

**Mechanismen der Cyclooxygenase-2 gesteuerten Vasoregulation
in isoliert perfundierten und artifiziell ventilierten Rattenlungen.**

Ein enzymatischer Weg in der Steuerung der Entzündungsreaktion des
Akuten Respiratorischen Distress Syndroms.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Humanmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

André Althoff

aus Lünen

Gießen 2007

Aus dem Medizinischen Zentrum für Pathologie

Leiter: Prof. Dr. Andreas Schulz

des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH

Gutachter: PD Dr. Leander Ermert

Gutachter: Prof. Dr. Ewald Beck

Tag der Disputation: 01.07.2008

INHALTSVERZEICHNIS

	SEITE
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
1. EINLEITUNG	6
1.1 VORWORT	6
1.2 PULMONALES GEFÄßSYSTEM	6
1.3 EICOSANOIDE	8
1.4 CYCLOOXYGENASE	10
1.5 ENDOTOXINE	12
1.6 PRIMING	12
1.7 ARDS	13
1.8 ZIELSETZUNG	16
2. MATERIAL	18
2.1 EXPERIMENTELLE AGENTIEN UND PHARMAKA	18
2.2 GERÄTE UND HILFSMITTEL	19
2.3 VERSUCHSTIERE	20
2.4 ANALYTIKA	20
3. METHODIK	21
3.1 MODELL DER ISOLIERTEN RATTENLUNGE	21
3.1.1 Einführung	21
3.1.2 Aufbau des Arbeitsplatzes	22
3.1.3 Präparation der isolierten Lunge	24
3.1.4 Integration des Organs in das Meßsystem	25

3.1.5 Versuchsprotokoll	29
3.1.6 Messwertparameter	32
3.2 REINIGUNG DES PERFUSIONS- UND BEATMUNGSSYSTEM	34
3.3 PERFUSATANALYSE	34
3.4 STATISTISCHE ANALYSE	34
4. ERGEBNISSE	36
4.1 KONTROLLVERSUCHE	36
4.2 INHIBITION DER COX-2 MIT NS-398, DUP697 UND SC-236	36
4.3 VERSUCHE MIT ANGIOTENSIN II UND U46619	43
4.4 VERSUCHE NACH PRIMING MIT LPS	48
4.5 BESTIMMUNG DER EICOSANOIDE TxB_2 UND 6-KETO $\text{PGF}_{1\text{ALPHA}}$	52
5. DISKUSSION	56
5.1 CYCLOOXYGENASE-2	56
5.2 MODELL DER ISOLIERTEN LUNGE	57
5.3 PATHOPHYSIOLOGISCHE BEOBACHTUNGEN	57
5.3.1 Vasoregulation	57
5.3.2 Permeabilitätsveränderungen	58
5.4 PROSTACYCLIN (PGI_2) UND THROMBOXAN A_2 (TxA_2)	59
5.5 SELEKTIVE INHIBITION DER COX-2	60
5.6 VORVERSUCHE MIT LIPOPOLYSACCHARID	61
5.7 IMMUNLOKALISATION DER COX-2	62
5.8 KLINISCHE ANWENDUNG DER COX-2-HEMMER	62
5.9 FAZIT	64
6. ZUSAMMENFASSUNG	65

7. CONCLUSION	67
8. LITERATURVERZEICHNIS	69
9. ANHANG	83
9.1 SUBSTANZEN	83
10. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	84
10.1 ORIGINALARBEITEN	84
10.2 ABSTRACTS UND POSTER	85
11. ERKLÄRUNG	86
12. LEBENS LAUF	87
13. DANKSAGUNG	89

Abkürzungsverzeichnis

6-keto PGF _{1alpha}	6-keto Prostaglandin 1 alpha
AA	Arachidonic Acid
ALI	Acute Lung Injury
Appl.	Applikation
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
ASA	Acetylsalicylsäure
AT II	Angiotensin II
Cox	Cyclooxygenase
Cox-1	Cyclooxygenase-1
Cox-2	Cyclooxygenase-2
Cox-3	Cyclooxygenase-3
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DUP697	5-bromo-2-(4-fluorophenyl)-3-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-thiopen
i.p.	intraperitoneal
IRDS	Infant Respiratory Distress Syndrome
LPS	Lipopolysaccharid
LVP	Left ventricular pressure
NS-398	N-(2-cyclohexyloxy-4-nitrophenyl)methansulfonamid
PAF	Platelet Activating Factor
PAP	Pulmonary Artery Pressure
PFA	Paraformaldehyd
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGI ₂	Prostacyclin

PMN	Polymorphkernige Neutrophile
SC-236	[4-[5-(4-chlorophenyl)-3-(trifluoromethyl)-1-pyrazol-1- 1]benzenesulfonamid
TxA ₂	Thromboxan A ₂
TxB ₂	Thromboxan B ₂
U46619	9,11-Dideoxy-11 α ,9 α -epoxymethanoprostaglandin F _{2a}
VP	Ventilation Pressure

1. Einleitung

1.1 Vorwort

Die hier vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Dezember 1995 bis Juli 1998 in dem Labor der klinischen Forschergruppe (Klifo) „Respiratorische Insuffizienz“ an der Medizinischen Klinik und Poliklinik II in Gießen. Betreut wurde die Arbeit durch Herrn PD Dr. Leander Ermert im Laborbereich von Prof. Dr. Werner Seeger. Untersucht wurde der Einfluß der Cyclooxygenase-2 auf die Vasoregulation und Physiologie in isoliert-perfundierten Rattenlungen.

1.2 Pulmonales Gefäßsystem

Die Gefäße in der Lunge folgen einer dualen Versorgung. Diese besteht aus der Arteria pulmonalis, bei der es sich um ein Niederdrucksystem handelt, welches desoxygeniertes Körperblut führt. Zusätzlich gibt es mit den Rami bronchiales als Seitenästen der Aorta thoracica die so genannten Vasa privata, die oxygeniertes Blut des systemischen Kreislaufes zur Nutrition der Lunge führen. Im Verlauf folgen diese Rami bronchiales den Bronchien. In Hinsicht auf die vorliegende Arbeit haben sie allerdings keinerlei Bewandtnis und werden daher auch nicht weiter betrachtet werden.

Der eigentliche Lungenkreislauf, bestehend aus Arteria und Vena pulmonalis und deren Unterästen, hat jedoch im Gegensatz zum systemischen Kreislauf einige Unterschiede und soll daher an dieser Stelle etwas näher beschrieben werden. Die Arterien verlaufen entlang des Bronchialsystems, teilen sich entsprechend auf und bilden am Ende ein dichtes Kapillargeflecht, welches die Alveolen umgibt. Der Abfluß des oxygeniertes Blut führenden venösen Systems erfolgt über die Venae Pulmonales, die zumeist in den interlobulären Septen verlaufen. Aufgrund der relativ niedrigen Druckverhältnisse im pulmonalen Kreislauf unterscheiden sich dessen Gefäßwände deutlich von dem Hochdrucksystem des

Körperkreislaufes. Die Arterien sind von der Pulmonalklappe bis auf die Ebene der Segmentbronchien elastische zweischichtige Arterien, bestehend aus einer einlagigen Endothelzellschicht, der Intima und einer Media, bestehend aus elastischen Fasern mit glatten Muskelzellen und Kollagen. Die elastischen Lagen bestehen aus längsverlaufenden Fasern, welche der Dehnung der Lunge während des Respirationszyklus entgegenwirken. Im Gegensatz hierzu sind die elastischen Fasern im systemischen Kreislauf zirkulär angeordnet. Ab der Höhe der Bronchioli verlieren die Arterien die elastischen Anteile und werden zu Gefäßen des muskulären Typs. Hier sind die muskulären Zellen nun zirkulär angeordnet. Nach distal nimmt die Muskularisierung der Gefäße ab und wird ab den Arteriolen dann diskontinuierlich. Die Kapillaren verlaufen innerhalb der Alveolarsepten und besitzen somit Kontakt zu jeweils zwei Alveolen.

Die oxygeniertes Blut führenden Venolen besitzen eine dünne Intima, der ein schmale Zone kollagener und elastischer Fasern aufliegt. Bei zunehmendem Zusammenfluß erhalten dann auch diese Gefäße zunehmend Muskelzellen in der Media. In größeren Venen sind die elastischen Fasern, das Kollagen und die Muskelzellen unregelmäßig gemischt.

Im physiologischen Zustand funktioniert die Steuerung des Gefäßsystems zum Großteil über einen Reflexmechanismus, den sogenannten Euler-Liljestrand-Mechanismus oder auch hypoxische pulmonale Vasokonstriktion genannt (102). Wenn es in einem Bereich der Lunge zum Beispiel aufgrund von Hypoventilation zur Hypoxie kommt, bewirkt dieser eine reflektorische Vasokonstriktion der zum hypoventilierten Bereich gehörenden Gefäße. Somit wird sichergestellt, dass das Shuntvolumen, welches in der Lunge nicht ausreichend oxygeniert wird, möglichst klein bleibt. Vermittelt wird dieser Reflex über sauerstoff-sensitive Kalium-Kanäle der Myozyten, die bei fallendem Sauerstoffpartialdruck die Depolarisation und Kontraktion der Gefäßmuskelzelle bewirken.

In der entzündlichen Situation bis hin zur Maximalvariante des Akuten Respiratorischen Distress Syndroms (ARDS) kommen endogen liberierte Mediatoren hinzu, die zum einen Einfluß auf den pulmonal-arteriellen Druck als auch auf die Permeabilität des Endothels nehmen. Eine Vielzahl der Mediatoren wird zu den Eicosanoiden gerechnet. Mit einigen von ihnen und den Schlüsselenzymen ihrer Synthese beschäftigt sich die vorliegende Arbeit.

In der Frühphase einer pulmonalen Entzündungssituation kommt es zu einer irregulären Verteilung von pulmonaler Vasokonstriktion und Vasodilatation (100) und somit Aufhebung des Euler-Liljestrand-Mechanismus. Das Resultat hieraus ist ein erheblicher pulmonaler Shuntfluß. Es konnte ferner in vorhergehenden Studien gezeigt werden, dass

mediatorvermittelte Anstiege des pulmonal-arteriellen Drucks einer Erhöhung des postkapillären Widerstandes zuzurechnen sind, da die pulmonalen Venen offensichtlich empfindlicher gegenüber Thromboxanen und Endoperoxidasen sind als pulmonale Arterien. Über den erhöhten Kapillardruck kommt es in dieser Situation zur Ödembildung (77). Darüber hinaus kommt es zu einer zusätzlichen Ödembildung über die Störung der mikrovaskulären Permeabilität. Neben einer Schädigung der Endothelzellen finden sich in der entzündlichen Lunge sogar komplette Endothelablösungen im Stromgebiet (12).

1.3 Eicosanoide

An der humoralen Antwort beim ARDS sind zu einem wesentlichen Teil die Eicosanoide involviert. Bei den Eicosanoiden handelt es sich um Immunmodulatoren, die an entzündlichen Prozessen im Körper beteiligt sind. Sie werden von einer Vielzahl von Zellen aus Dihomogammalinolensäure, Arachidonsäure und Eicosapentensäure gebildet und haben als Gemeinsamkeit, dass sie 20 Kohlenstoffatome aufweisen. Man unterscheidet Prostaglandine, Prostacyclin, Thromboxane und Leucotriene, wobei die ersten drei als Prostanoiden aufgrund ihrer ähnlichen Struktur zusammengefasst werden.

Die Prostaglandine sind mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit 20 Kohlenstoffatomen und einem Ring aus fünf C-Atomen. Als wichtigste Quelle dient die Arachidonsäure, welche mit Hilfe der Phospholipase 2 aus Phospholipiden freigesetzt wird. Die Hauptklassen werden mit PGA bis PGI bezeichnet, ein zusätzlicher Index beziffert die Anzahl der C-C-Doppelbindungen außerhalb des Kohlenstoffrings. Prostaglandine mit zwei Doppelbindungen entstehen aus der Arachidonsäure wie zum Beispiel PGE_2 .

Bei den Thromboxanen handelt es sich um ähnliche Verbindungen mit einem sechsgliedrigen Ethernring.

Die Arachidonsäure kann aber auch durch Lipoxxygenase in Leukotriene überführt werden. Man entdeckte sie zuerst in Leukozyten und ihr Name bezieht sich auf drei konjugierte Doppelbindungen im Molekül (52).

Bei den Eicosanoiden handelt es sich um parakrine Hormone. Diese werden in unmittelbarer Nähe ihres Wirkortes und der Zielzellen gebildet, im Gegensatz zu den autokrinen Hormonen, welche auf die eigene Erzeugerzelle wirken. Die Bildung in Nähe zur Effektorzelle erfolgt

aufgrund der ausgesprochenen Kurzlebigkeit der Eicosanoide. Sie haben wichtige Aufgaben bei der Auslösung von Entzündungen, der Regulation der Blutzirkulation in gewissen Organen und der Kontrolle des Ionentransports durch Membranen. Sie verursachen Bronchokonstriktion ($\text{PGF}_{2\alpha}$) (49), pulmonale Vasokonstriktion (TxA_2) und sind an der Regulation der Permeabilität (Schrankenfunktion) der Lunge beteiligt (63, 76). Andere Metabolite führen zu entgegengesetzten Reaktionen wie Bronchodilatation (PGE_2) und Vasodilatation (PGI_2) und haben Einfluß auf das Immunsystem sowie proliferative Prozesse (58, 77, 78, 84).

Das Gefäßgebiet der Lunge reagiert außerordentlich sensitiv auf freie Arachidonsäure, die exogen zugeführt oder durch Stimulation phospholipolytischer Abbaewege aus Membranphospholipiden freigesetzt werden kann. Schon nanomolare Konzentrationen freier, nicht veresterter Arachidonsäure können eine prä- und postkapilläre Vasokonstriktion auslösen, die hauptsächlich durch den Mediator Thromboxan A_2 (TxA_2) vermittelt wird (61, 76).

Die Vasokonstriktion durch TxA_2 übertrifft die vasodilatative Wirkung des gleichzeitig nach Erhöhung der freien Arachidonsäure gebildeten Prostaglandins (PGI_2) (59). Zusätzlich kann durch die postkapilläre Vasokonstriktion, hervorgerufen durch Metabolite des Lipoxygenase-stoffwechselweges der Arachidonsäure, der kapilläre Filtrationsdruck erhöht und die pulmonale Ödembildung gesteigert werden (77, 78, 58, 88).

In der Abwehr respektive Eliminierung von Mikroorganismen und Produktion von Eicosanoiden spielen die neutrophilen Granulozyten im menschlichen Körper eine wesentliche Rolle. Sie stellen mehr als 90 Prozent der zirkulierenden Granulozyten und sind eine der ersten Zellarten am Entzündungsort. Sie sind in der Lage über Adhäsionsmoleküle an der Endothelzelle anzudocken und schnell durch die Gefäßwand zu treten. Im Gewebe haben diese dann die Fähigkeit entlang chemotaktischer Konzentrationsgradienten zum Entzündungsort vorzustoßen. Hier erfolgt die Abwehr durch Phagozytose, Degranulation und Bildung von die Entzündung fördernden Botenstoffen wie Prostaglandinen und Leukotrienen.

Das Prostacyclin (PGI_2) wird in Endothelzellen mit Hilfe der Cyclooxygenase (Prostaglandin G/H Synthase) aus dem Prostaglandin PGH_2 gebildet. Es hat neben der Funktion als Vasodilatator noch die Wirkung in der Hemmung der Thrombozytenaggregation und der Adhäsion von Granulozyten an das Endothel. Somit ist es ein funktioneller Gegenspieler des Prostanoids TxA_2 (14). Aus Arachidonsäure wird dieses unter anderem in Thrombozyten gebildet und bewirkt neben einer starken Vasokonstriktion eine Thrombozytenaggregation.

1.4 Cyclooxygenase

Die Cyclooxygenase (Cox) ist das Schlüsselenzym in der Prostaglandinsynthese und hat somit eine herausragende Funktion in der Entzündungssituation, aber auch bei der Thrombozytenaggregation und der Vasomotion. Es handelt sich bei der Cox um ein intrazelluläres Enzym. Wie gezeigt werden konnte, kommt dieses ubiquitär in nahezu allen Zellen vor. Ihre Funktion und die nachgeschalteter Enzyme führen zur Umwandlung der Arachidonsäure in die Prostaglandine G_2 und H_2 , die weiter umgebaut werden zu Thromboxanen, Prostaglandinen sowie Prostacyclin. Die Cyclooxygenase katalysiert eine Bis-Dioxygenierung der Arachidonsäure über PGG_2 zu dem Endoperoxid PGH_2 . Das Prostaglandin PGH_2 hat eine zentrale Stellung in der Prostaglandinsynthese, da es als gemeinsame Vorstufe verschiedener Isomerasen, Reduktasen und Synthetasen dient. Deren Verteilung ist spezifisch für eine Zellart, können jedoch in dieser Zelle je nach Aktivierungszustand im unterschiedlichen Ausmaß exprimiert sein (52).

Da diese Prostaglandine eine zentrale Rolle in der Entzündung einnehmen, hat auch die Hemmung der Cox eine zentrale Bedeutung in der Entzündungstherapie (2, 32, 43, 53, 65).

Es waren bisher zwei Isoenzyme der Cyclooxygenase (Cox, Prostaglandin G/H Synthase) bekannt. Sie sind beide konstitutiv vorhanden (69, 93). Die Cox-1 ist mit Focus in den Geweben des Gastrointestinaltraktes vorhanden (29). Die Cox-2 kann zusätzlich als Antwort auf einen inflammatorischen Stimulus deutlich verstärkt exprimiert werden (4, 6, 30, 67, 80). In letzter Zeit ist noch ein weiteres Isoenzym, die Cyclooxygenase-3 entdeckt worden. Cox-3 mRNA konnte dabei in einer Vielzahl von Geweben bei Kaninchen und im Menschen isoliert werden (9, 45). Seine genauere Rolle bleibt noch weiter zu erforschen.

Der Cyclooxygenase-2, ihren enzymatischen Produkten und der selektiven Inhibition des Syntheseweges widmet sich die vorliegende Arbeit. Die hierzu durchgeführten Untersuchungen, deren Ergebnisse und Relevanz sollen im Verlauf dargestellt und diskutiert werden.

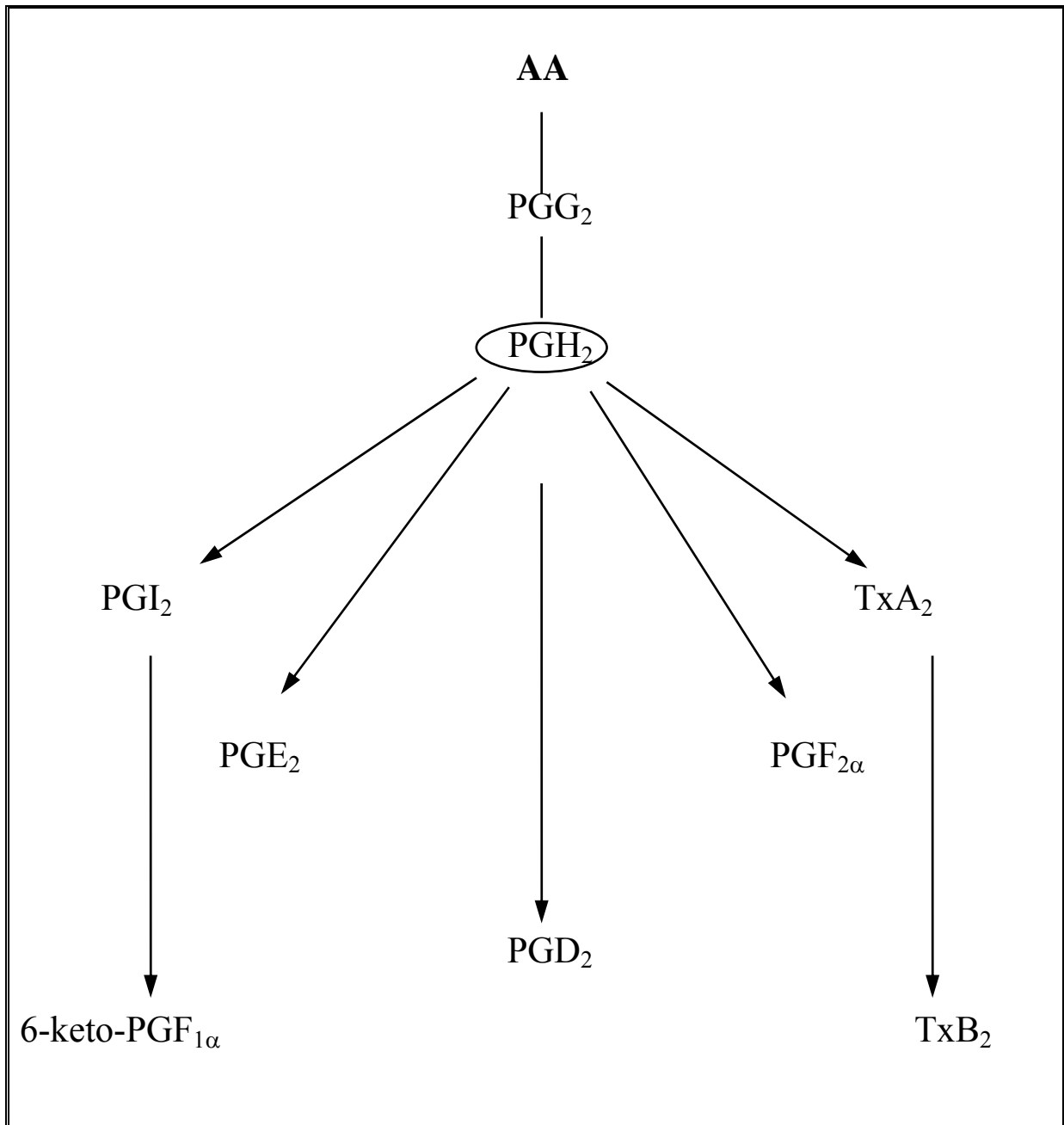


Abbildung 1: Schematische Übersicht des Cyclooxygenaseweges der Arachidonsäure: Dargestellt sind Entstehung des zentralen Produkts PGH₂ und die wichtigsten Metabolite. Die einzelnen Schritte werden enzymatisch katalysiert, die Bildung von 6-keto-PGF_{1α} aus PGI₂ und von TxB₂ aus TxA₂ erfolgen spontan.

