1;114-21
18. French NP, Hagan R, Evans S, Godfrey M, Newnham J. Repeated antenatal corticosteroids: behaviour outcomes in a regional population of very preterm infants. *Pediatric Research* 1998;43;214A

19. Gramsbergen A, Mulder EJ. The influence of betamethasone and dexamethasone on motor development in young rats. *Pediatr Res* 1998;44;105-110
20. Grasl-Kraupp B. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate amongst apoptosis, necrosis and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology*, May 1995; 1465-1468.
21. Guinn DA. Repeat courses of antenatal corticosteroids: The controversy continues. *Am J of Obstetrics and Gynecology* 2004;190;585-7
22. Halliday HL. Use of steroids in the perinatal period. *Paediatric Respiratory Reviews* 2004; 5(Suppl A);S321-S327
23. Henriksen C. Ernæring av premature barn. *Tidsskr Nor Lægeforen* nr 10, 2004:124; 1392-1395
24. <http://consensus.nih.gov/1994/1994AntenatalSteroidPerinatal095html.htm>, NIH consensus statement fra 1994
25. <http://consensus.nih.gov/2000/2000AntenatalCorticosteroidsRevised112PDF.pdf> NIH consensus statement fra 2000
26. <http://www.lovdato.no/all/nl-19990702-064.html>, Helsepersonelloven
27. <http://neonatology.org/tour/timeline.html> Neonatologi gjennom historien
28. http://www.fn.no/fn_avtaler/barnerettigheter/fns_konvensjon_om_barnets_rettigheter FN's konvensjon om barnerettigheter. FN's generalforsamlings resolusjon 44/25, 20. november 1989.
29. <http://www.rndsystems.com>, TUNEL og caspase 3 farging.
30. Ikegami M, Jobe AH, Newnham, J, Polk, DH, Willet, KE, Sly P. Repetitive prenatal glucocorticoids improve lung function and decrease growth in preterm lambs. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1997;156; 178-84.
31. Jobe AH, Soll RF. Choice and dose of corticosteroid for antenatal treatments. *Am J of Obstetrics and Gynecology* 2004;190;878-81
32. Kierszenbaum AL. *Histology and Cell biology –An Introduction to Pathology*. Mosby 2002; 89-91
33. Kumar V. *Robbins and Cotran Pathologic basis of disease*. 7th edition. Elsevier Saunders 2005; 5.
34. Lawson ND. Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development* 2001, 128; 3675-3683.
35. Liggins GC, Howie RN. A Controlled Trial of Antepartum Glucocorticoid Treatment for Prevention of the Respiratory Distress Syndrome in Premature Infants. *Pediatrics* 1972; 50:4;515-525
36. Liggins GC. Premature Delivery of Foetal Lambs Infused with Glucocorticoids. *J Endocrinol* 1969 Dec; 45:4;515-525
37. Lindemann R. Når døden er bedre enn livet. *Tidsskr Nor Lægeforen* nr. 21,2002;122
38. Lindemann R. dr.med og spesialist i barnesykdommer. Nyfødtintensivavdelingen, Ullevål universitetssykehus. Personlige meddelelser i intervju 22.01.07.
39. Markestad T. Early Death, Morbidity, and Need of Treatment Among Extremely Premature Infants. *Pediatrics* Vol. 115 No. 5 May 2005; 1289-1298
40. Martin RJ, Fanaroff AA, Walsh MC. *Fanaroff's and Martin's Neonatal-perinatal medicine, diseases og the fetus and infant* vol 1. Mosby 8th edition, 2006; 9-12; 498-500; 597-603
41. Moore KL. *The Developing Human clinically oriented embryology* 4th edition. Saunders 1988;207-216
42. Norsk forskningsråd, Rapport Nr.13. Komitéen for konsensuskonferanseprogrammet "Grensar for behandling av for tidlig fødte barn". 1998

43. Peaceman AM, Bajal K, Kumar P, Grobman W. The interval between a single course of antenatal steroids and delivery and its association with neonatal outcomes. *Am J of Obstetrics and Gynecology* 2005;193;1165-9
44. Roberts D, S Dalziel. Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2006, Issue 3. Art. No.: CD004454. DOI: 10.1002/14651858.CD004454.pub2.
45. Sadler TW. *Langman's Medical Embryology* 9th edition. Lippincott Williams & Wilkins 2004;275-283
46. Sand O. *Menneskets fysiologi*. Gyldendal Norsk Forlag AS 2001; 227-228
47. Shennan AT, Abnormal Pulmonary Outcomes in Premature Infants: Prediction From Oxygen Requirement in the Neonatal Period. *Pediatrics* 1988;82;527-532
48. Shinwell ES. Current Dilemmas in Postnatal Steroid Therapy for Chronic Lung Disease in Preterm Infants. *Biology of the Neonate* 2003;84;96-100
49. Vyas J, Kotecha S. Effects of antenatal and postnatal corticosteroids on the preterm lung. *Archives of Disease in Childhood* 1997;77;F147-F150
50. Wapner R. Antenatal corticosteroids: We continue to learn. *Am J of Obstetrics and Gynecology* 2004;190;875
51. Wapner R, Waters T. Introduction and Historical Perspective. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 2003;46:1;125-131
52. Walfisch A, Hallak M, Mazor M. Multiple Courses of Antenatal Steroids: Risks and Benefits. *Gynecol* 2001;98 ;491-7
53. Yeh TF. Early dexamethasone therapy in preterm infants: a follow-up study. *Pediatrics* 1998;101;7