1.5 Endotoxine

Bei den Endotoxinen handelt es sich um bakterielle Zerfallsprodukte, wie sie bei einem Entzündungsgeschehen, zum Beispiel auch dem ARDS entstehen und eine Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Reaktionen verursachen. Sie sind Bestandteil der äußeren Zellwand gramnegativer Bakterien und biochemisch gesehen Lipopolysaccharide (LPS) mit einem hydrophilen Polysaccharid- und einem lipophilen Lipidanteil. Im Gegensatz zu den Bakterien sind Endotoxine thermostabil, so dass sie auch Sterilisationsprozesse überdauern können. LPS besteht aus miteinander verbundenen drei Teilregionen. Lipid A bildet den aus Sicht des Bakteriums inneren Teil, mit dem LPS in der äußeren Membran verbunden ist. Die Kernregion wird in eine innere und äußere Region unterteilt und bildet das Bindeglied zum Polysaccharid. Dieses ist die dritte und damit äußere Region. Da dieser Bereich zwischen den Bakterienarten starke Varianz aufweist, wird dieser häufig zur Artdiagnostik der Bakterien herangezogen (52).

Die Funktion als Endotoxin hat das Lipid A, welches für die pathophysiologischen Effekte mit Aktivierung des Immunsystems verantwortlich ist. Membrangebunden haben Lipopolysaccharide keine toxische Wirkung. Erst bei ihrer Freisetzung im Rahmen eines bakteriellen Zerfalls können sie diese entfalten (87).

Die Endotoxine stimulieren Makrophagen zur Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine. Eine besondere Rolle spielen dabei vor allem die Zytokine TNF- α , IL-1, IL-6 und der thrombozytenaktivierende Faktor (PAF), aber auch die Prostaglandine und Leukotriene. Diese wiederum perpetuieren die Entzündungsreaktion und initiieren hohes Fieber, können aber auch bei übermäßiger Produktion für den sich entwickelnden septischen Schock verantwortlich sein (91, 94).

1.6 Priming

An vielen Effekten, die von Lipopolysacchariden auf den Organismus vermittelt werden, sind das Plasmaprotein LBP sowie der Membranrezeptor CD14 wesentlich beteiligt. Das CD14, welches sich an den Membranen von Monozyten, Makrophagen sowie

Granulozyten befindet, hat eine Erkennungsstruktur für den Komplex aus LPS und LBP. Immunhistochemische Untersuchungen der Rattenlunge haben ergeben, dass Bronchialepithelzellen, Alveolar-Makrophagen, perivaskuläre Leukozyten, einzelne Zellen in den Alveolarsepten sowie glatte Muskelzellen kleinerer Gefäße CD14-Rezeptoren exprimieren. Im Gegensatz dazu fand sich in Epithelzellen der kleinen Bronchiolen, glatten Muskelzellen der Bronchien, Endothelzellen und glatten Muskelzellen der Arterien keine Expression von CD14-Rezeptoren (25).

Mit diesen Effekten beschäftigen sich einige Vorversuche, die in dieser Studie diskutiert werden sollen. Eine Versuchsreihe mit validen Ergebnissen bleibt aber noch abzuwarten. Im Rahmen der Vorversuche erzeugte die Gabe von LPS in das Perfusat von isolierten Lungen für 2 Stunden keine Änderung der physiologisch messbaren Parameter (pulmonaler arterieller Druck, Ventilationsdruck, Gewicht). Durch Gabe eines zweiten Stimulus, wie bakterielle Exotoxine, Platelet-activating-factor (PAF) oder Arachidonsäure (AA), kommt es eindrucksvoll zu einer vielfach erhöhten Reaktion der Lunge mit erhöhter Vasokonstriktion und konsekutivem Anstieg des PAP sowie Perfusions-Ventilationsverteilungsstörungen (87, 98). Diese Vorstimulierung der Lunge durch LPS mit nachfolgend erhöhter Reaktivität auf einen zweiten Stimulus wird als „Priming“ bezeichnet. Dieser Reaktivität liegt eine erhöhte Expression verschiedener Enzymsysteme wie Cyclooxygenasen oder NO-Synthetasen zugrunde (27).

Diese kann nicht nur direkt über das LPS vermittelt sein, vielmehr könnten auch sekundär Zytokine wie IL-1, IL-2 und IL-6 sowie TNF_{α} , welche durch LPS freigesetzt werden, wiederum über Rezeptoren eine Signaltransduktion auslösen (1, 19).

1.7 ARDS

Das klinische Vollbild am Zielorgan Lunge, das die zuvor beschriebenen Mediatoren auslösen, ist das bereits erwähnte ARDS. Das ARDS ist eine nicht kardial bedingte Flüssigkeitsansammlung in der Lunge, welche zu einer massiven Gasaustauschstörung führt. Erstmalig beschrieben wurde das ARDS durch Ashbaugh aufgrund seiner Ähnlichkeit zum Respiratorischen Distress Syndrom des Frühgeborenen (IRDS) (57). Hauptmerkmale sind ein deutlicher Anstieg des pulmonalvaskulären Widerstandes und eine gesteigerte Permeabilität

der kapillar-endothelialen und der alveolo-epithelialen Barriere. Hierdurch kommt es zunächst zu einem interstitiellen und dann konsekutiv zu einem proteinreichen alveolären Ödem mit einer damit verbundenen Verschlechterung der alveolären Surfactantfunktion. Dieses wiederum bedingt eine schlechte Gasaustauschstörung, sowie eine herabgesetzte Compliance der Lunge (79).

Die in der American-European Consensus Conference (AECC) fixierten Kriterien zur klinischen Fassbarkeit des ARDS lauten: akute Hypoxie innerhalb von 48 Stunden nach einem auslösenden Ereignis mit einem Horowitz-Quotienten ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) kleiner 200mmHg, beidseitige pulmonale Infiltrate und eine fehlende Linksherzinsuffizienz mit einem pulmonal-vaskulären Verschlussdruck kleiner 18mmHg (8).

Das ARDS hat eine Inzidenz von 0,03-0,75% und ist verbunden mit einer Letalität zwischen 50 und 70%. Diese steigt bei Vergesellschaftung des ARDS mit akutem Nieren- und Leberversagen innerhalb eines septischen Geschehens stark an. Man spricht dann vom Multiorganversagen.

Ursächlich für diese Störungen kommen sowohl Auslöser in Betracht, die über einen transbronchialen Zugang in die Lunge geraten als auch Auslöser die pulmonal-vaskulär eingeschwemmt werden. Diese Effektoren führen zu einer anhaltenden inflammatorischen Reaktion im Bereich des Parenchyms. Eine Prädisposition zur Erkrankung an einem ARDS ist bisher nicht bekannt. Der Erkrankungsverlauf wird unterteilt in eine exsudative Frühphase und eine proliferativ-fibrosierende Spätphase. Die Auslöser des ARDS werden in drei Gruppen unterteilt. Zum einen sind dies direkte pulmotrope Auslöser, die über den transbronchialen Weg in die Lunge gelangen. Zu ihnen zählen chemische Agenzien via Inhalation oder Aspiration und in-situ liberierte mikrobielle Agenzien aus Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten. Als zweites seien systemische Auslöser erwähnt zu denen Endotoxine und Exotoxine zählen, auf die im weiteren Verlauf eingegangen wird. Als letzte Gruppe seien die systemischen Effektoren erwähnt. Zu diesen zählen die lokal aktivierten Komplement- und Gerinnungskaskaden, und Stimulation zirkulierender inflammatorisch-kompetenter Zellen (polymorphkernige neutrophile Granulozyten [PMN], Thrombozyten, Monozyten und Lymphozyten) (3, 99).

Die genannten Effektoren der Frühphase führen zu einer zellulären und einer humoralen Antwort. Die zelluläre Antwort beinhaltet PMN und Makrophagen, die Entzündungsmediatoren freisetzen. Hierdurch kommt es zu einer Aktivierung und direkten Schädigung lokaler Strukturzellen, zu den Endothelzellen, Atemwegsepithelien und

Pneumozyten Typ II gehören. Dieses führt zu einem massiven Einstrom weiterer Entzündungszellen mit Schädigung der Typ II Pneumozyten und konsekutiver vermehrter alveolokapillärer Permeabilität und Verlust der Surfactantfunktion. Ursachen der unmittelbaren und direkten Lungenaffektion sind die Bestandteile der humoralen Antwort, zu denen die Eicosanoide, PAF, Ox-Radikale, Proteasen und alveolär generierte Gerinnungsprodukte zählen (85, 101).

Eine Vielzahl von symptomatischen Therapiestrategien zur Behandlung des ARDS sind in den vergangenen Jahren entwickelt worden. Doch keiner der Ansätze konnte in großen kontrollierten Studien eine signifikante Senkung der Letalität erzielen. Dennoch wurde die Sterblichkeit in den vergangenen eineinhalb Dekaden deutlich gesenkt, wobei nicht sicher festgestellt werden konnte, wie die Reduktion der Letalität erzielt wurde (100). Eine der zurückliegenden klinischen Studien an einem großen Kollektiv hat aber zeigen können, dass eine invasive Beatmung der Patienten mit einem Atemzugvolumen von maximal 6ml pro Kilogramm des idealen Körpergewichts einen signifikanten Einfluß auf das Überleben hat in Vergleich zu größeren Volumina hat (34). Derzeit beschäftigt sich eine weitere prospektive multizentrische, klinische Studie mit den Vorteilen der transbronchialen Applikation von rekombinantem Surfactant zur Therapie des ARDS (86).

Zu den antiinflammatorischen Strategien bei der Behandlung des ARDS sollten neben dem antibiotischen Regime die Durchbrechung der Perpetuierung des Geschehens durch Inhibition der plasmatischen Kaskadensysteme und der zirkulierenden inflammatorischen Zellen gehören.

Kriterien für das Acute Lung Injury (ALI) und das Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)		
	ALI	ARDS
Beginn	akut	Akut
Oxygenierung	$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300\text{mmHg}$	$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200\text{mmHg}$
Radiologische Zeichen	beidseitige Infiltrate in der posterior-anterioren Thoraxaufnahme	beidseitige Infiltrate in der posterior-anterioren Thoraxaufnahme
Pulmonalkapillärer Verschußdruck	$\leq 18\text{mmHg}$ oder fehlender Anhalt / Klinik für erhöhten linkskardialen Druck	$\leq 18\text{mmHg}$ oder fehlender Anhalt / Klinik für erhöhten linkskardialen Druck

Tabelle 1: Kriterien zur Definition von ARDS versus ALI. Diese gehen auf die amerikanisch-europäische Konsensuskonferenz zurück (8).

1.8 Zielsetzung

Prostaglandine werden in die Regulation und Steuerung des vaskulären Drucks mit einbezogen. Dieses geschieht sowohl unter physiologischen, als auch unter entzündlichen Bedingungen.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob die Cyclooxygenase-2 als eines der Schlüsselenzyme der Prostaglandinsynthese mit in die grundlegende physiologische Steuerung des pulmonal vaskulären Drucks eingreift oder nicht. Hierzu wurden isoliert perfundierte Rattenlungen durch eine intravenöse Applikation von freier Arachidonsäure stimuliert, über einen Thromboxan bedingten Regulationsmechanismus mit einer Vasokonstriktion der pulmonalen Gefäße zu reagieren.

In weiteren Versuchen sollte geklärt werden, ob die beobachteten Veränderungen des Beatmungsdruckes und des Lungengewichtes nach Applikation von jeweils einem von drei selektiven Hemmern der Cox-2 zu unterdrücken waren. Benutzt wurden NS-398, DUP697 und SC-236. Untersucht wurde dabei auch die Dosisabhängigkeit der jeweiligen Antworten der Organe.

Weitere Versuche mit Angiotensin II und dem Thromboxanalogon U46619 wurden durchgeführt, um die Intaktheit und Reagibilität der Gefäßmuskeln auf einen Kontraktionsstimulus unter Cox-2-Hemmung zu zeigen.

In Ergänzung zu den pathophysiologischen Untersuchungen wurden die Perfusatkonzentrationen der Arachidonsäure-Metabolite bestimmt. Es fanden dazu Proben aus der Reihe der Experimente mit dem Cox-2-Inhibitor NS-398 Verwendung. Mittels ELISA-Technik wurde analysiert, ob es im Zusammenhang mit den zu beobachtenden pathophysiologischen Veränderungen des pulmonal vaskulären Drucks und des Gewichtes der Lungen zu messbaren Konzentrationsveränderungen der stabilen Hydrolyseprodukte der zwei AA-Metabolite Thromboxan A₂ und Prostacyclin kam.

2. Material

2.1 Experimentelle Agentien und Pharmaka

Die verwendete Arachidonsäure (AA, [Eicosa-5Z, 8Z, 11Z, 14Z-tetraenoic acid]) stammte von Paesel + Lorei (D-Hanau). Das Lipopolysaccharid (LPS) ist ein Extrakt von *Salmonella abortus equi* und stammte von Cytogen (D-Bodenheim).

Als selektive Inhibitoren der Cyclooxygenase-2 wurden verwendet DUP697 (5-bromo-2-(4-fluorophenyl)-3-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-thiopen) von DuPont Merck Pharmaceutical Co. (USA-Willington), NS-398 (N-[2-cyclohexyloxy-4-nitrophenyl]methansulfonamid) von Biomol (D-Hamburg) und SC-236 ([4-[5-(4-chlorophenyl)-3-(trifluoromethyl)-1-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamid) von Searle (USA-St. Louis). Vor der Applikation in den Versuchskreislauf wurden sowohl der Cox-2-Inhibitor NS-398 als auch die AA in DMSO (Dimethylsulfoxid) von Merck (D-Darmstadt) gelöst. Die Substanzen SC-236, DUP697 und das LPS wurden in isotoner Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) von Pharmacia (D-Erlangen) gelöst.

Die für die Kontrollversuche verwendeten Substanzen waren Angiotensin II ([Asn¹, Val⁵]-Angiotensin II-acetat) von Sigma (D-München) und das stabile Thromboxan-Analogon U46619 (9,11-Dideoxy-9 α , 11 α -methanoepoxyprostaglandin F_{2 α}) von Calbiochem (D-Bad Soden, Taunus). Der unselektive Cox-inhibierende Acetylsalicylsäure (D,L-Lysin-monoacetylsalicylat) stammte von der Bayer AG (D-Leverkusen) und wurde in Aqua ad iniectabilia von Pharmacia (D-Erlangen) gelöst.

Die Perfusat-Lösung (Elektrolyt-Lösung 1/3) des Versuchsaufbaus wurde mit Natriumhydrogencarbonat 8,4% (NaHCO₃ 8,4%) gepuffert. Beide Reagenzien stammten von Serag-Wiesner (D-Naila).

Als Anästhetikum der Tiere diente Nembutal (Pentobarbital-Natrium, 60mg/ml), welches über die Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte (D-Hannover) bezogen wurde. Darüber hinaus wurde für die Präparation der Organe noch Liquemin (Natrium-Heparin 25.000: 5.000I.E./ml) von der Hoffman La Roche AG (D-Grenzach-Whylen) und Xylocain 2% (Lidocainhydrochlorid) von ASTRA Chemicals (D-Wedel) bezogen.

Die Fixierung der Organe nach dem Versuch erfolgte entweder in 3% PFA (Paraformaldehyd), durch Tiefkühlung in flüssigem Stickstoff oder mittels Instillation von OCT-PBS.

2.2 Geräte und Hilfsmittel

Das Perfusionssystem bestand aus Perfusionssystemschläuchen Tygon von Kalensee (D-Gießen) die einen Kreislauf ausgehend von Doppelwand-Reservoirgefäßen zum Organ hin bildeten. Der Perfusionsfluß wurde durch eine Rollerpumpe Masterflex-Schlauchpumpe mit Easy-Load Pumpenkopf (Modell 7518-10) von Cole-Parmer (USA-Chicago) erzeugt. Die Ventilation der Lungen erfolgte über einen Small Animal Ventilator KTR-4 von Hugo Sachs Elektronik (D-March-Hugstetten). Die Temperaturregulation der Perfusatlösung erfolgte über die erwähnten Doppelwandgefäße mit einer Thermopumpe Frigomix 1495/Thermomix 1442D von B.Braun (D-Melsungen).

Die online-Registrierung der Versuchsparameter erfolgte über eine Wägezelle U1-G von Holtinger-Baldwin-Messtechnik (D-Darmstadt) und Druckaufnehmer Combitrans-Monitoring-Set von B.Braun (D-Melsungen). Über einen Messverstärker von Hugo Sachs Elektronik (D-March-Hugstetten) wurden die Parameter auf X-Y-Mehrfachschribern der Rikadenki R 50 Series von Rikadenki Electronics (D-Freiburg) als Printout und über die Software Labtech Notebook digital registriert.

Die Steuerung des Atemgasgemisches und des pH-Wertes des Perfusates erfolgte über Zumischung von Kohlendioxyd (CO₂) von Messer-Griesheim (D-Herborn) in die Inspirationsluft und die Messung des pH-Wertes des Perfusats über ein Blutgasanalysegerät ABL 330 von Radiometer (DK-Kopenhagen).

Als Arbeitsmaterial fanden weiterhin Anwendung Hamilton Präzisionsspritzen 10µl, 50µl und 100µl von Hamilton (D-Darmstadt), Nahtmaterial Mersilene 4,1 SH von Ethicon (D-Norderstedt), Pipetten und Bakterienfilter von Micropore.

2.3 Versuchstiere

Die Versuchstiere waren CD-Ratten (Sprague Dawley) bezogen von Charles River (D-Sulzfeld). Jegliche experimentelle Vorgehen wurden durchgeführt in Anpassung an die Richtlinien des US National Institutes of Health („Richtlinie zur Pflege und Gebrauch von Labortieren“, NIH Publikation Nummer 86-23, überarbeitet 1985, US Government Printing Office, Washington DC, 20402-9325). Die verwendeten Tiere hatten ein Gewicht zwischen 350 und 400 Gramm.

2.4 Analytika

Zur Analytik der während der Versuche gewonnenen Perfusatproben wurden Elisa-Kits für Thromboxan B₂ (TxB₂) und Prostaglandin F_{1alpha} (PGF_{1alpha}) von Cayman Chemical Company (USA-Ann Arbor) benutzt.

3. Methodik

3.1 Modell der isolierten Rattenlunge

3.1.1 Einführung

Ein Modell welches mit isolierten Kleintierlungen arbeitete, in dem das Organ blutfrei perfundiert und artifiziell ventiliert wurde, ist erstmals 1912 von Knowlton und Starling unter Verwendung von Kaninchenlungen beschrieben worden (89). Seither ist dieses Modell mehrfach modifiziert in verschiedenen Experimenten eingesetzt worden. Die isoliert untersuchte Lunge bietet die Gelegenheit, unabhängig von metabolischen, humoralen oder zentralnervösen Einflüssen des Gesamtorganismus, Mechanismen der Vasomotion und Atemmechanik am intakten Organ nachzuvollziehen (90). Ferner sind auch die Beobachtungen organständiger biochemischer Prozesse möglich. In Gießen ist ein Modell der isolierten Kaninchenlunge seit den 80er Jahren etabliert und auch hier bereits mehrfach modifiziert worden. Im Focus des Interesses stehen dabei Mechanismen des Organs im ARDS und seit den 90er Jahren zunehmend auch die intrapulmonalen Prozesse bei pulmonaler Hypertonie.

Im Jahr 1995 wurde im hiesigen Zentrum ein vergleichbares Organmodell unter Benutzung von Rattenlungen etabliert. Die Isolation des Organs geschieht unter schrittweisem Ersatz von Ventilation und Perfusion des Organs aus dem gesunden, lebenden Organismus heraus. Die weitere Untersuchung erfolgt dann in einer Klimakammer, welche die natürlichen Verhältnisse von Temperatur und Feuchte mimit. Während des laufenden Versuchs können Veränderungen des pulmonal-arteriellen Drucks, linksventrikulären Drucks, Ventilationsdrucks und des Gewichtes online gemessen werden. Zusätzlich ist es möglich, während des laufenden Versuches rezidivierend Proben des zirkulierenden Perfusats zu gewinnen und darin aus biochemischen Prozessen liberierte Mediatoren nachzuweisen, um damit Rückschlüsse aus interzellulären Reaktionen ziehen zu können.

3.1.2 Aufbau des Arbeitsplatzes

Die Perfusion erfolgte mittels einer Schlauch-Peristaltikpumpe, welche einen pulsatilen Perfusatfluss durch das isolierte Organ ermöglichte (s. Abb. 3.1). Als Perfusatreservoir dienten dabei zwei parallel in den Kreislauf eingeschaltete maximal 150ml Füllvolumen fassende Glas-Doppelwandgefäße, die über einen Dreiwegehahn gesteuert, alternierend benutzt werden konnten und somit eine kontinuierliche Perfusion gewährleisten. An diesen Gefäßen konnte über einen zweiten Kreislauf, welcher über eine Thermomix-Frigomix-Einheit lief, die Temperatur des Perfusats reguliert werden. Sobald das Perfusat die Reservoirgefäße verließ, führte das Schlauchsystem als nächstes durch die Schlauch-Peristaltikpumpe. Unmittelbar vor dem Eintritt des Perfusionsmedium in die Pulmonalarterie bestand über einen Port mittels Injektionsstopfen die Option zur Applikation von Agenzien in das pulmonal-arterielle Strombett, ferner folgt dann noch ein kleines Doppelwandgefäß mit einer innen verlaufenden Glasspirale, durch welche das Perfusat floss. Diese diente als Blasenfalle zur Verhinderung von pulmonal-arteriellen Luftembolien und führte über eine Integration in den Wärme-/Kälte-Kreislauf der Thermomix-Frigomix-Einheit zur nochmaligen Erwärmung des Perfusats vor dem Eintritt in die Lunge. Der arterielle Katheter wurde in der Arteria pulmonalis fixiert. Nach Passage des pulmonalen Strombetts floss das Medium über einen im linken Ventrikel fixierten Katheter ab. Der pulmonal-venöse Abstrom des Perfusats konnte optional über eine leiterförmige Kaskade im Druck um 10cm Wassersäule erhöht werden, wobei die untere Sprosse auf Hilusniveau lag. Danach floss das Perfusat frei in die Reservoirgefäße zurück. Somit konnte es über einen erneuten Dreiwegehahn entweder der Rezirkulation zugeführt oder verworfen werden. Nach dem Abfluss aus dem pulmonalen Strombett besitzt das Perfusionssystem einen Port zur direkten Abnahme von venösem Probenmaterial. Als weiterer Ort zur Applikation von Agenzien eigneten sich die beiden Reservoirgefäße. Das eigentliche Perfusionsschlauchsystem (s. Abb. 3.1) fasste hierbei 30ml.

Im arteriellen Schenkel des Perfusionssystem befand sich ein dünner hartwandiger Druckmesskatheter (Innendurchmesser 1mm), dessen distale Öffnung direkt vor dem pulmonal-arteriellen Katheter lag und konnektiert mit einem elektromechanischen Druckwandler die Online-Registrierung des Drucks sowohl auf einem X-Y-Schreiber, als auch über ein spezielles Programm auf einem Personalcomputer ermöglichte. Analog erfolgte die Aufzeichnung des pulmonal-venösen Drucks vor dem pulmonal-venösen Katheter. Eine

Änderung der Masse der Lunge im experimentellen Ablauf wurde über eine Wägezelle, an welcher die Lunge befestigt war, erfasst und entsprechend den arteriellen und venösen Drücke registriert. Um das isolierte Organ in einer klimatisch weitestgehend physiologischen Umgebung zu halten, wurde diese im Versuch in ein weiteres großes Doppelwandgefäß integriert, welches ebenfalls in den Kreislauf der Thermomix-Frigomix-Einheit eingefügt war. Durch diese Klimakammer sollten sowohl Temperatur- als auch Flüssigkeitsverlust an der Organoberfläche soweit als möglich reduziert werden.

Da es in den Experimenten unter anderem um den analytischen Nachweis von Entzündungsmediatoren gehen sollte, musste unter möglichst sterilen Bedingungen gearbeitet werden. Hierzu wurde das komplette Schlauchsystem, welches zur Perfusion notwendig war, inklusive der Katheter nach jedem Versuch nach vorhergehender Reinigung mit Ethylenoxid gassterilisiert und sämtliche Glasgefäße über 120 Minuten bei 200 Grad Celsius hitzesterilisiert. Die Messung des Endotoxingehaltes des Perfusats war nach Ende der Steady State Periode unterhalb der Nachweisgrenze (1pg/ml) des eingesetzten Endotoxin Coatests (Kabi Vitrum GmbH). Der Test nutzt die Aktivierung des Gerinnungssystems des Limulus Amoebocyten durch Endotoxin (LAL-Test). Ein durch Endotoxin aus einem Proenzym entstehendes Enzym katalysiert die Reaktion des chromogenen Substrates S-2423 (Ac-Ile-Glu-Gly-Arg-pNa*HCl) zu p-Nitroanilin, welches photometrisch bei 405nm gemessen werden konnte. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über den Vergleich mit einer Standarddeichkurve aus Escherichia coli Standard Endotoxin.

Die Perfusion erfolgte mit einem synthetischen sterilen Perfusionsmedium (Elektrolytlösung 1/3, Serag Wiesner) mit folgender Zusammensetzung:

- NaCl 125,00mM
- MgCl₂ 1,30mM
- CaCl₂ 2,40mM
- KCl 4,30mM
- KH₂PO₄ 1,10mM
- NaHCO₃ 25,00mM
- Glucose 13,32mM

Das Perfusat wurde durch den Zusatz von 25ml NaHCO₃ 8,4% (Serag Wiessner) zu 1.000ml der Elektrolytlösung 1/3 auf einen Ausgangs-pH-Wert von zirka 7,65 eingestellt. Zur Ausschwemmung eventueller organischer Reste wurde vor jedem Versuch das Schlauchsystem mit zunächst 300ml Aqua ad iniectabilia (Pharmacia), dann mit 300ml NaCl 0,9% (Pharmacia) und zuletzt mit 300ml des genannten Perfusats gespült. Diese Spülflüssigkeiten wurden nach einmaligem Durchlaufen des Systems verworfen. Zur Erzielung eines blasenfreien Systems wurde dasselbe komplett in Stromrichtung ausgeklopft.

Während der Spülmaßnahmen wurde der Kühlkreislauf gleichzeitig zur initialen Präparation des Organs auf 4° Celsius herabgekühlt und der Perfusat-Flow der Pumpe nach Umschalten des Kreislaufs auf Rezirkulation auf 4ml/min reduziert. Parallel zur Temperatursteigerung des integrierten Organs auf 37° Celsius erfolgte dann die Erhöhung des Perfusatfluss auf 13ml/min. Nach Erreichen dieser maximalen Perfusionsgeschwindigkeit und der Endtemperatur folgte ein Beobachtungszeitraum von 30 Minuten. Nur Lungen, welche während dieser steady-state Periode sowohl druck- als auch gewichtsstabil waren, wurden in die Untersuchung eingeschlossen.

Die Ventilation der Lungen wurde mittels eines Small Animal Ventilator KTR-4 (Hugo Sachs) durchgeführt. Als Beatmungsparameter wurden dabei eine Atemfrequenz von 65 Hüben min⁻¹, ein Atemzugvolumen von 4ml, ein positiver endexpiratorischer Druck (PEEP) von 3cm Wassersäule und ein Verhältnis von Inspiration zu Expiration von 2:3 gewählt. Als Atemgas diente hierbei unbefeuchtete Raumluft mit der Möglichkeit der zusätzlichen Insufflation von Kohlendioxyd (CO₂). CO₂ wurde optional nach der Explantation der Lunge zur Steuerung des Säure-Basen-Haushaltes zugeführt. Die angestrebten CO₂-Partialdrücke am Atemgasgemisch waren dabei 5mmHg ohne und 20-35mmHg mit zusätzlicher CO₂-Insufflation.

3.1.3 Präparation der isolierten Lunge

Als erstes erfolgte eine Anästhesie mit 0,036 Gramm Nembutal (Pentobarbital-Natrium). Das Präparat wurde nach Fixierung des Tieres perkutan intraperitoneal in den rechten unteren Quadranten des Abdomens appliziert. Nach Eintreten einer ausreichend tiefen

Hypnose mit erhaltener Spontanatmung wurde nach vorhergehender Desinfektion mit Braunovidonlösung im Bereich der ventralen Halsseite 3cm oberhalb des Jugulums eine subkutane prätracheale Infiltrationsanästhesie mit 2,5ml Xylocain 2% durchgeführt. Im Folgenden konnte die Trachea unter schichtweiser Präparation und Schonung der großen Gefäße, insbesondere der Venae jugulares, mobilisiert werden und nach Tracheotomie eine Trachealkanüle mit einem Innendurchmesser von 2,5mm eingeführt und mittels Ligatur fixiert werden. Die Beatmung erfolgte mit einem Atemzugvolumen von 4ml und einer Ventilationsfrequenz von 65 min^{-1} . Das Atemgasgemisch bestand initial aus 4% CO_2 , 17% O_2 und 79% N_2 .

Als nächstes erfolgte zur Laparatomie ein weiterer Hautschnitt in der Medianlinie von der Blase bis in das Epigastrium. Es wurde die Vena renalis sinistra aufgesucht und nach Punktion derselben zunächst eine intravenöse Antikoagulation mit insgesamt 1.000I.E. Heparin durchgeführt, danach wurde das Gefäß abgeklemmt. Vor der folgenden Thorakotomie wurde an dieser Stelle mit einer CO_2 -Insufflation in das Atemgas begonnen und ein positiv endexpiratorischer Druck (PEEP) von 3cm Wassersäule eingestellt. Zur Thorakotomie wurde der Processus xiphoideus angeklemt und das Diaphragma unter absoluter Schonung des Lungenparenchyms streng entlang beider Rippenbögen in Richtung auf die Wirbelsäule eröffnet. Die dabei in den dorsalen Bereich der Thoraxhöhlen zurückfallenden Lungenflügel erleichterten die auf die Trachea zulaufende mediane Sternotomie. Es erfolgte nun die stumpfe Entfernung des Thymus in kranialer Richtung. Vor der Eröffnung des Herzens wurde nach Punktion des rechten Ventrikels zirka 5ml venöses Blut aspiriert. Dieses erleichtert zum einen die weitere Präparation des Herzens und gibt darüber hinaus noch die Möglichkeit einen Plasmapool nach Abzentrifugation der zellulären Bestandteile des Vollbluts anzulegen.

3.1.4 Integration des Organs in das Meßsystem

Nachdem das Herz im oberen Anteil des rechten Ventrikel eröffnet wurde, erfolgte unter Sicht die Einbringung des arteriellen Katheters, über welchen bereits zu diesem Zeitpunkt Perfusat mit einem Flow von 4ml pro Minute und einer Temperatur von 4 Grad Celsius gefördert wurde, in die Arteria pulmonalis und die Fixierung mittels Ligatur. Die Rezirkulation des Perfusionsmediums wurde dabei bereits unterbrochen. Ohne Verzug wurde

daraufhin die Herzspitze eröffnet, um eine pulmonale Stauung zu vermeiden. Während dieser Phase des Versuchs sollten sich beide Lungenflügel gleichmäßig weiß verfärben. Nun konnte die Lunge dorsal unter Abtrennung von Ösophagus, Vena cava und Aorta aus ihrem Bett gelöst werden und in der Aufhängung angebracht werden. Als nächstes wurde der venöse Schenkel über die geöffnete Apex cordis in das Herz eingebracht und ebenfalls mittels Ligatur fixiert und mit dem venösen Schenkel des Perfusionsystems blasenfrei konnektiert (s. Abb. 3.2).

Nach erfolgter Konnektion der Druckaufnehmer für den pulmonal-arteriellen Druck (PAP), den linksventrikulären Druck (LVP) und den Ventilationsdruck (VP) sollten die erreichten Werte für den PAP zwischen 5 und 8mmHg (mit einer Toleranz bis 10mmHg), für den LVP bei 1,5-2mmHg und den VP bei 10cm H₂O liegen. Eine Einstellung des LVPs erfolgte dabei über eine Nivellierung der Kaskade als Abrisspunkt für den kontinuierlichen Perfusatflow. Als Referenzwert mit 0mmHg wurde dabei das Hilusniveau angesehen. Im Folgenden wurde die Frigomix-Einheit abgestellt und an der Thermomix-Einheit ein Sollwert von 41 Grad Celsius eingestellt, was einem Wert von 37 Grad Celsius an der Spitze des arteriellen Katheters entspricht, und während der Aufheizphase der Flow parallel bis auf 13ml/min gesteigert. Bei Erreichen der Ausgangstemperatur von 41 Grad Celsius wurde das Perfusat erneut bis zur 150ml Marke aufgefüllt, die Lunge in die vorbereitete Klimakammer eingepasst (s. Abb. 3.3) und beim Ablaufen des Perfusats die Lunge zweimal mit einem Seufzer von jeweils zwei Atemzügen gebläht, um atelektatische Bereiche zu eröffnen und im Gefäßsystem adhärenente Zellmengen auszuschwemmen. Beim Erreichen der 70ml Marke wurde das Perfusionsystem dann auf Rezirkulation geschaltet. Somit betrug das zirkulierende Perfusativolumen 100ml.

Der links-atriale Druck wurde unter Baseline-Bedingungen auf 2mmHg justiert, wobei als Referenzwert mit 0mmHg der Hilus angesehen wurde. Diese Einstellung garantierte endexpiratorisch Zone III Bedingungen in der Lunge.

Während dieser Vorlaufzeit sollte der pH-Wert von einem Ausgangswert von 7,10 (bei 4°C und einem Flow von 4ml/min) sich langsam dem Wert von 7,35 (bei 37,5°C und einem Flow von 13ml/min) annähern. Gegebenenfalls musste mit einer Justierung der CO₂-Insufflation gegengesteuert werden. Befanden sich zu diesem Zeitpunkt alle Messparameter im Ausgangsbereich, konnte die Aufzeichnung gestartet werden und der Versuch mit der initialen dreißigminütigen Steady State Phase beginnen.

Von den Lungen geforderte Einschlusskriterien zur Verwendung im physiologischen Versuch waren eine homogene, nach Ausspülen des Blutes weiße Oberfläche ohne sichtbare atelektatische Bezirke, Hämostase oder Ödembildung, Druck- und Gewichtskonstanz während dieser Steady State Phase, Einhaltung der Normwerte für Perfusions- (5-8mmHg) und Beatmungsdruck (10cm H₂O), sowie vollständige Dichtigkeit des Schlauchsystems und der Konnektionsstellen zum Organ.

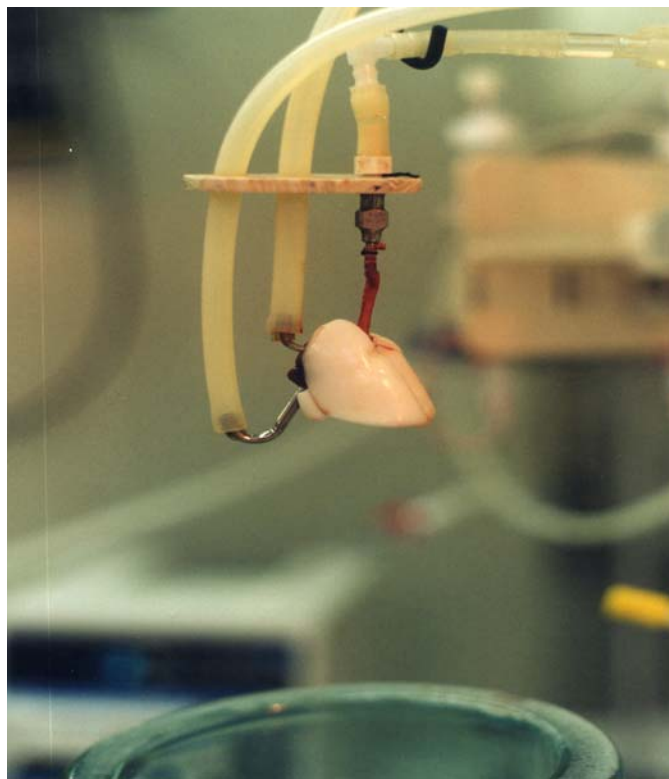


Abbildung 3.2: Die isolierte Rattenlunge: Dargestellt ist die intubierte Trachea mit eingebrachten Kathetern in die Arteria pulmonalis (oben) und linkem Ventrikel (unten). Das Organ hängt über das Ventilations- und Perfusionssystem an der Wägezelle. Bisher ist das Organ noch nicht in die Klimakammer am unteren Bildrand eingebracht.

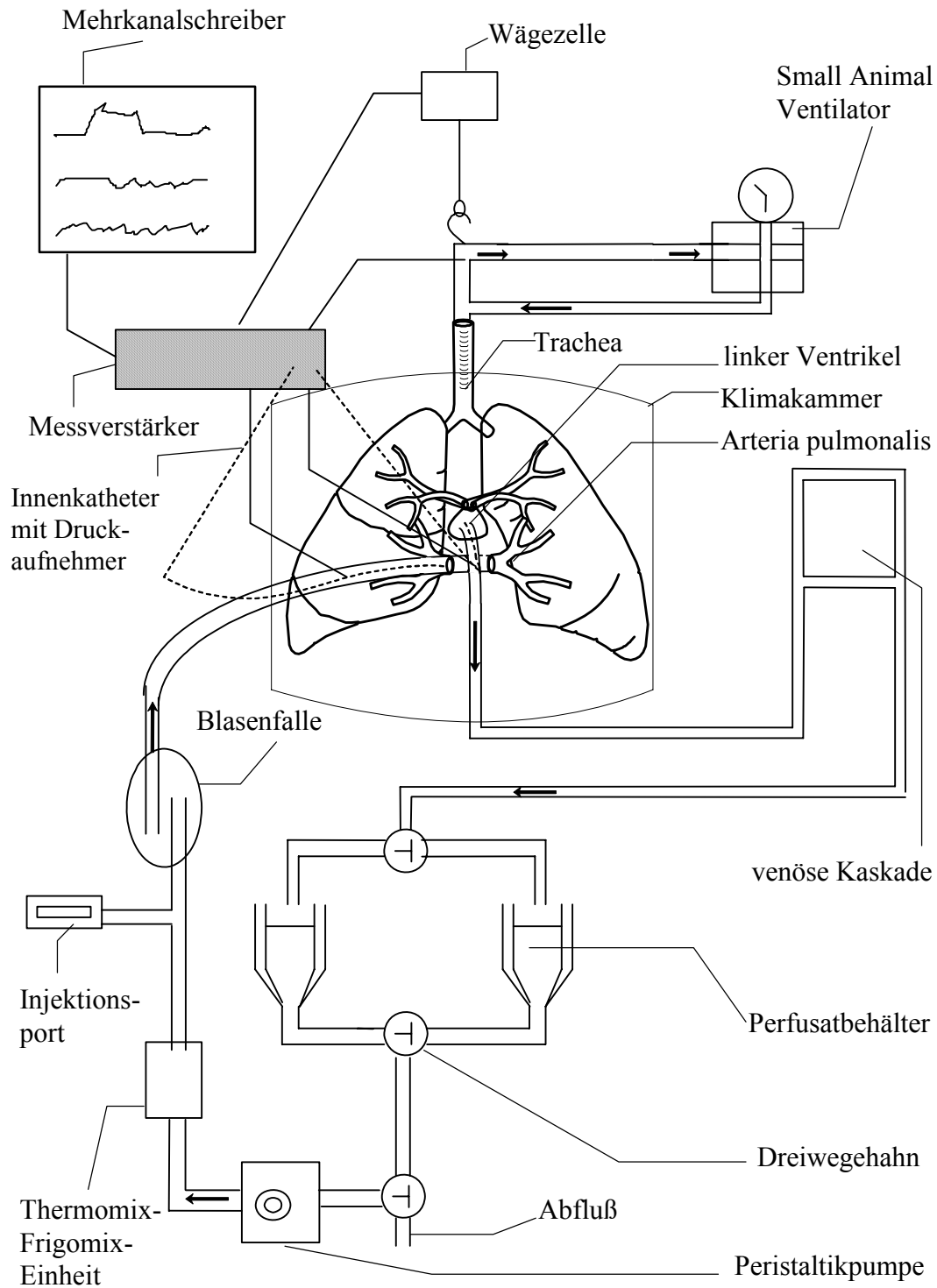


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

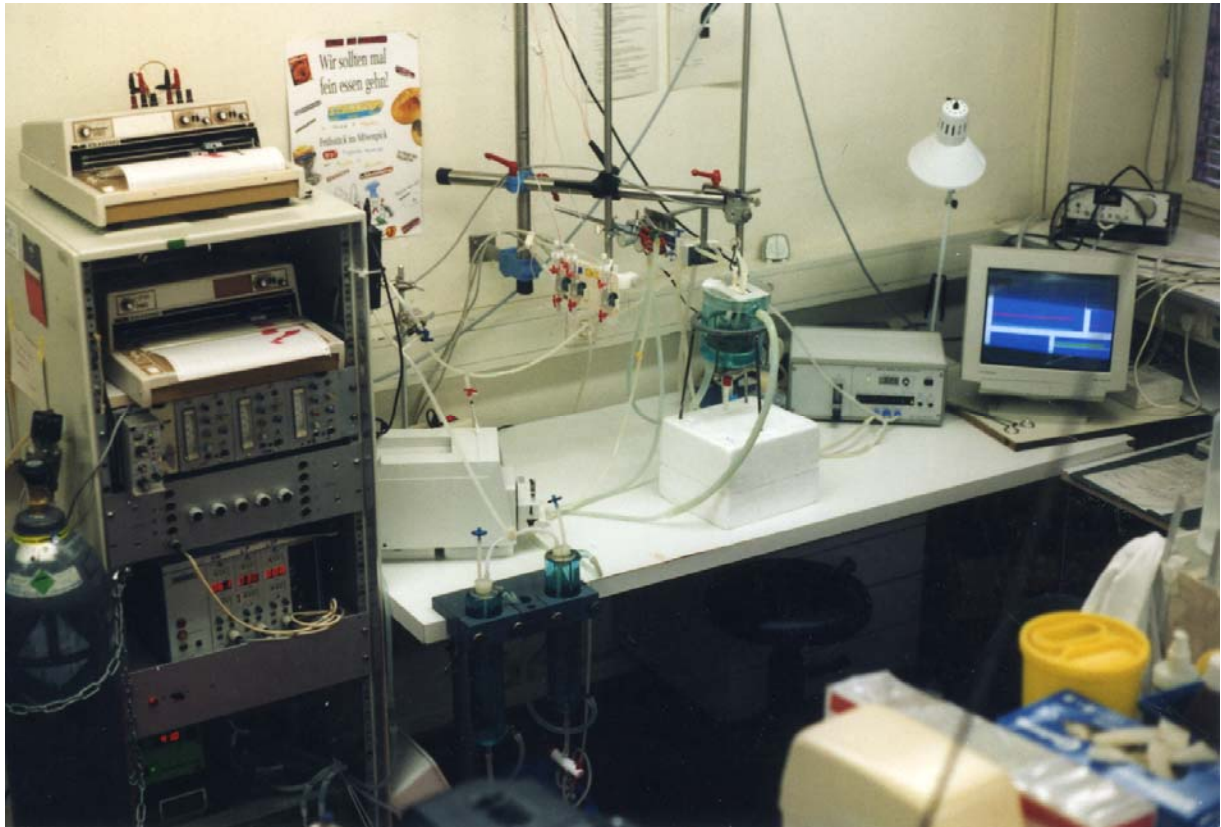


Abbildung 3.3: Darstellung des Versuchsaufbaus. Dargestellt ist das komplett in die Klimakammer in der Bildmitte integrierte Organ. Rechts davon befinden sich das Beatmungsgerät und der PC zur Online-Registrierung der Messwerte. Links finden sich neben den Perfusionssystemen noch die Perfusionspumpe und die beiden Perfusatreervoirs. In dem Messturm zu erkennen sind von oben nach unten die beiden XY-Schreiber, der Messverstärker und die Thermomix-Frigomix-Einheit.

3.1.5 Versuchsprotokoll

Lungen ohne Medikamentenapplikation wurden unter Standardbedingungen für zwei Stunden rezirkulierend perfundiert (n=3). Versuche mit Medikamentenapplikation wurden dem Schema welches in Abbildung 3.4 dargestellt ist entsprechend durchgeführt. In Kontrollversuchen (n=5) wurde nach Beendigung der Steady State Phase als Stimulation freie AA der Perfusatflüssigkeit in einer Konzentration von $5\mu\text{mol/l}$ zugefügt. Dieses Manöver

wurde nach 30 und 60 Minuten durch erneute Applikation von freier AA in derselben Dosierung wiederholt.

Die folgenden Konzentrationen und Kombinationen von Cyclooxygenase-Hemmern und Stimulatoren wurden dabei verwandt. 1mmol/l ASA und 5 μ mol/l AA (n=4); NS-398 in verschiedenen Konzentrationen (1 μ mol/l, 5 μ mol/l 10 μ mol/l, 25 μ mol/l und 50 μ mol/l) und 5 μ mol/l AA (n=5 pro Kombination); 25 μ mol/l DUP697 und 5 μ mol/l AA (n=4); 10 μ mol/l SC-236 und 5 μ mol/l AA (n=4); 30nmol/l Angiotensin II (n=4); 25 μ mol/l NS-398 und 30nmol/l Angiotensin II (n=4); 2,5nmol/l U46619 (n=5); 25 μ mol/l NS-398 und 2,5nmol/l U46619 (n=4). Weitere Versuche wurden durchgeführt mit Cox-2 Hemmern (DUP697: n=3, NS-398: n=1) in einer Konzentration von 50 μ mol/l und AA mit einer Konzentration von 15 μ mol/l.

Die Inhibitoren wurden zehn Minuten vor der ersten AA-Applikation appliziert, um eine ausreichende Präinkubationszeit zur strukturellen Bindung und irreversiblen Hemmung der Cox-2 zu gewährleisten (17). Zusätzlich wurden Kontrollversuche (n=3) mit alleiniger Applikation von dem Lösungsmittel DMSO in einer den Verumversuchen entsprechenden Konzentration durchgeführt. Proben zur Perfusatanalyse wurden direkt vor und im zeitlichen Abstand von zwei, fünf und zehn Minuten nach jeder Applikation von AA gewonnen (s. Abb. 3.4).

In einer Vorversuchsreihe wurden die Lungen vor einer Medikamenten- oder Inhibitorenapplikation zunächst mit Lipopolysaccharid geprimt. Hierzu fanden zunächst Dosisfindungsversuche für LPS statt. Nach einer LPS-Applikation mit einer Konzentration von 100ng/ml (n=3), 1.000ng/ml (n=3) und 10.000ng/ml (n=3) wurden die Lungen über 60 Minuten inkubiert, bevor dann die Stimulation mit 3 μ mol/l freier AA erfolgte.

Da die Dosis von 10.000ng/ml LPS in Kombination mit einem Stimulus freier AA eine signifikant höhere Reaktion gegenüber der alleinigen AA-Stimulation zeigte, wurde diese für die Versuche mit Cox-2-Inhibition verwandt. Nach einem Priming entsprechend dem zeitlichen Verlauf der Vorversuche wurde dann 10 Minuten vor der Applikation der AA NS-398 in einer Konzentration von 25 μ mol/l zugesetzt (n=5).

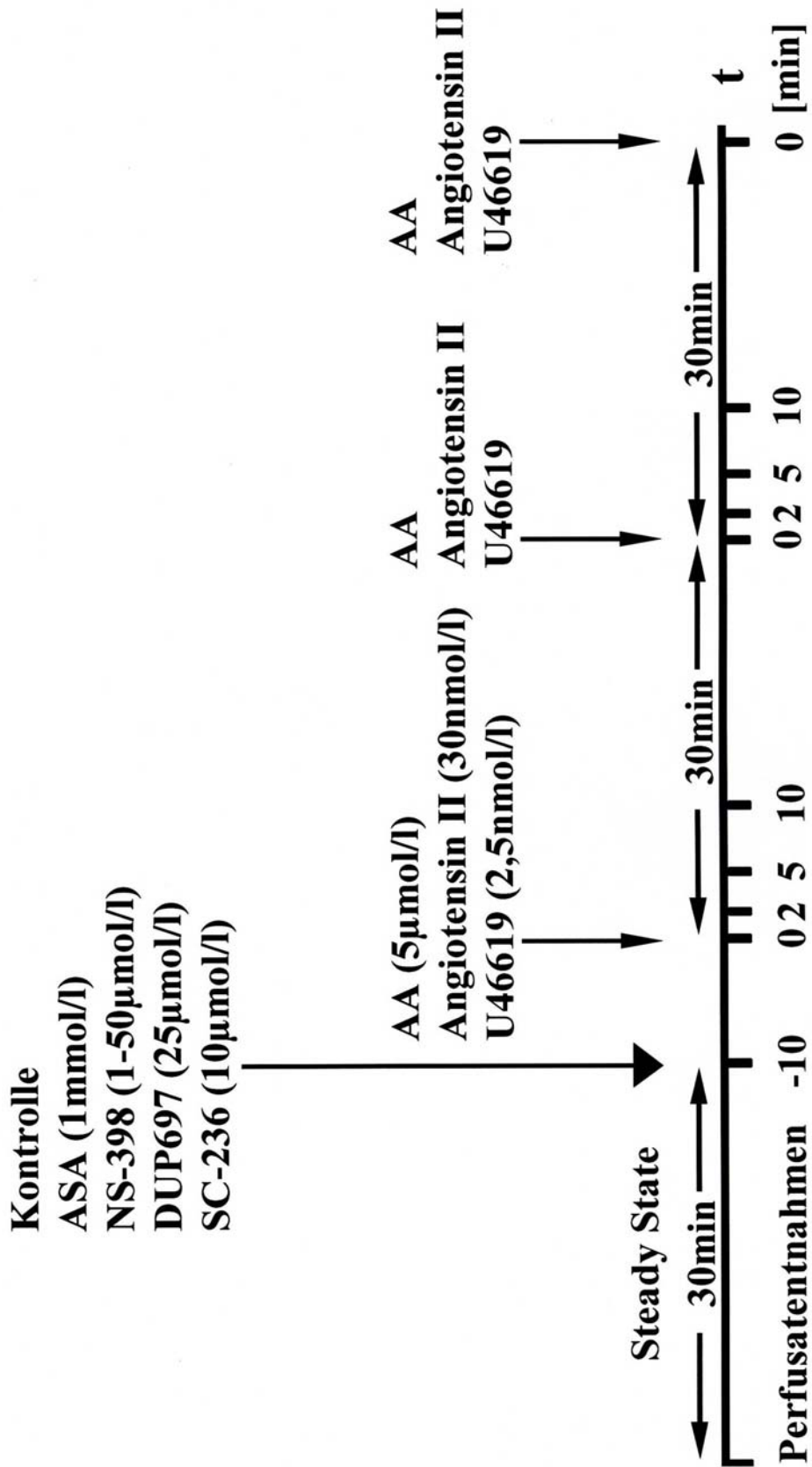


Abbildung 3.4: Schematisierter Versuchsablauf

3.1.6 Messwertparameter

Die Registrierung von VP, LVP und PAP erfolgte über in die entsprechenden Schlauchsysteme eingebrachte Innenkatheter. Diese Katheter endeten in einem für die gesamte Versuchsreihe definiertem Abstand zur Trachea, linken Ventrikel respektive Arteria pulmonalis. Das andere Ende wurde jeweils mit einem in der Intensivmedizin gebräuchlichen Druckaufnehmer verbunden. Die Zunahme des pulmonal-arteriellen Drucks wurde berechnet als Differenz unmittelbar vor zu größter Auslenkung nach Arachidonsäure-Applikation.

Das Lungengewicht wurde kontinuierlich mit einer elektronischen Wägezelle U1-G gemessen. Die Gewichtszunahme wurde berechnet als Differenz 2min vor zu 10min nach Arachidonsäure-Applikation.

Diese Messwertparameter wurden via Messverstärker online in einem Personalcomputer registriert, digital gespeichert und zusätzlich auch als Hardcopy von zwei X-Y-Schreibern aufgezeichnet (s. Abb. 3.5).

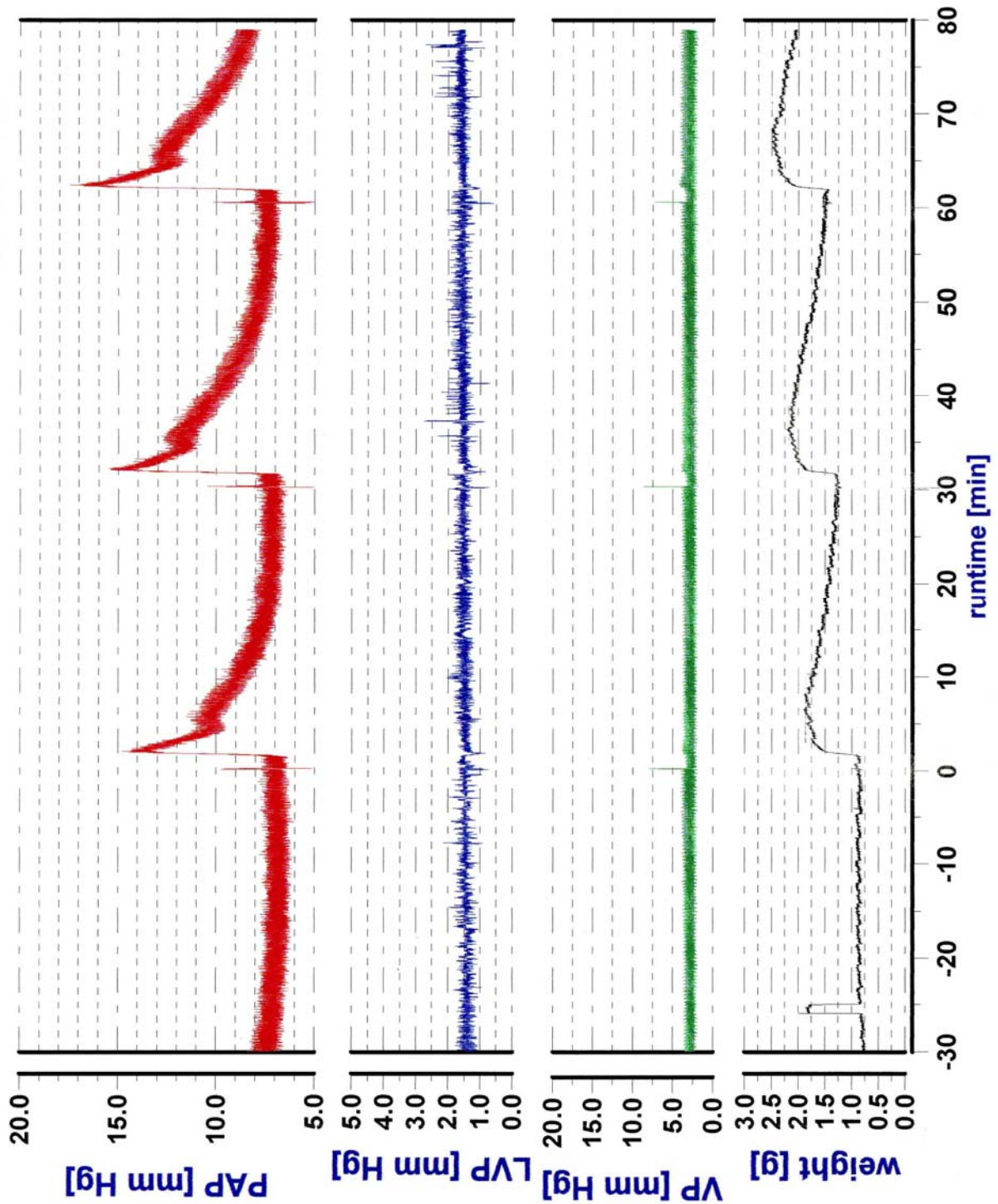


Abbildung 3.5: Originalaufzeichnung eines Kontrollversuchs. Dargestellt ist die dreimalige Applikation von Angiotensin II zu den Zeitpunkten 0, 30 und 60 Minuten nach $t = 0$. Es zeigt sich die jeweils transiente Zunahme des PAPs mit korrespondierender, nicht-reversibler Gewichtszunahme des Organs. Der Zeitraum $t = -30$ bis 0 beschreibt die Steady-State Phase. Unmittelbar vor der Applikation des Medikaments wurde die Expiration der Lunge im Sinne eines Seufzers für zwei

Inspirationsphasen blockiert, was sich in dem kleinen zeitgleichen Ausschlag der PAP- und VP-Aufzeichnung zeigt.

3.2 Reinigung des Perfusions- und Beatmungssystem

Nach Beendigung des Versuchs und Entfernung des Organs wird das Perfusionssystem zur Reinigung zunächst mit mindestens zwei Litern Aqua ad iniectabilia und einem Flow von 150ml/min gespült. Danach erfolgte ebenso wie bei dem Beatmungssystem eine Reinigung bei 60° Celsius unter Zugabe eines Detergens und abschließend nach mehrfacher Spülung mit demineralisiertem Wasser durch Ausblasen mit Druckluft die Trocknung. Zuletzt wurden beide Systeme mit Ethylenoxid gassterilisiert.

Sowohl die Doppelwand-Perfusatgefäße als auch die Glasspirale wurden nach einer Reinigung mit Detergens und mehrfacher Spülung mit demineralisiertem Wasser über zwei Stunden mit einer Temperatur von 200° Celsius hitzesterilisiert.

3.3 Perfusatanalyse

Thromboxan A₂ (TxA₂) und Prostacyclin (PGI₂) wurden mittels ELISA ihrer stabilen Hydrolyseprodukte Thromboxan B₂ (TxB₂) und 6-keto Prostaglandin F_{1alpha} (6-keto PGF_{1alpha}) nachgewiesen.

3.4 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte durch die Analyse der Varianz (ANOVA), den Student-Newman-Keuls multiple Comparison Test und den T Test für nicht

gepaarte Daten. Verglichen wurden jeweils die Werte in den einzelnen Gruppen als auch die Gruppen gegeneinander.

Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen. Alle angegebenen Daten erscheinen als Mittelwert plus/minus SEM.

4. Ergebnisse

4.1 Kontrollversuche

In den Kontrollversuchen wurde an den Lungen über den gesamten Beobachtungszeitraum von zwei Stunden keine Gewichtszunahme oder Änderung des pulmonal-arteriellen sowie des Beatmungsdruck registriert. Eine Applikation von 5 μ mol/l freier AA erzeugte eine reproduzierbare und reversible Erhöhung des PAPs (s. Tbl. 2). Begleitend wurde eine langsame aber beständige Zunahme des Lungengewichts beobachtet (s. Tbl. 3). Bei gleichzeitiger Gegenwart von 1mmol/l ASA wurde die Druckantwort auf die Bolusinjektion von AA komplett verhindert. Entsprechend wurde die durch AA induzierte Lungengewichtszunahme durch ASA weitestgehend unterdrückt ($\Delta W < 0,2g$).

Versuche zur Untersuchung des Lösungsmittels DMSO alleine zeigten bei dessen Applikation in das Perfusat keinen Effekt.

Keiner der untersuchten Cyclooxygenase-Hemmer (ASA, NS-398, DUP697, SC-236) verursachte in Abwesenheit von AA oder anderweitiger vasokonstriktorischer Stimulatoren eine Änderung des pulmonal-arteriellen Drucks im Vergleich zur Baseline.

4.2 Inhibierung der Cox-2 mit NS-398, DUP697 und SC-236

Einer der Versuchsansätze sieht es vor, dass der Stimulation mit Arachidonsäure vorausgehend der Cox-2-Inhibitor NS-398 in verschiedenen Konzentrationen (1, 5, 10, 25 und 50 μ mol/l) in das zirkulierende Perfusat appliziert wird. Dieser reduziert merklich die Druckantwort auf eine AA-Stimulation in Abhängigkeit von Zeit und Dosis (s. Tbl. 2). Die Hemmung erscheint ausgeprägter bei der ersten AA-Applikation im Vergleich zur zweiten und dritten Bolusinjektion. Eine Vorbehandlung mit 50 μ mol/l NS-398 führt zu einer kompletten Unterdrückung der Druckantwort auf die Applikation von AA. Nur auf die dritte Bolusinjektion hin kommt es zu einer zu registrierenden geringen Erhöhung des PAP um

0,3mmHg. Die Signifikanzen liegen dabei im Bereich von $p < 0,001$ bis $p < 0,01$ und gelten dabei als „hoch“ bis „sehr“ signifikant.

Die zwei weiteren selektiven Cox-2-Inhibitoren DUP697 und SC-236, welche jeweils nur in einer Dosierung eingesetzt wurden, hemmen korrespondierend zu der Reaktion auf NS-398 hin die vasokonstriktorische Reaktion auf eine AA-Stimulation.

Die Lungengewichtszunahme welche durch AA-Applikationen ausgelöst wurde, war durch Vorbehandlung mit NS-398 dosisabhängig zu unterdrücken (s. Tbl. 2, Abb. 4.1, Abb. 4.2 und Abb. 4.3). Versuche mit der Applikation von höheren Dosierungen von AA (15 μ mol/l) zur Überwindung der Cox-2-Hemmung und Untersuchung einer eventuellen Aktivität der Cox-1 zeigten keine Erhöhung der Druckwerte, aber eine deutlich gesteigerte Lungengewichtszunahme im Vergleich zu den Versuchen mit 5 μ mol/l AA und den selben Inhibitor-Konzentrationen.

Auch in Bezug auf die Gewichtszunahme kam es bei DUP697 und SC-236 zu einer ähnlichen Ansprache in Vergleich zu NS-398 (s. Tbl. 3, Abb. 4.4, Abb. 4.5 und Abb. 4.6). Allerdings waren hierbei die Signifikanzen deutlich geringer.

Bei den durchgeführten Untersuchungen mit allen drei Inhibitoren kam es zu keiner Veränderung des Beatmungsdrucks der isolierten Organe.

Veränderung des pulmonal-arteriellen Drucks (Δ PAP) [§]							
unter Applikation von Arachidonsäure							
Gruppe	Inhibitor- konz. [μ mol/l]	1. Appl. Δ PAP [mmHg]	SEM	2. Appl. Δ PAP [mmHg]	SEM	3. Appl. Δ PAP [mmHg]	SEM
Kontrolle	-	4,40	0,69	4,88	0,43	4,50	0,88
NS-398	1	1,74***	0,41	3,20*	0,65	1,28*	0,31
	5	1,50***	0,58	2,15**	0,69	2,76	0,74
	10	0,80***	0,12	1,78***	0,48	3,32	1,28
	25	0,22***	0,02	0,60***	0,13	1,22*	0,34
	50	0,00***	0,00	0,00***	0,00	0,30**	0,18
DUP697	25	0,83***	0,04	2,70*	0,12	3,00	0,85
SC-236	10	1,18***	0,49	0,98***	0,38	1,03*	0,31

Tabelle 2: Beobachtung des pulmonal-arteriellen Drucks bei vergleichenden Gruppen von selektiver Cox-2-Inhibition mit AA-Stimulation: Die statistische Signifikanz ist angegeben mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. §Die PAP-Zunahme wurde berechnet als Differenz unmittelbar vor zu größter Auslenkung nach Arachidonsäure-Applikation

Veränderung des Gewichts (ΔW) [§]							
unter Applikation von Arachidonsäure							
Gruppe	Inhibitor- konz. [$\mu\text{mol/l}$]	1. Appl. ΔW [g]	SEM	2. Appl. ΔW [g]	SEM	3. Appl. ΔW [g]	SEM
Kontrolle	-	0,58	0,14	0,55	0,05	0,68	0,24
NS-398	1	0,14**	0,05	0,33	0,11	0,17*	0,03
	5	0,15**	0,06	0,32	0,10	0,18*	0,07
	10	0,04***	0,02	0,11*	0,04	0,18**	0,11
	25	0,11**	0,03	0,09*	0,03	0,16*	0,04
	50	0,03***	0,01	0,06*	0,04	0,06**	0,04
DUP697	25	0,07**	0,03	0,32	0,10	0,23*	0,06
SC-236	10	0,32*	0,11	0,47	0,13	0,37*	0,06

Tabelle 3: Gewichtsbeobachtung bei vergleichenden Gruppen von selektiver Cox-2-Inhibition mit AA-Stimulation: Die statistische Signifikanz ist angegeben mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. §Gewichtszunahme wurde berechnet als Differenz 2min vor zu 10min nach Arachidonsäure-Applikation

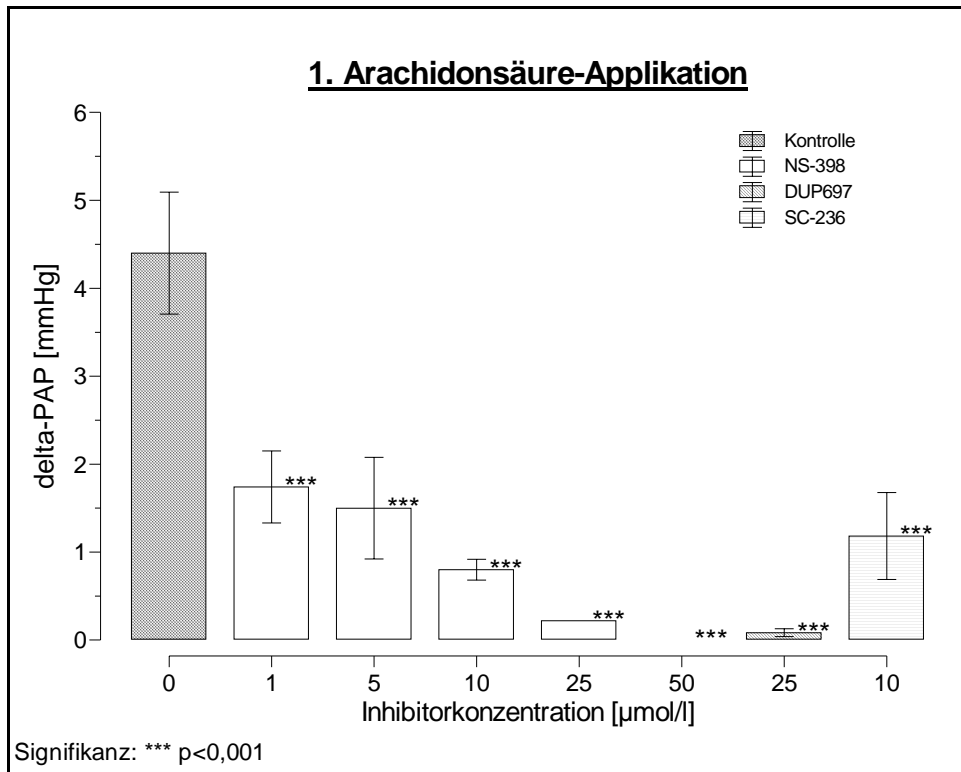


Abbildung 4.1: PAP-Änderung bei AA-Appl. zum Zeitpunkt $t = 0$ min

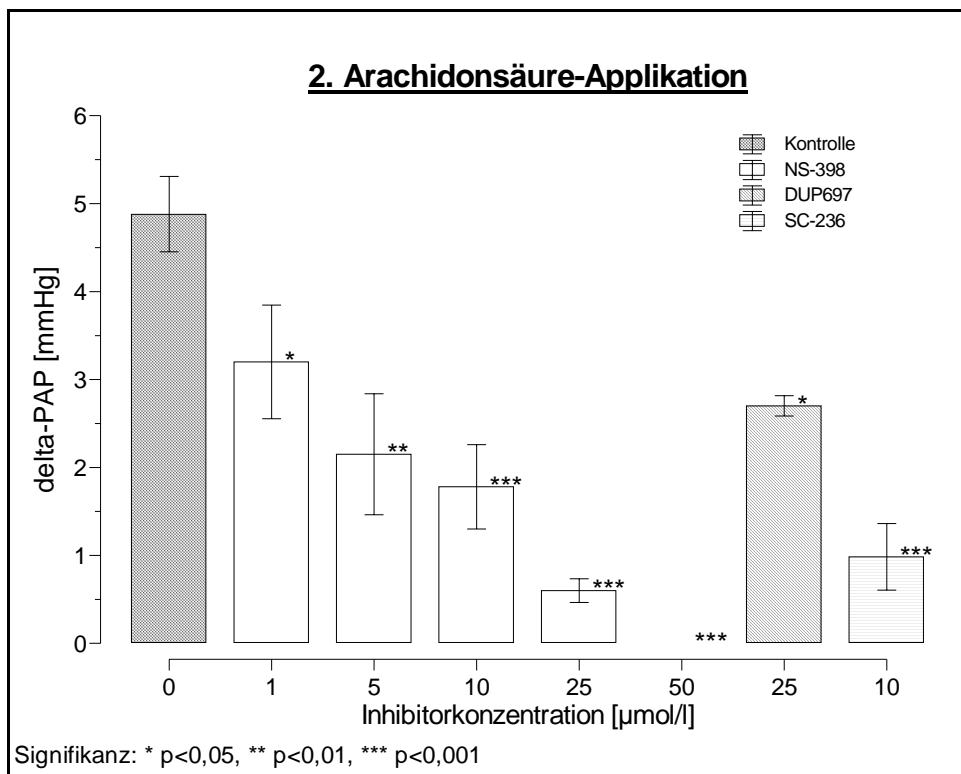


Abbildung 4.2: PAP-Änderung bei AA-Appl. zum Zeitpunkt $t = 30$ min

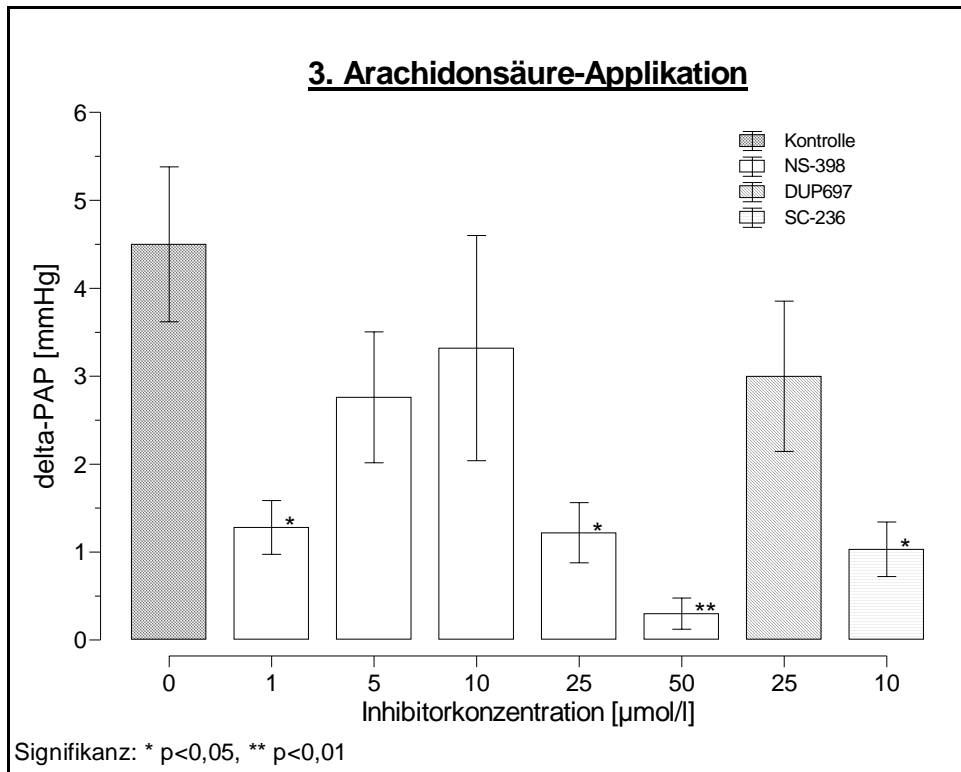


Abbildung 4.3: PAP-Änderung bei AA-Appl. zum Zeitpunkt $t = 60\text{min}$

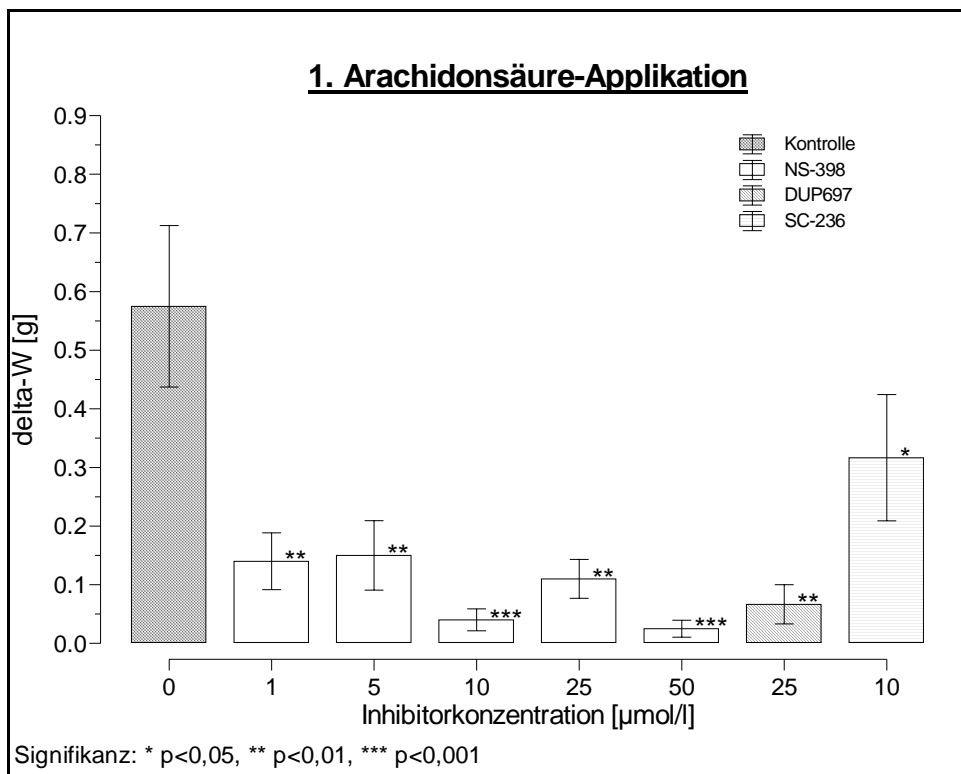


Abbildung 4.4: Gewichts-Änderung bei AA-Appl. zum Zeitpunkt $t = 0\text{min}$

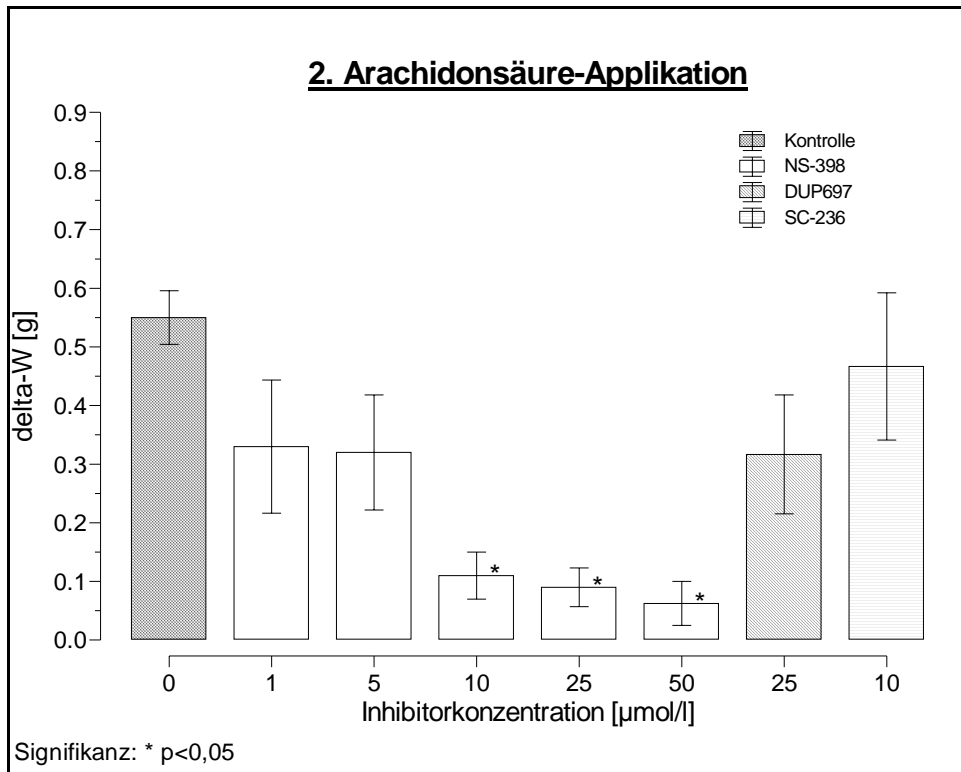


Abbildung 4.5: Gewichts-Änderung bei AA-Appl. zum Zeitpunkt $t = 30\text{min}$

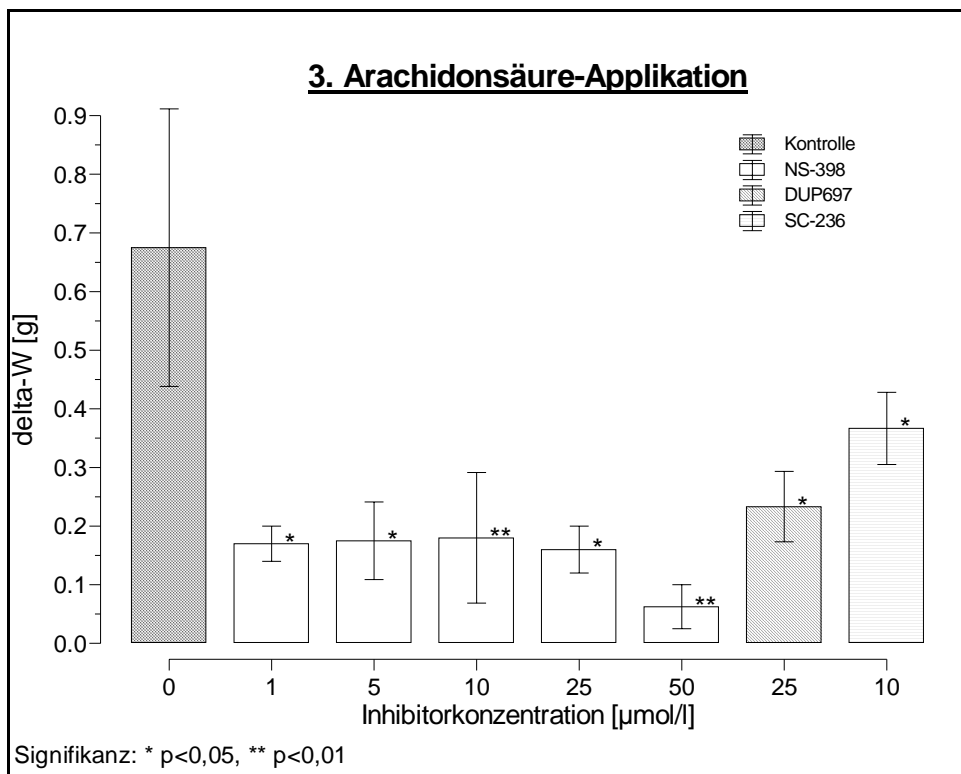


Abbildung 4.6: Gewichts-Änderung bei AA-Appl. zum Zeitpunkt $t = 60\text{min}$

4.3 Versuche mit Angiotensin II und dem Tx-Analogen U46619

Eine Applikation von Angiotensin II, als stärkstem körpereigenen Vasokonstriktor bewirkte eine Erhöhung des pulmonal-arteriellen Drucks, welche ähnlich zu der nach AA-Applikation war. Eine Vorbehandlung mit dem Cox-2 Inhibitor NS-398 verhinderte hier nicht die Druckreaktion auf Angiotensin II (s. Tbl. 4 und Abb. 4.7).

Das Thromboxan-Analogen U46619 wurde zusätzlich noch benutzt, um der AA-Applikation vergleichbare Druckantworten zu erzeugen und die intakte Vasoreaktivität bei gleichzeitigem Vorhandensein von Cox-2-Hemmern zu zeigen (s. Tbl. 4 und Abb. 4.9). Nach Vorbehandlung mit NS-398 wurde die PAP-Erhöhung durch U46619 nicht signifikant reduziert im Vergleich zu Versuchen ohne Cox-2-Inhibitoren. Im Rahmen der AT II-Applikation (s. Tbl 5 und Abb. 4.8) war im Gegensatz zur Applikation von U46619 keine zusätzliche Gewichtseinlagerung zu detektieren. Durch NS-398 Vorbehandlung ließ sich diese Gewichtseinlagerung bei Stimulation mit U46619 nicht signifikant hemmen (s. Tbl. 5 und Abb. 4.10).

Veränderung des pulmonal-arteriellen Drucks (ΔPAP)						
unter Applikation von Arachidonsäure						
Gruppen	1. Appl.		2. Appl.		3. Appl.	
	Δ PAP [mmHg]	SEM	Δ PAP [mmHg]	SEM	Δ PAP [mmHg]	SEM
AT II (30nmol/l)	2,23	0,37	2,20	0,50	3,67	0,87
AT II (30nmol/l) NS-398 (25 μ mol/l)	3,08	0,72	2,38	0,47	2,5	0,81
U46619 (2,5nmol/l)	4,05	1,35	5,68	1,45	6,63	1,18
U46619 (2,5nmol/l) NS-398 (25 μ mol/l)	4,03	0,32	4,83	0,46	4,77	0,45

Tabelle 4: Beobachtung des pulmonal-arteriellen Drucks bei vergleichenden Gruppen von jeweils AT II- sowie U46619-Monoapplikation und jeweils in Kombination mit 25 μ mol/l NS-398: Die statistische Analyse zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen der Gabe mit und ohne Inhibitor.

Veränderung des Gewichts (ΔW) unter Applikation von Arachidonsäure						
Gruppen	1. Appl.	SEM	2. Appl.	SEM	3. Appl.	SEM
	ΔW [g]		ΔW [g]		ΔW [g]	
AT II (30nmol/l)	0,03	0,03	0,00	0,00	0,08	0,08
AT II (30nmol/l) NS-398 (25 μ mol/l)	0,04	0,03	0,03	0,02	0,08	0,04
U46619 (2,5nmol/l)	0,90	0,25	0,91	0,20	0,76	0,14
U46619 (2,5nmol/l) NS-398 (25 μ mol/l)	0,58	0,21	0,59	0,16	0,52	0,14

Tabelle 5: Gewichtsbeobachtung bei vergleichenden Gruppen von jeweils AT II- sowie U46619-Monoapplikation und jeweils in Kombination mit 25 μ mol/l NS-398: Die statistische Analyse zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen der Gabe mit und ohne Inhibitor.

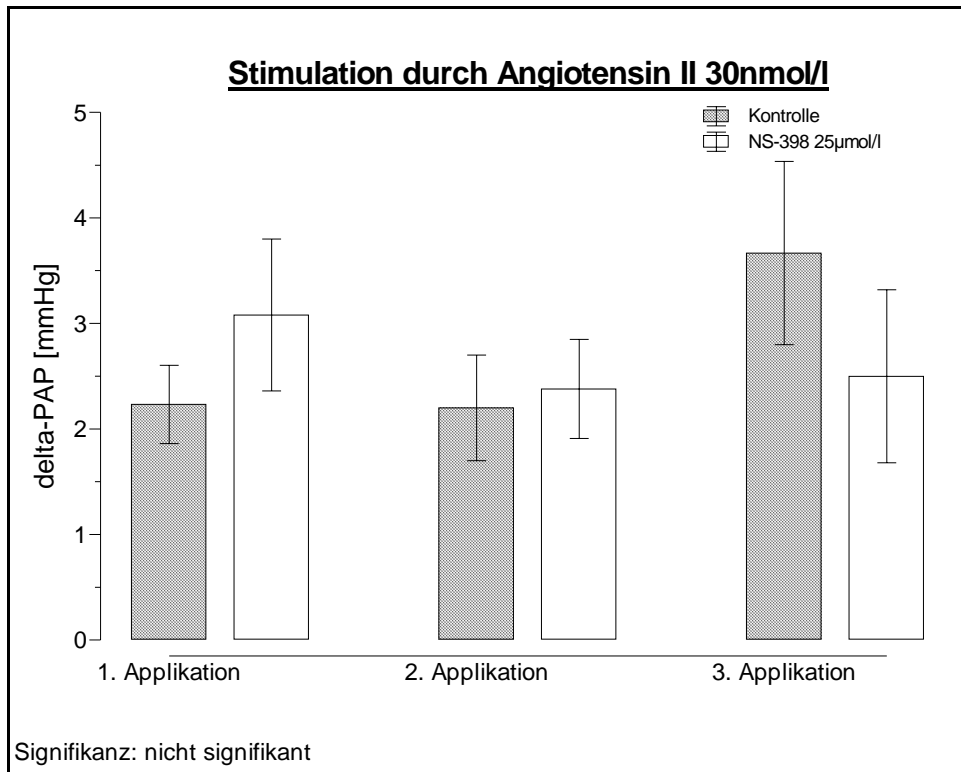


Abbildung 4.7: PAP-Änderung bei Appl. von ATII mit / ohne NS-398

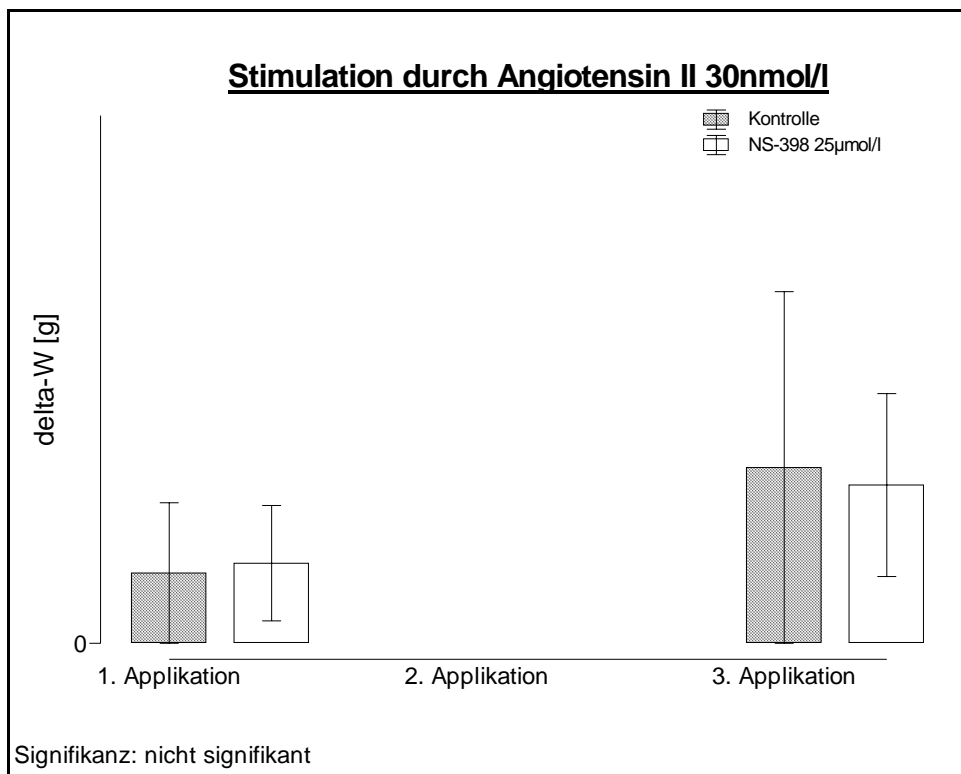


Abbildung 4.8: Gewichts-Änderung bei Appl. von AT II mit / ohne NS-398

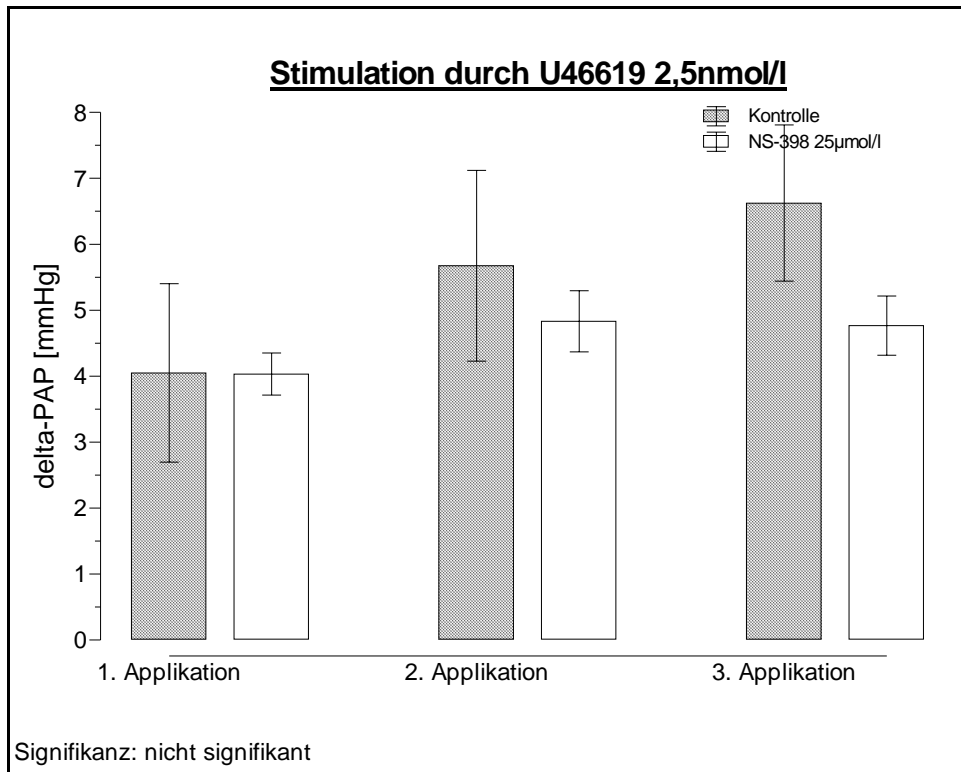


Abbildung 4.9: PAP-Änderung bei Appl. von U46619 mit / ohne NS-398

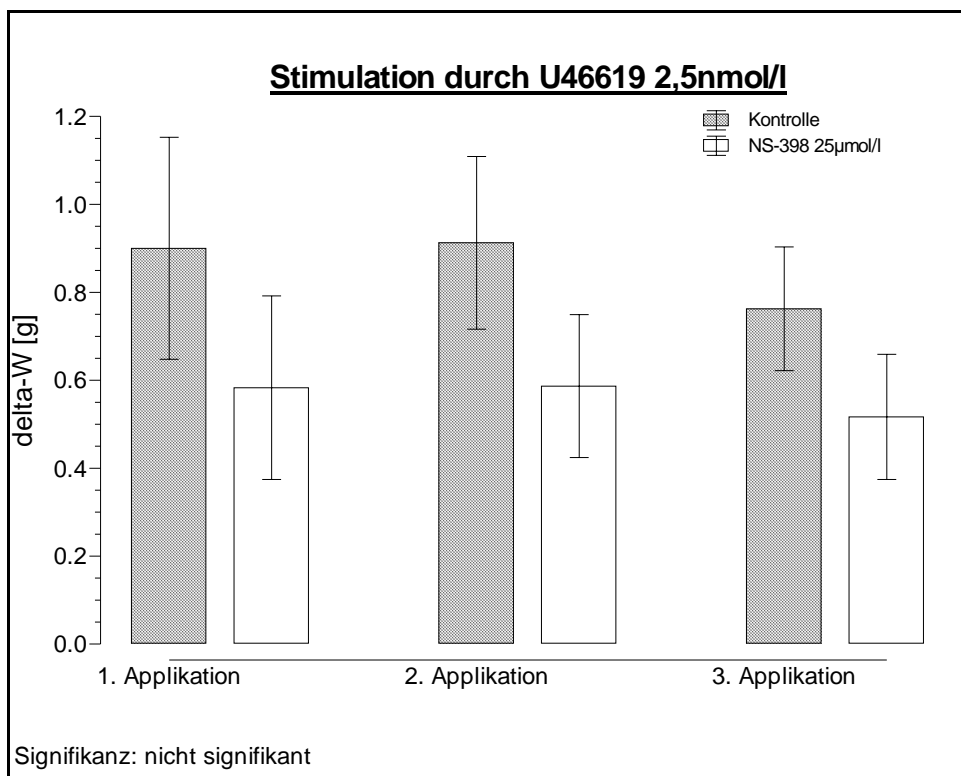


Abbildung 4.10: Gewichts-Änderung bei Appl. von U46619 mit / ohne NS-398

4.4 Versuche nach Priming mit LPS

In einem weiteren Versuchsansatz wurde das Verhalten der Rattenlungen unter einem Priming mit Lipopolysaccharid beobachtet. Nachdem das LPS in das Perfusat appliziert wurde folgte eine Inkubationsphase über 60min. Im Anschluß daran wurde ein AA-Stimulus mit und ohne den Cox-2-Inhibitor NS-398 appliziert.

Der Versuchsreihe voraus ging eine Dosisfindungsuntersuchung zur Ermittlung einer LPS-Dosis, welche genügend Signifikanz gegenüber einer alleinigen Applikation eines AA-Stimulus besitzt (s. Tbl. 6, Abb. 4.11 und Abb. 4.12). Dieses war bei einer Konzentration von 10.000ng/ml LPS mit der Fall ($p < 0,01$), so dass diese Dosis für den eigentlichen Versuch benutzt wurde.

Veränderung des pulmonal-arteriellen Drucks (ΔPAP) und Gewichts (ΔW) unter Applikation von Arachidonsäure					
Gruppe	[ng/ml]	Δ PAP [mmHg]	SEM	Δ W [g]	SEM
Kontrolle	-	3,50	0,76	0,47	0,12
LPS	100	6,43*	1,22	1,48	0,77
	1.000	6,80*	0,35	1,37	0,28
	10.000	9,20**	0,40	4,33	2,74

Tabelle 6: Beobachtung des pulmonal-arteriellen Drucks und des Gewichts bei vergleichenden Gruppen von alleiniger AA-Stimulation in Kombination mit verschiedenen LPS-Dosierungen: Die statistische Signifikanz ist angegeben mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Erwartungsgemäß konnte an der Lunge in Kombination mit LPS die Antwort des pulmonal-arteriellen Drucks auf einen AA-Stimulus erhöht werden. Bereits mit hoher Signifikanz war die Druckantwort einer reinen AA-Stimulation gegenüber der mit LPS vermindert und in der Kombination mit einer Cox-2-Hemmung noch einmal deutlich niedriger (s. Tab 7 und Abb. 4.13). Diese Beobachtung lässt sich ebenfalls auf die Gewichtszunahme des Organs übertragen (s. Abb. 4.14). Mit 0,25g Gewichtszunahme bei Applikation des AA-Stimulus unter Vorbehandlung

Veränderung des pulmonal-arteriellen Drucks (ΔPAP) und Gewichts (ΔW) unter Applikation von Arachidonsäure					
Gruppe	[ng/ml]	Δ PAP [mmHg]	SEM	Δ W [g]	SEM
AA LPS	3 μ mol/l 10.000ng/ml	8,52	0,73	3,64	2,06
AA	3 μ mol/l	4,40***	0,69	0,58***	0,14
AA LPS NS-398	3 μ mol/l 10.000ng/ml 25 μ mol/l	3,38***	0,84	0,25***	0,09
AA NS-398	3 μ mol/l 25 μ mol/l	0,22***	0,02	0,11***	0,03

Tabelle 7: Beobachtung des pulmonal-arteriellen Drucks und des Gewichts bei vergleichenden Gruppen von alleiniger AA-Stimulation in Kombination mit LPS-Priming und Cox-2-Inhibition mit NS-398: Die statistische Signifikanz ist angegeben mit * $p < 0,001$.**

mit LPS und NS-398 sind das gerade einmal 6% der Antwort auf eine Stimulation ohne NS-398.

Somit zeigt sich, dass auch eine durch LPS im Sinne des Primings hochregulierte Expression der induzierbaren Cox-2 suffizient mit einer 25 μ mol/l-Dosis des selektiven Cox-2-Inhibitor NS-398 inhibieren lässt.

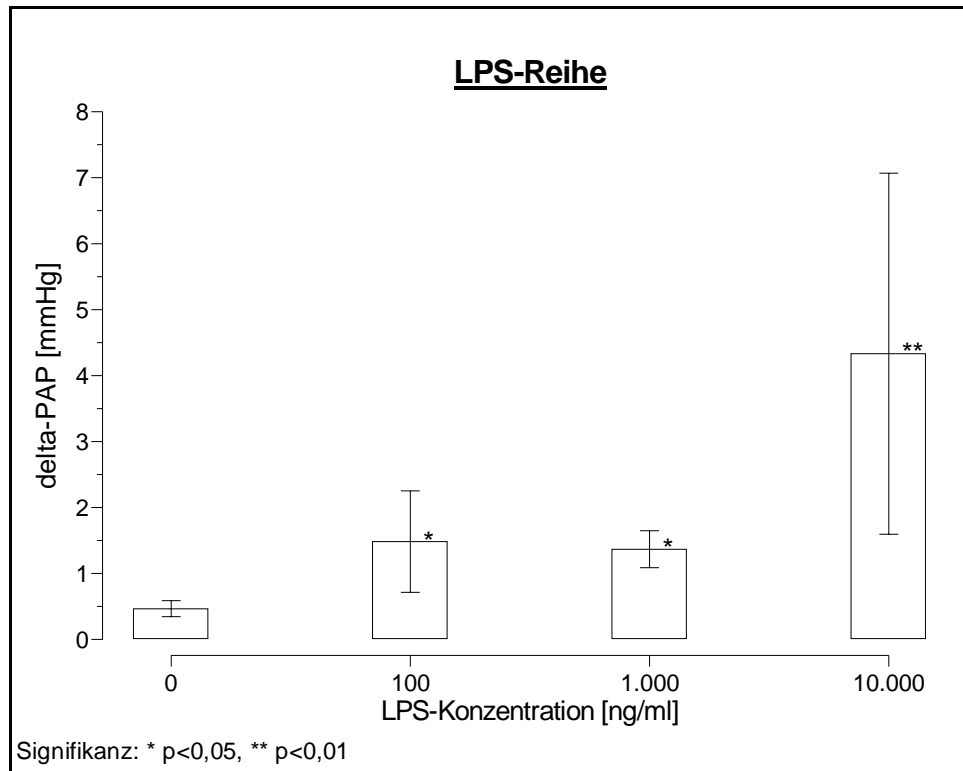


Abbildung 4.11: PAP-Änderung bei AA-Applikation nach Priming mit LPS verschiedener Konzentrationen

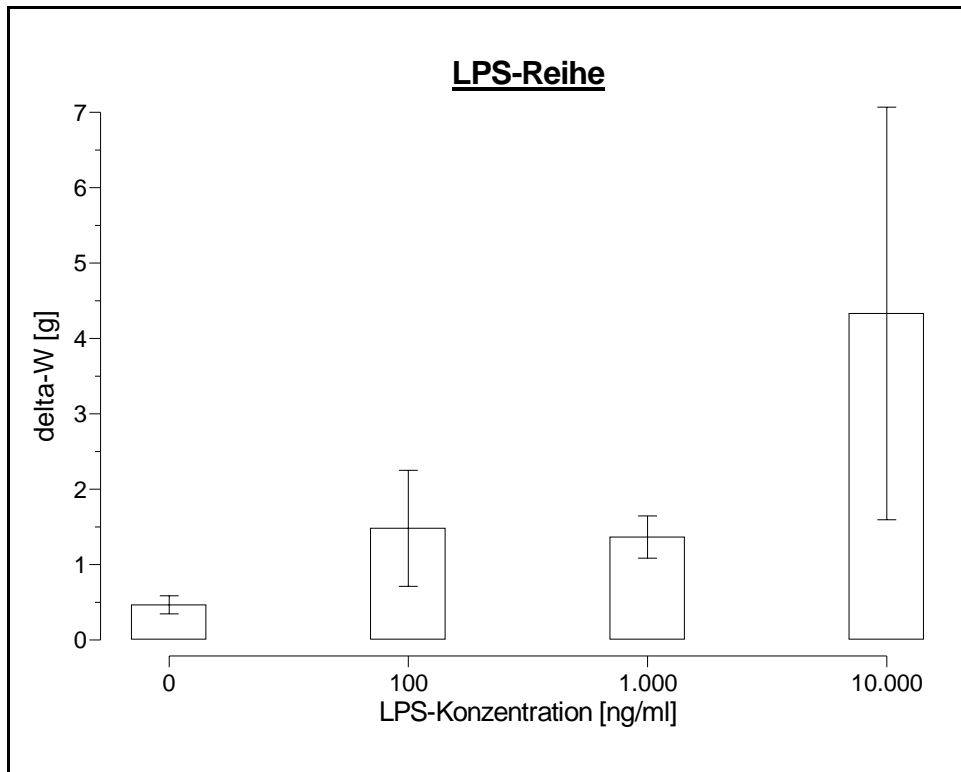


Abbildung 4.12: Gewichts-Änderung bei AA-Stimulation nach Priming mit LPS verschiedener Konzentrationen

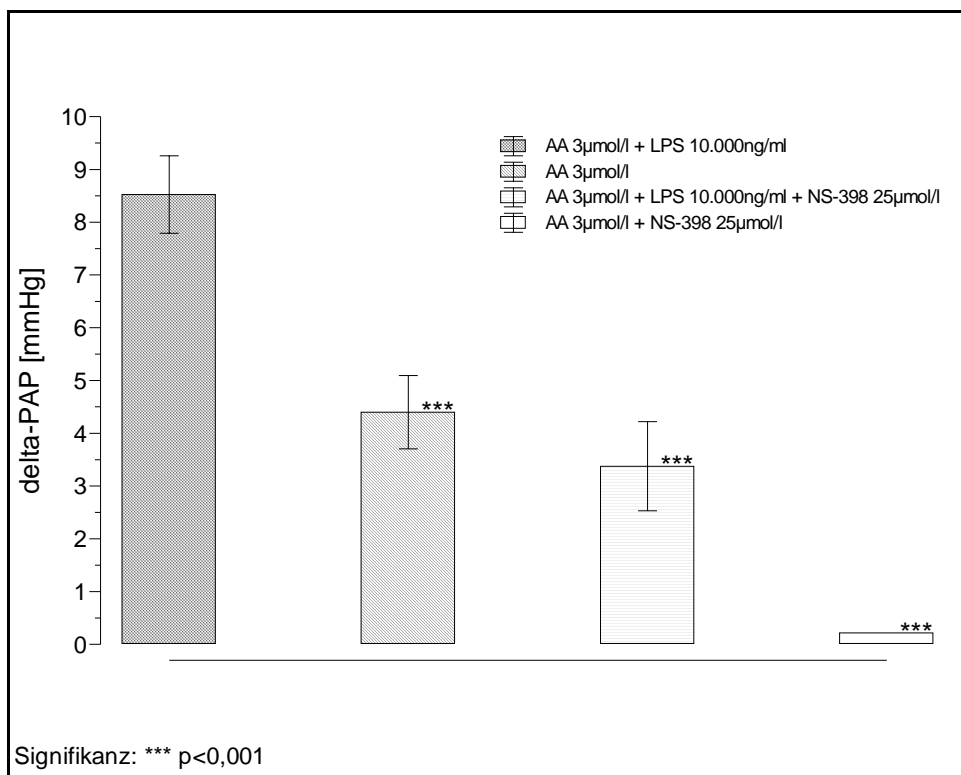


Abbildung 4.13: PAP-Änderung bei AA-Stimulation in Kombination mit LPS-Priming und NS-398-Applikation

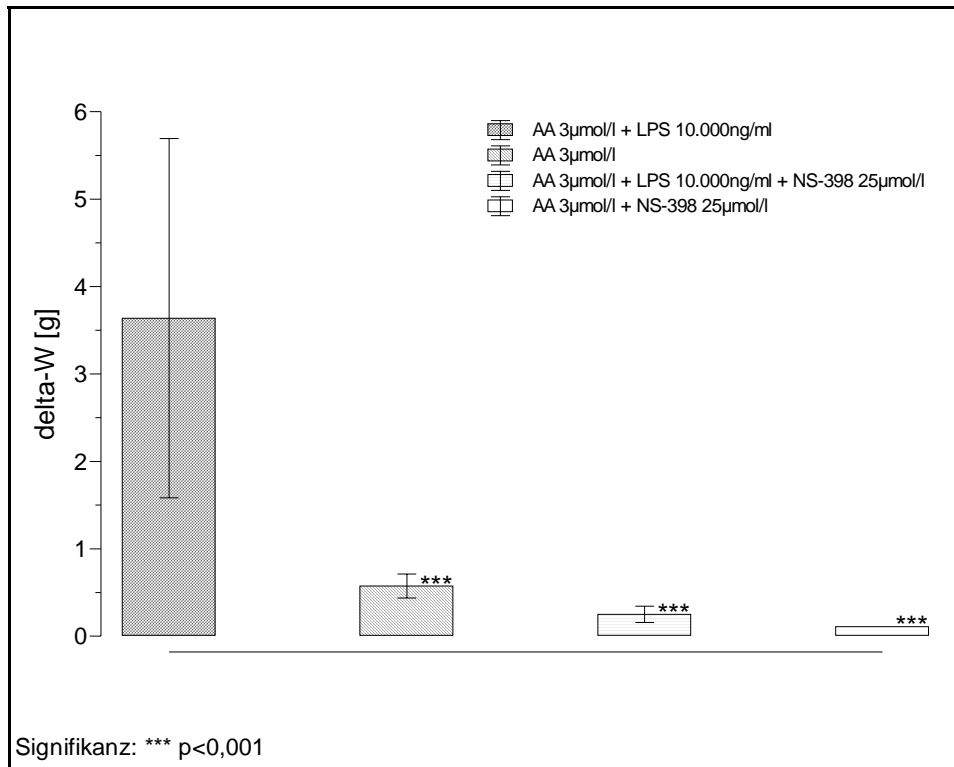


Abbildung 4.14: Gewichts-Änderung bei AA-Stimulation in Kombination mit LPS-Priming und NS-398-Applikation

4.5 Bestimmung der Eicosanoide TxB₂ und 6-keto PGF_{1alpha} aus dem Perfusat der NS-398-Versuchsreihe

Zu definierten Zeitpunkten des Versuchsablauf (0, 2, 5, 10 und 30 Minuten nach AA-Applikation) wurden Proben des rezirkulierenden Perfusats gewonnen, welche mittels eines ELISA-Assays auf ihren Gehalt an Thromboxan B₂ und 6-keto PGF_{1alpha} untersucht wurden. Hierbei handelt es sich um die stabilen Hydrolyseprodukte des Thromboxan A₂ und des Prostacyclins (PGI₂).

Nach Beendigung der Steady State Phase (Minute 0 des Versuchs) konnten nur minimale Mengen TxB₂ und 6-keto PGF_{1alpha} in der Perfusatflüssigkeit detektiert werden (s. Abb. 4.15 und Abb. 4.16). Nach Injektion von Arachidonsäure stiegen die Perfusatspiegel von TxB₂ und 6-keto-PGF_{1alpha} in den Kontrolllungen parallel zur Druckerhöhung an (ohne Cox-Inhibitor).

Die Höhe der TxB_2 - und 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ -Konzentration kehrte nicht zur Baseline zurück, sondern blieb auf einem erhöhten Niveau bis zur zweiten und dritten Bolusinjektion von AA. Diese folgenden Stimulationen führten dann zu einer weiteren Zunahme der TxB_2 - und 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ -Ausschwemmung.

Die TxB_2 - und 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ -Niveaus nach einer ersten Stimulation mit AA wurden durch NS-398 dosisabhängig gehemmt (s. Abb. 4.15 und Abb. 4.16). Eine nahezu komplette Blockierung der Prostaglandin-Ausschwemmung wurde bei gleichzeitiger Gegenwart von 25 respektive $50\mu\text{mol/l}$ NS-398 verzeichnet. Die Zunahme der Prostaglandin-Ausschwemmung auf die folgende zweite und dritte Stimulation mit AA wurde entsprechend gehemmt.

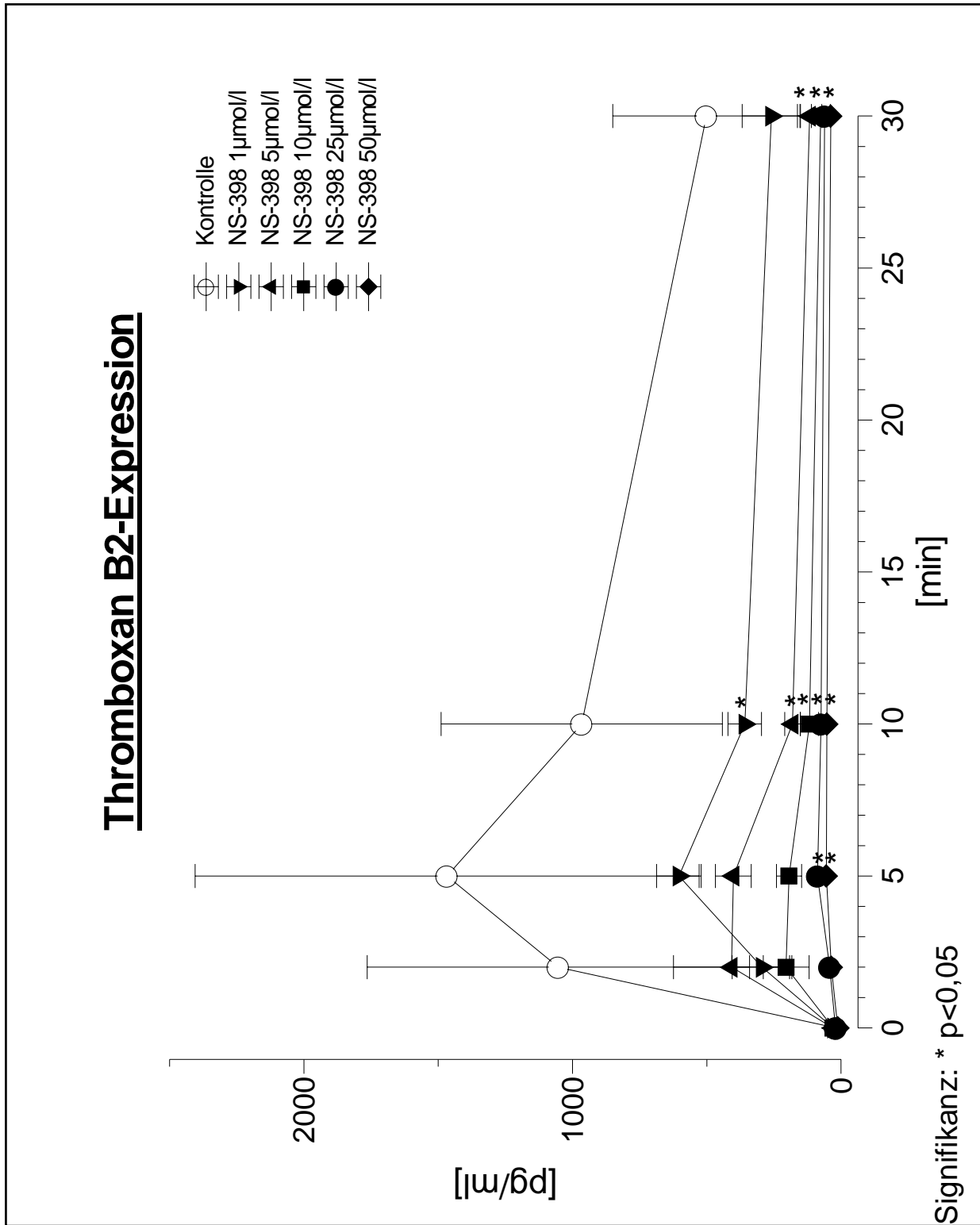


Abbildung 4.15: TxB₂-Expression nach AA-Stimulation unter Cox-2-Inhibition bei verschiedenen Dosierungen von NS-398

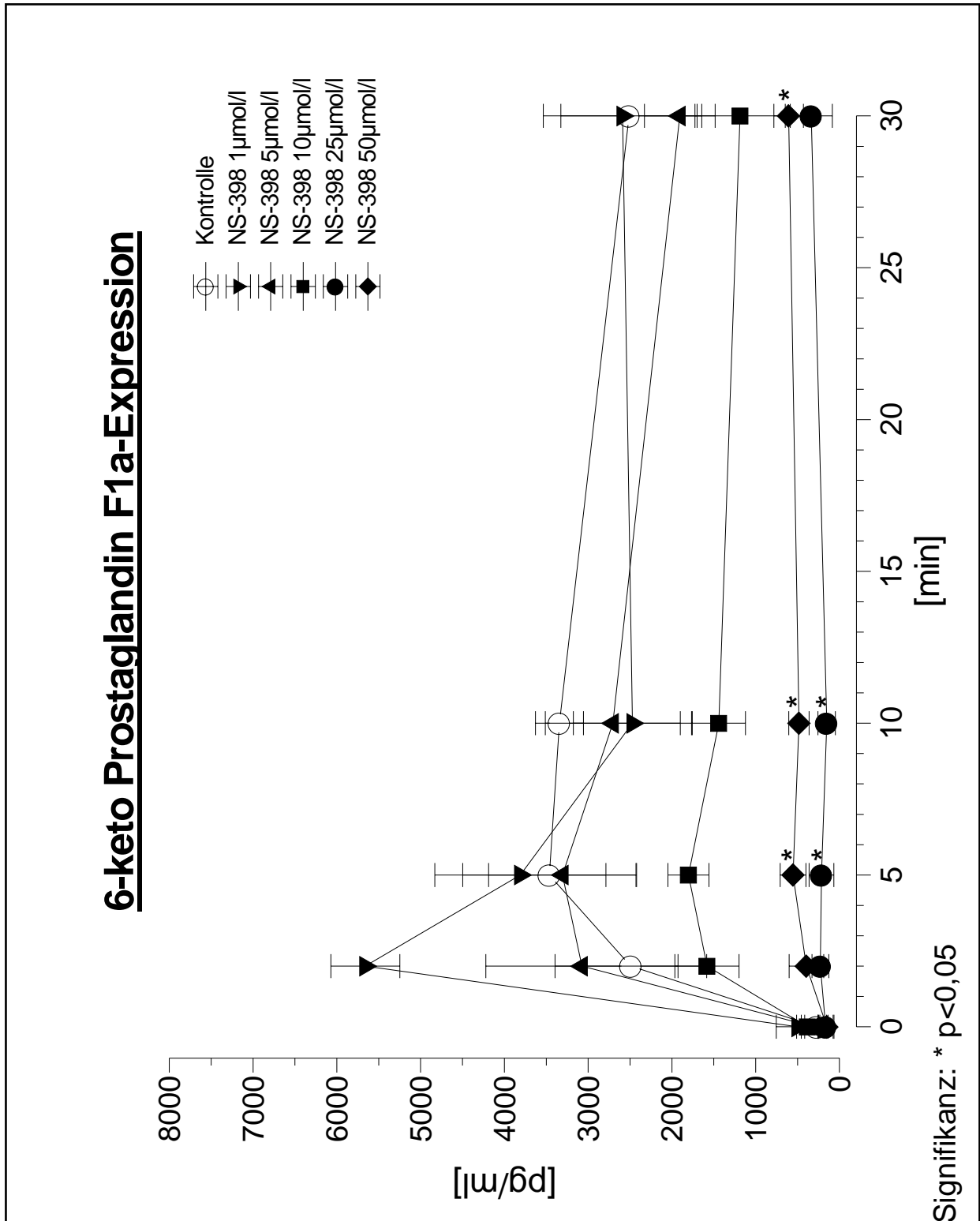


Abbildung 4.16: 6-keto PGF_{1 α} -Expression nach AA-Stimulation unter Cox-2-Inhibition bei verschiedenen Dosierungen von NS-398

5. Diskussion

5.1 Cyclooxygenase-2

Die vorliegende Studie beschäftigte sich mit der Cyclooxygenase-2 in der isoliert perfundierten und ventilierten Rattenlunge. Es sind mittlerweile drei Isoenzyme der Cyclooxygenase (Cox) bekannt. Cox-1 wurde als in vielen Geweben vorkommendes Isoenzym beschrieben (21, 35), wohingegen angenommen wird, daß die Cox-2 in erster Linie unter entzündlichen Bedingungen und dem Einfluss vielfältiger entzündlicher Mediatoren (29, 44, 56) exprimiert wird. In letzter Zeit ist noch ein weiteres Isoenzym, die Cyclooxygenase-3 entdeckt worden. COX-3 mRNA konnte dabei in einer Vielzahl von Geweben bei Kaninchen und im Menschen isoliert werden (9, 45). Seine genauere Rolle bleibt noch weiter zu erforschen.

Von besonderem Interesse der Untersuchungen der Cox-2 in dieser Arbeit waren die physiologischen und pathophysiologischen Reaktionen, welche über diesen Syntheseweg gesteuert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Cox-2 nicht nur im entzündlichen Geschehen sondern auch in der gesunden isolierten Lunge vorhanden und an der Vasoregulation im pulmonalen Strombett deutlich beteiligt ist. Hierzu wurde in verschiedenen Versuchsreihen in perfundierten Rattenlungen die Reaktion des pulmonal arteriellen Drucks und des Lungengewichts auf intravaskuläre Verabreichung von freier Arachidonsäure untersucht. Ferner wurden während der Experimente Perfusatproben, des die Lunge bereits passierten Perfusats, gewonnen und daraus die Ausschwemmung der Prostaglandine (TxA₂, PGI₂) untersucht. Beides sind unmittelbare Metabolite des oben beschriebenen Syntheseweges, die auf die Vasoregulation und Vasopermeabilität des Organs Einfluss nehmen.

Untersucht wurden in den Versuchsreihen dann drei verschiedene selektive Cox-2 Inhibitoren, NS-398 (7, 48), DUP697 (50, 73, 81) und SC-236. Diese inhibierten sowohl die Druckreaktion als auch die Ausschwemmung der Prostaglandine (33, 60).

Im Gegensatz dazu wurden Kontrollversuche mit den vasokonstriktorischen Agenzien Angiotensin II (5, 51, 66, 105) und dem stabilen Thromboxan-Analogen U46619 nicht durch eine Cox-2-Inhibition beeinflusst (15, 62, 74, 95). Diese Daten lassen darauf schließen, dass

die Cox-2 eher als die Cox-1 eine physiologische Rolle in der Prostaglandin bezogenen pulmonalen Vasoregulation spielt.

5.2 Modell der isolierten Lunge

Das benutzte Modell der perfundierten Lunge wurde in vorhergehenden Studien ausführlich untersucht (79). Dieses Modell ist charakterisiert durch konstante physiologische Baseline Werte für den pulmonal arteriellen Druck, keine signifikante Bildung eines Lungenödems über mehrere Stunden und ein exzellentes physiologisches Matching von Ventilation und Perfusion. Diesbezüglich konnte ein normales histologisches Erscheinungsbild nach sogar mehr als zweistündiger extrakorporaler Perfusion verzeichnet werden. Zusammenfassend unterstützen diese Daten die Behauptung, dass die perfundierte Lunge als nicht entzündlich betrachtet werden können.

5.3 Pathophysiologische Beobachtungen

5.3.1 Vasoregulation

Nachdem in Kontrollversuchen keine Änderung des pulmonal-arteriellen Drucks, des Lungengewichts sowie des Beatmungsdrucks registriert werden konnte, zeigte sich nach Applikation von geringen Mengen freier Arachidonsäure eine reproduzierbare reversible Erhöhung des PAPs um ungefähr 4,5mmHg ausgehend von einem durchschnittlichen Basis-PAP von ungefähr 5mmHg.

Das Strombett der Lunge folgt in seiner physiologischen Regulation weitestgehend dem Euler-Liljestrand-Mechanismus auch hypoxische-pulmonale Vasokonstriktion genannt. Dieser Reflex bewirkt, dass besser ventilerte Areale der Lunge auch besser perfundiert werden und somit der Shuntfluss mit nicht ausreichend oxygeniertem Blut möglichst klein

gehalten wird. Gut untersucht sind die Veränderungen dieses Mechanismus in der entzündlichen Situation (102). Es kommt zu einer Fehlverteilung zwischen Ventilation und Perfusion und somit Ansteigen des pulmonalen Shuntflusses. Der Anstieg des PAPs ist aber vermittelt durch Entzündungsmediatoren und hierbei in erster Linie durch die hier untersuchten Produkte des Cox-Syntheseweges. Es konnte in früheren Studien (12, 76, 77) gezeigt werden, dass mediatorvermittelte Anstiege des pulmonal-arteriellen Drucks einer Antwort der teilmuskularisierten Gefäße im pulmonalen Strombett zuzurechnen sind und hierbei insbesondere dem postkapillären Widerstand. Offensichtlich sind pulmonale Venen empfindlicher gegenüber Thromboxanen und Endoperoxidasen als pulmonale Arterien. Letztendlich kann es sein, daß es zu einem Austausch von AA selbst und den nicht stabilen frühen Metaboliten wie zum Beispiel Endoperoxide und Leukotrien A₄ zwischen zirkulierenden Zellen (Thrombozyten, Neutrophilen und Monozyten) und Endothelzellen kommt und somit zu einem weiteren Einfluss des AA-Metabolismus im Gefäßsystem der Lunge kommt (38, 39, 64).

5.3.2 Permeabilitätsveränderungen

Neben der Auslösung einer Vasokonstriktion ist AA dafür bekannt, dass es unabhängig von der Höhe des mikrovaskulären Filtrationsdrucks in verschiedenen Spezies die Lungengefäß-Permeabilität erhöht und es wird angenommen, dass es hierzu über Lipxygenase-Metabolite der AA kommt (40, 58, 77, 88, 96, 103). Es mag sein, dass dieser Effekt der beobachteten durch AA ausgelösten Zunahme an Lungengewicht zugrunde liegt. Als Alternative besteht über den AA induzierten Druckanstieg und vorbeschriebene Miteinbeziehung der postkapillären Gefäße die Möglichkeit, dass es über einen Anstieg des kapillären Filtrationsdrucks zu einer Zunahme der Flüssigkeitsfiltration in die Lunge kommt. Daten von verschiedenen Spezies legen in der Tat die Vermutung nahe, dass die Angriffspunkte des Thromboxans im pulmonalen Strombett in der glatten Muskulatur der kleinen prä- und postkapillären Gefäßen zu sehen sind (37, 88, 104). Diese Rolle der Thromboxan induzierten postkapillären Vasokonstriktion bei der Bildung von Lungenödemen könnte sehr gut die Beobachtung erklären, dass die durch AA ausgelöste Gewichtszunahme dosisabhängig durch Hemmung der Cox-2 gehemmt wird. Darüber hinaus stimmt diese Erklärung überein mit den durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen an

perfundierten Rattenlungen, die ein Vorhandensein von Cox-2 in kleinen teilmuskularisierten prä- und postkapillären Gefäßen zeigen (24). Im Gegensatz dazu wurde Cox-1 überwiegend in den Luftwegen gefunden, wo die Zellen des Bronchialepithels eine hohe Intensität aufwiesen, und zusätzlich in glatten Muskelzellen der großen hilären Venen, nicht aber in kleinen Gefäßen.

5.4 Prostacyclin (PGI₂) und Thromboxan A₂ (TxA₂)

Seit langem ist bekannt, dass in ein gesundes Lungenstrombett applizierte freie Arachidonsäure, in eine Vielzahl von Prostaglandinen metabolisiert wird, überwiegend sind hier PGI₂ und TxA₂ (46, 55, 61, 76, 77, 84) untersucht worden. Bei gesteigerter Verfügbarkeit freier AA, ob aus membranständigen Pools vaskulärer Zellen selbst oder aus dem intravaskulären Lumen her angeboten, kommt es zu einem vasokonstriktiven Ereignis zurückgehend auf die vermehrte Bildung von Thromboxan (41, 77, 82). Obwohl vasokonstriktorische als auch vasodilatierende Prostaglandine gleichzeitig vorkommen, ergibt sich netto ein Druckanstieg durch die hohe vasokonstriktorisches Potenz des TxA₂ (16, 92, 94), die im Vergleich zur vasodilatierenden Kapazität von PGI₂ überwiegt. Wie in den vorliegenden Untersuchungen erneut gezeigt werden konnte, können sequentiell reproduzierbare Stimulationen mit AA durchgeführt werden, mit pulmonal arteriellen Druckerhöhungen, die zwischen den Stimulationen auf Baseline Niveau zurückkehren.

Unter Verwendung der Versuchsreihen, ließen sich mittels ELISA-Technik in der rezirkulierenden Pufferlösung nach vorhergehender AA-Stimulation die stabilen Metabolite TxB₂ und 6-keto PGF_{1alpha} von TxA₂ und PGI₂ nachweisen. In höherer Konzentration war 6-keto PGF_{1alpha} zu detektieren, welches vom pulmonalen Strombett weder aufgenommen noch metabolisiert wird, wie es für TxB₂ der Fall ist, welches im pulmonalen Kreislauf einem erhöhten Metabolismus unterliegt (36, 75, 83); diese weitergehenden Metabolite sind von dem Antikörper des in der vorliegenden Studie verwendeten ELISA nicht erfasst worden.

Im Perfusat der Lungen, die nicht mit einem Bolus freier AA stimuliert wurden, ließ sich auch im ELISA weder 6-keto PGF_{1alpha} noch TxB₂ finden.

5.5 Selektive Inhibition der COX-2

Sämtliche verwendete Cox-2 Inhibitoren, NS-398, DUP697 und SC-236, gehören zu einer neuen Gruppe non-steroidaler Antiphlogistika, welche ihre therapeutische Wirkung über eine Hemmung der Prostaglandin-Synthese über das Cox-2-Isoenzym erzielen (17, 31, 63, 70). Für die bezüglich NS-398 verwendeten Konzentrationen zwischen einem und fünfzig $\mu\text{mol/l}$ konnte eine hohe Selektivität für eine Hemmung der Cox-2 nachgewiesen werden ohne dass diese einen Effekt auf die Aktivität der Cox-1 gehabt hätte (17, 22, 31, 63). Dieses Agens bewirkte eine Hemmung sowohl des pulmonal arteriellen Druckanstieges als auch der Prostaglandinbildung als Antwort auf die intravaskuläre AA-Applikation. Als Reaktion auf die erste AA-Stimulation war eine erfolgreiche Unterdrückung des PAP-Anstieges und Bildung von TxA_2 und PGI_2 mit $25\mu\text{mol/l}$ NS-398 auf weniger als zehn Prozent im Vergleich zu den Versuchen mit Kontrollungen möglich. Die ED50 für beide Ereignisse, Hemmung des Druckanstieges und Prostaglandinsynthese, lag in den Versuchen bei einer Dosierung zwischen einem und fünf $\mu\text{mol/l}$. Im Gegensatz dazu war die vasokonstriktorische Antwort auf Angiotensin II und U46619, welche keine vorausgehende Prostaglandinsynthese benötigt, überhaupt nicht beeinträchtigt. Ähnlich dem NS-398 hat der Cox-2 Inhibitor DUP697 den Druckanstieg auf die erste Stimulation mit AA bei einer Konzentration von $25\mu\text{mol/l}$ auf weniger als zehn Prozent im Vergleich zu den Kontrollversuchen reduziert. Diese Ergebnisse decken sich mit den grundsätzlichen pharmakologischen Daten bezüglich Affinität und Art und Weise der Hemmung der Cox-2 durch NS-398 und DUP697 (17). Darüber hinaus wurden die durch AA hervorgerufene Druckanstiege ebenso durch einen dritten benutzten spezifischen Cox-2 Hemmer, SC-236, unterdrückt und dieses bereits in einer geringen Konzentration von $10\mu\text{mol/l}$. Zusätzlich waren Applikationen höherer Dosierungen von AA nicht in der Lage die Cox-2 Hemmung zu überwinden und führten nicht zu einem Druckanstieg aufgrund einer möglichen Cox-1 Aktivität. Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse keinen Zweifel daran, daß der AA bezogene Druckanstieg in perfundierten Rattenlungen in erster Linie wenn nicht sogar ausschließlich durch die Aktivität der Cox-2 zustande kommt.

Die pulmonale Reaktivität nahm nach einer Latenzzeit wieder zu. Dies war besonders deutlich zwischen der zweiten und dritten Applikation der AA im Gegensatz zu der ersten Stimulation, welches besonders für die mit 25 und $50\mu\text{mol/l}$ hohen Dosierungen von NS-398

offensichtlich war. Diese Beobachtung lässt sich nicht durch eine Zunahme an zirkulierenden AA-Mengen aufgrund der wiederholten Applikation dieser Fettsäure erklären, da der Druckanstieg auf AA ohne Inhibitor absolut stabil war. Da NS-398 dafür bekannt ist, die Cox-2 irreversibel zu hemmen, ohne eine Erholung der Enzymaktivität wegen Beseitigung des Medikaments (17), können diese Ergebnisse auf eine De-novo Synthese von Cox-2 im Intervall zwischen der ersten, zweiten und dritten Applikation von AA hinweisen (68). Obwohl der Cox-2 Inhibitor im Perfusat vorhanden war, wurde er nur einmal appliziert und war eventuell nicht in der Lage, die gesamte neu gebildete Cox-2 zu inhibieren. Durch immunhistochemische Untersuchungen konnte kürzlich gezeigt werden, dass sich große Mengen an Cox-2 in Rattenlungen nachweisen lassen, besonders in den teilmuskularisierten Gefäßen (24). Entsprechende Beweise für eine schnelle De-novo Synthese von Cox-2 wurden kürzlich in kultivierten humanen bronchialen Zellen glatter Muskulatur *in vitro* erzielt (93) als auch in isoliert perfundierten Rattenlungen, die mit LPS stimuliert wurden (25).

5.6 Vorversuche mit Lipopolysaccharid

In einem weiteren Vorversuchsansatz wurde das Verhalten der Rattenlungen unter einem Priming mit Lipopolysaccharid beobachtet. Nach einer initialen Inkubationszeit von 10.000ng/ml LPS zeigten die Lungen auf einen 3 μ mol/l AA-Stimulus hin eine gegenüber der unstimulierten Lunge ungefähr doppelt so hohe Druckantwort. Die korrespondierende Gewichtseinlagerung war sechsmal so hoch wie in den Versuchen ohne LPS.

Auch hier ließ sich mit einer Dosis von 25 μ mol/l NS-398 erfolgreich der Druck- und Gewichtsanstieg auf einen AA-Stimulus signifikant hemmen. Es zeigt sich, dass auch eine durch LPS im Sinne des Primings hochregulierte Expression der induzierbaren Cox-2 (59) suffizient die pathophysiologischen Antworten des Organs mit einer 25 μ mol/l-Dosis des selektiven Cox-2-Inhibitor NS-398 inhibieren lassen.

Die Mechanismen der Cox-2-vermittelten LPS-induzierten pathophysiologischen Reaktionen und Metaboliten wurden in einer weiteren Studie im Detail untersucht und publiziert (26).

5.7 Immunlokalisation der Cox-2

Dass die Reaktivität des pulmonalen Strombetts unter entzündlichen Bedingungen zunimmt, ist inzwischen vielfach untersucht. Dabei zeigt sich sowohl ein deutliches Ventilations-Perfusions-Mismatch im Sinne eines gestörten Euler-Liljestrand-Mechanismus (97, 98) als auch eine dramatische Zunahme der Vasokonstriktion und entsprechendem Anstieg des pulmonal-arteriellen Drucks auf eine Stimulation mit bakteriellen Exotoxinen wie zum Beispiel AA. Dieses Phänomen ist in erheblichem Maße einer deutlichen Zunahme der Thromboxan-Synthese zuzuschreiben (20, 87). Aus diesem Grund sind zwischenzeitlich immunhistologische Untersuchungen durchgeführt worden, die die Hochregulation der Cox-2 und Thromboxan-Synthase in Lungen verschiedener Tiermodelle nach Priming mit Lipopolysaccharid aufzeigten (23, 25). In Rattenlungen ließ sich diese vermehrte Expression in glatten Muskelzellen sowohl großer Arterien, aber auch insbesondere in den Muskelzellen der kleineren teilmuskularisierten Arterien nachweisen, von denen bekannt ist, dass sie eine relevante Rolle bei der Regulation des pulmonal-arteriellen Drucks spielen. Im Gegensatz dazu war die Expression der Cox-1, die vorwiegend in den Endothelzellen stattfindet, in diesen Untersuchungen unverändert (26). Entsprechend nahm die Cox-2- aber nicht die Cox-1-Expression in Lungen, die zuvor zwei Stunden lang mit LPS inkubiert wurden, deutlich zu. Die Beobachtung, dass die PGI₂-Bildung in der LPS-geprimten-Lunge durch selektive Cox-2-Inhibition nicht unterdrückt wird, legt die Vermutung nahe, dass dessen Synthese in erster Linie über die Cox-1 erfolgt (20, 25).

5.8 Klinische Anwendung der Cox-2-Hemmer

In den letzten Jahren haben nun einige Cox-2-Hemmer den Einzug in den klinischen Alltag gefunden. Der Vorteil der selektiven Cox-2-Hemmer gegenüber den unselektiven Cox-Hemmern liegt dabei in einer Vermeidung der nicht erwünschten Nebenwirkungen einer Hemmung der Cox-1. Dies sind in erster Linie die Aggravierung einer vorbestehenden Niereninsuffizienz und die Bildung von gastralen Ulzerationen bis hin zu schweren gastralen Blutungen oder Organperforationen mit entsprechender konsekutiver Mortalität.

Meloxicam war der erste Wirkstoff mit stark selektiver Inhibition der Cox-2 welches für den klinischen Gebrauch Ende der 1990er Jahre zugelassen und vertrieben wurde. Es folgten dann die Wirkstoffe Rofecoxib, Etoricoxib, Celecoxib, Parecoxib, Valdecoxib, Lumiracoxib und andere. All diese wurden unter der Gruppe der Coxibe subsummiert, ein Name der aus dem Zielenzym abgeleitet wurde. Ihre Gemeinsamkeit war eine selektive Inhibition der Cyclooxygenase-2.

Im September 2004 wurde dann das Präparat Vioxx® mit dem Inhaltsstoff Rofecoxib durch die vertreibende Firma wieder vom Markt genommen, nachdem neue Studiendaten durch eine Langzeitstudie vorlagen, die bisher nicht beachtete Nebenwirkungen als schwerwiegend einstufte. In der APPROVe Studie wurden Patienten mit einem colorektalen Adenom doppel-blind mit peroralen 25mg Rofecoxib oder Placebo über einen Zeitraum von 36 Monaten therapiert. In der Verum-Gruppe kam es zu einem Risiko thrombembolischer Ereignisse von 3,5% der Behandelten und damit ungefähr doppelter Häufigkeit zur Placebo-Gruppe (10). Entsprechend zum Ausdruck kam dieses durch die Anzahl der Myokardinfarkte und Apoplexies. Das von einem anderen Hersteller vertriebene Valdecoxib wurde im April 2005 vom Markt genommen, da es zwar selten, aber doch zu schweren, teilweise lebensbedrohlichen Hautreaktionen kam (13). Zu den traditionellen non-steroidalen Antirheumatika wie zum Beispiel Diclofenac lagen bis vor kurzem keine Langzeitstudien vor. Die MEDAL-Studie verglich daher zwei Gruppen, die entweder Etoricoxib oder Diclofenac erhielten. In Bezug auf die primären Endpunkte thrombembolische oder kardiovaskuläre Ereignisse konnte zwischen beiden Gruppen kein Unterschied festgestellt werden (11). Trotz dieser Nebenwirkungen haben die Coxibe inzwischen ihren festen Stellenwert in der Therapie der Erkrankungen aus dem rheumatologischen Formenkreis. Nach Neubewertung der Coxibe durch die Food and Drug Administration (USA) und das European Medical Agency (Europa) als Zulassungsbehörden gelten für alle Substanzen der Gruppe nun folgende Anwendungsausschlüsse: Herzinsuffizienz nach NYHA II-IV, klinisch gesicherte koronare Herzkrankheit und zerebrovaskuläre Erkrankungen.

5.9 Fazit

In vorhergehenden Untersuchungen wurde an verschiedenen Gefäßtypen unterschiedlicher Organe bewiesen, dass inflammatorische Stimuli an Zellen der glatten Muskulatur eine Bildung von Cox-2 induzieren (18, 29, 72). Einhergehend mit dem immunhistochemischen Nachweis von Cox-2 in den glatten Muskelzellen der kleinen Gefäße von nicht entzündlich veränderten Lungen (24), unterstützt die vorliegende Arbeit die Vorstellung, dass Cox-2 beständig im Lungengefäßsystem gebildet wird. Ferner lässt die hohe inhibitorische Wirksamkeit der verschiedenen Cox-2 Inhibitoren darauf schließen, dass die durch Prostaglandine ausgelöste pulmonale Vasomotion auf diesem enzymatischen Wege entstehen. Die Prostaglandine, die sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen an der Vasoregulation beteiligt sind, entstehen nahezu ausschließlich über diesen Pfad der Cyclooxygenase in der Rattenlunge. Dem Wissen nach ist eine solche fundamentale Rolle der Cox-2 in der physiologischen Vasoregulation bislang noch nicht beschrieben worden. Diese Ergebnisse erinnern an die Beobachtung, dass Cox-2 grundlegend konstitutiv respektive physiologisch im Rattenmagen (47) und der Niere (42) gebildet wird, welche von Bedeutung für die physiologische Zytprotektion der gastralen Mukosa und der Nierenfunktion ist.

Zusätzlich zur Erweiterung unseres Wissens über die physiologische Bedeutung der Cox-2 sind diese Ergebnisse möglicherweise entscheidend für die Entwicklung weiterer Medikamente. Die Cox-2 spezifischen non-steroidalen Antiphlogistika wurden entwickelt, um Entzündungen zu hemmen ohne die physiologische Prostaglandinsynthese zu hemmen, zur Vermeidung von Nebenwirkungen beim Gebrauch von nicht-selektiven Antiphlogistika (31, 54, 63). Zumindest für das Gefäßbett der Rattenlungen waren diese Erwartungen offensichtlich nicht echt, obwohl Störungen in der grundlegenden Vasoregulation durch Hemmung der Cox-2 Aktivität noch abzuwarten bleiben.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit stand unter der Zielsetzung, die Bedeutung und Funktion der Cyclooxygenase-2 in der Vasoregulation des nicht-entzündlichen Lungenmodells zu untersuchen. Als Stimulus des enzymatischen Weges wurde Arachidonsäure gewählt, welche in einem Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Rattenlunge eingesetzt wurde. Von besonderem Interesse war dabei die Hemmung der Cyclooxygenase-2 durch verschiedene selektive Inhibitoren.

Die untersuchte Hypothese war, dass sich der Anstieg des PAP und die Permeabilitätsstörung in der entzündlichen Lunge durch selektive Inhibition der konstitutiven und induzierbaren Cox-2 verhindern lässt.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Versuche durchgeführt, in denen die isolierten Lungen mit den drei Cox-2-Inhibitoren NS-398, DUP697 und SC-236 in unterschiedlicher Konzentration vorbehandelt wurden. Nach kurzer Inkubationszeit des jeweiligen Inhibitors wurden dann in 30minütigen Zeitabständen dreimal Arachidonsäure appliziert. Während des Versuchs erfolgte die Online-Registrierung des pulmonal-arteriellen Drucks, des Ventilationsdrucks und des Lungengewichts. Durch ELISA-Messungen wurden in Bezug auf einen der Inhibitoren in zeitlich versetzten Perfusatproben die Konzentrationen der am Entzündungsprozess beteiligten Eicosanoide TxB_2 und 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ bestimmt.

In den Kontrollversuchen führte die Gabe von AA zu einem Ansteigen des pulmonal-arteriellen Drucks sowie zu einer Zunahme des Lungengewichts. Analog zu diesen physiologisch messbaren Reaktionen konnte ein deutlicher Anstieg von TxB_2 und 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ als stabile Hydrolyseprodukte von TxA_2 und PGI_2 im Perfusat gemessen werden.

Unter Vorbehandlung der Lungen mit den Cox-2-Inhibitoren kam es dosisabhängig nach der Applikation von AA zu einer signifikant verminderten Reaktion des PAP und des Lungengewichts. Ebenso vermindert war dabei die Liberation von TxB_2 und 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$.

Weitere Kontrollversuche wurden mit Angiotensin II und dem Thromboxanalogon U46619 mit und ohne Cox-2-Inhibitor durchgeführt. Es zeigte sich hierunter keine Hemmbarkeit der

physiologischen Reaktion des pulmonalen Drucks und Gewichts auf die jeweilige Stimulierung. Damit konnte nachgewiesen werden, dass auch unter Inhibition der Cox-2 durch die genannten Cox-2-Inhibitoren die Reagibilität der Muskelzellen im Stromgebiet der Lunge noch intakt waren. Eine zusätzliche Kontrolle erfolgte mit der unselektiven Cox-Inhibition durch Acetylsalicylsäure. Ähnlich der dosisabhängigen alleinigen Cox-2-Hemmung ließen sich die physiologischen Reaktionen auf AA-Gabe dabei komplett verhindern. Daher erklärt sich die alleinige Verantwortung der Cox-2 auch für die physiologische Vasoregulation und Permeabilitätssteuerung der pulmonalen Gefäße über Thromboxan.

Ein weiteres Ziel war es zu zeigen, dass es neben einer konstitutiven Expression der Cox-2 im physiologischen Modell zu einer Hochregulation dieser Expression in der entzündlichen Situation der Lunge kommt. Dieses wurde im Folgenden bewiesen.

Als Vorversuche für weitere Studien wurde daher zusätzlich zu den gezeigten Untersuchungen eine Versuchsreihe durchgeführt, in welcher die isolierten Rattenlungen vor einem entzündlichen Stimulus zunächst über einen Zeitraum von 60 Minuten mit Lipopolysaccharid geprimt wurden. Im Ergebnis ließ sich eine vielfach höhere Antwort des pulmonal-arteriellen Drucks und der Gewichtszunahme zu den nicht geprimten Lungen zeigen. Auch diese Reaktionen waren mit Hilfe des Cox-2-Inhibitors NS-398 völlig zu unterdrücken.

Die Ergebnisse der Arbeit liefern wichtige Erkenntnisse für das Verständnis pathophysiologischer Vorgänge bei entzündlichen Prozessen bis hin zum ARDS.

7. Conclusion

The aim of the present study was to investigate the importance and function of the Cyclooxygenase-2 within the vasoregulation of the non-inflamed model of the lung. The enzymatic pathway was stimulated by arachidonic acid in an isolated perfused and ventilated rat lung-model. Within this study the inhibition of the Cox-2 by different selective inhibitors was the main point of interest.

The underlying hypothesis was to prevent pulmonary-artery-constriction and increasing permeability in the inflamed lung by selective inhibition of the constitutive and inducible Cox-2.

To prove this hypothesis three different Cox-2-inhibitors NS-398, DUP697 and SC-236 were added to the recirculating perfusate in different concentrations. After a short while of incubation of the respective inhibitor within the circulatory system the lung was challenged by arachidonic acid for three times with a timegap of 30 minutes. During the test online-registrations of the pulmonary-artery pressure, the ventilation pressure and weight-increase of the organ were performed. In regard to one of the inhibitors the concentration of the eicosanoides TxB_2 and 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ was determined by an ELISA-assay from the perfusate.

In control-experiments the AA-challenge led to an elevated PAP and increased lung-weight. According to the physiological findings a proportional significant increase of TxB_2 and 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ as stable hydrolysis-products of TxA_2 and PGI_2 could be detected within the perfusate. By preparing the lungs with the Cox-2-inhibitors a dose-dependent decreased reaction of PAP and lung-weight could be observed after each AA-challenge. As well a decreased liberation of TxB_2 and 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ could be observed.

There were further control-tests performed with the vaso-constrictor Angiotensin II and the Thromboxane-Analogue U46619 with and without additional administration of a Cox-2-inhibitor.

No inhibition of the physiological reaction of the pulmonary-artery-pressure or the lung-weight could be detected by these stimuli. These findings are proving the hypothesis of intact reactivity of smooth muscle cells within the pulmonary-vessel-system also under inhibition of the Cox-2 by the above mentioned selective Cox-2-inhibitors.

Further controls by unselective inhibition of the Cox-2 by Acetylsalicylate were also performed. Similar to the dose-dependent selective inhibition physiological reactions to the AA-challenge could be prevented. By this the responsibility of Cox-2 for the physiological vasoregulation and permeability of pulmonary vessels to Thromboxane is explained.

Another aim was to point out that there is apart from the constitutive expression of Cox-2 in the physiological model an upregulation of this expression under septic conditions within the lung. This has been proven by the following experiments.

As pre-testings for another study additionally to the above mentioned tests the isolated ratlungs were primed by Lipopolysaccharide for 60 minutes. Consecutive they were also challenged by AA-stimulus. As result a many times higher response of the PAP and of the lungweight-increase could be observed in comparison to the non-primed lungs. Again these responses could be inhibited by the administration of the Cox-2-inhibitor NS-398.

The result of this study are giving important knowledge for the understanding of pathophysiological processes in inflammatory situations up to ARDS.

8. Literaturverzeichnis

- 1 Amann, R., Schuligoi, R. and Peskar B.A. Eicosanoid release in the endotoxin-primed isolated rat lung and its pharmacological modification. *Inflamm. Res.*;48(12):632-6, 1999.
- 2 Amann, R., Schuligoi, R. and Peskar, B.A. Effects of Cox-1 and Cox-2 inhibitors on eicosanoid biosynthesis and the release of substance P from the guinea-pig isolated perfused lung. *Inflamm. Res.*;50(1):50-3, 2001.
- 3 Bals, R., Vogelmeier, C. and Siegenthaler, W. *Klinische Pathophysiologie*, 9. Auflage, Thieme Verlag;767-9, 2006.
- 4 Baber, S.R., Champion, H.C., Bivalacqua, T.J., Hyman, A.L. and Kadowitz, P.J. Role of cyclooxygenase-2 in the generation of vasoactive prostanoids in the rat pulmonary and systemic vascular beds. *Circulation*;108(7):896-901, 2003.
- 5 Baudouin, S.V. and Messent, M. Effect of intralipid on hypoxic and angiotensin-II induced pulmonary vasoconstriction in the isolated rat lung. *Crit. Care Med.*;22(12):1964-8, 1994.
- 6 Barnard, J.W., Ward, R.A. and Taylor, A.E. Evaluation of prostaglandin F2a and prostacyclin interactions in the isolated perfused rat lung. *J. Appl. Physiol.*;72(6):2469-74, 1992.
- 7 Barnett, J., Chow, J. and Ives, D. Purification, characterization and selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase 1 and 2 expressed in the baculovirus system. *Biochem. Biophys. Acta*;1209:130-9, 1994.

- 8 Bernard, G.R., Artigas, A., Brigham, K.L., Carlet, J., Falke, K., Hudson, L., Lamy, M., Legall, J.R., Morris, A. and Spragg, R. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, Mechanisms, relevant Outcomes and Clinical Trial Coordination. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*;149(3 Pt !):818-24, 1994.
- 9 Botting, R.M. Inhibitors of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses. *J. Physiol. Pharmacol.*;57 Suppl 5:113-24, 2006.
- 10 Bresalier, R.S., Sandler, R.S., Quan, H., Bolognese, J.A., Oxenius, B., Horgan, K., Lines, C., Riddell, R., Morton, D., Lanas, A., Konstam, M.A. and Baron, J.A.; Adenomatous Polyp Prevention on Vioxx (APPROVe) Trial Investigators. Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N. Engl. J. Med.*;352(11):1092-102, 2005.
- 11 Cannon, C.P., Curtis, S.P., FitzGerald, G.A., Krum, H., Kaur, A., Bolognese, J.A., Reicin, A.S., Bombardier, C., Weinblatt, M.E., van der Heijde, D., Erdmann, E. and Laine, L. MEDAL Steering Committee. Cardiovascular outcomes with etoricoxib and diclofenac in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis in the Multinational Etoricoxib and Diclofenac Arthritis Long-term (MEDAL) programme: a randomised comparison. *Lancet*;368(9549):1771-81, 2006.
- 12 Chang, S.-W., Czartolomna, J. and Voelkel, N.F. Role of eicosanoids in staphylococcal a-toxin-induced lung injury in the rat. *Am. J. Physiol.*;262(4 Pt 1):L502-10, 1992.
- 13 Chavez, M.L., DeKorte, C.J. Valdecoxib: a review. *Clin Ther.*;25(3):817-51, 2003.
- 14 Christman, B.W., McPherson, C.D., Newman, J.H., King, G.A., Bernard, G.R., Groves, B.M. and Loyd, J.E. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N. Engl. J. Med.*;327(2):70-5, 1992.

- 15 Conhaim, R.L., Watson, K.E., Heisey, D.M., Levenson, G.E. and Harms, B.A. Thromboxane receptor analog, U46619, redistributes pulmonary microvascular perfusion in isolated rat lungs. *J. Appl. Physiol.*;96(1):245-52, 2004.
- 16 Cope, D.K., Grimbert, F., Downey, J.M. and Taylor, A.E. Pulmonary capillary pressure: A review. *Crit. Care Med.*;20:1043-56, 1992.
- 17 Copeland, R.A., Williams, J.M., Giannaras, J., Nurnberg, S., Covington, M., Pinto, D., Pick, S. and Trzaskos, J.M. Mechanism of selective inhibition of the inducible isoform of prostaglandin G/H synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* ;91:11202-11206, 1994.
- 18 Coroneos, E., Kester, M., Thomas, P. and Dunn, M.J. Endothelin regulates PGE₂ formation in rat mesangial cells through induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.*;23:117-119, 1995.
- 19 Crofford, L.J. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J. Rheumatol.*;24, Suppl. 49:15-19, 1997.
- 20 Delong, P., O'Sullivan, M.G., Huggins, E., Hubbard, C.L. and McCall, C. Bacterial lipopolysaccharide induction of the prostaglandin G/H synthase 2 gene causes thromboxane-dependent pulmonary hypertension in rabbits. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*;20:493-499, 1999.
- 21 DeWitt, D.L. Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression. *Biochem. Biophys. Acta*;1083:121-134, 1991.
- 22 Endo, T., Ogushi, F., Sone, S., Ogura, T., Taketani, Y., Hayashi, Y., Ueda, N. and Yamamoto, S. Induction of cyclooxygenase-2 is responsible for interleukin-1 β -dependent prostaglandin E₂ synthesis by human lung fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*;12:358-365, 1995.

- 23 Ermert, L., Ermert, M., Duncker, H.-R., Grimminger, F. and Seeger, W. In situ localization and regulation of thromboxane A2 synthase in normal and LPS-primed lungs. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*;278:L744-L753, 2000
- 24 Ermert, L., Ermert, M., Goppelt-Struebe, M., Walmrath, D., Grimminger, F., Steudel, W., Ghofrani, H.A., Homberger, C., Duncker, H.-R. and W. Seeger. Cyclooxygenase isoenzyme localization and mRNA expression in rat lungs. *Am. J. Respir. Cell Biol.*;18:479-488, 1998.
- 25 Ermert, L., Ermert, M., Merkle, M., Goppelt-Struebe, M., Duncker, H.-R., Grimminger, F. and Seeger, W. Rat-pulmonary cyclooxygenase-2 expression in response to endotoxin challenge: differential regulation in the various types of cells in the lung. *Am. J. Pathol.*;156:1275-87, 2000.
- 26 Ermert, M., Merkle, M., Mootz, R., Grimminger, F., Seeger, W., Ermert, L. Endotoxin priming of the cyclooxygenase-2-thromboxane axis in isolated rat lungs. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*;278(6):L1195-203, 2000.
- 27 Ermert, M., Ruppert, C., Günther, A., Duncker, H.-R., Seeger, W. and Ermert, L. Cell-specific nitric oxide synthase-isoenzyme expression and regulation in response to endotoxin in intact rat lungs. *Lab. Invest.*;82:425-21, 2002.
- 28 Feddersen, C.O., Chang, S., Czartolomna, J. and Voelkel, N.F. Arachidonic acid causes cyclooxygenase-dependent and -independent pulmonary vasodilation. *J. Appl. Physiol.*;68(5):1799-808, 1990.
- 29 Feng, L., Sun, W., Xia, Y., Tang, W.W., Chanmugam, P., Soyoola, E., Wilson, C.B. and Hwang, D. Cloning isoforms of rat cyclooxygenase: differential regulation of their expression. *Arch. Biochem. Biophys.*;307:361-368, 1993.

- 30 Fukunaga, K., Kohli, P., Bonnans, C., Fredenburgh, L.E. and Levy, B.D. Cyclooxygenase 2 plays a pivotal role in the resolution of acute lung injury. *J. Immunol.*;174(8):5033-9, 2005.
- 31 Futaki, N., Takahashi, S., Yokoyama, M., Arai, I., Higushi, S. and Otomo, S. NS-398, a new anti-inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase / cyclooxygenase (Cox-2) activity in vitro. *Prostaglandins*;47:55-59, 1994.
- 32 Gierse, J.K., Hauser, S.D., Creely, D.P., Koboldt, C., Rangwala, S.H. and Isakson, P.C. Expression and selective inhibition of the constitutive and inducible forms of human cyclooxygenase. *Biochem. J.*;305:479-84, 1995.
- 33 Gierse, J.K., McDonald, J.J., Hauser, S.D., Rangwala, S.H., Koboldt, C.M. and Seiart, K. A single amino acid difference between cyclooxygenase-1 (Cox-1) and -2 (Cox-2) reverses selectivity of Cox-2 specific inhibitors. *J. Biol. Chem.*;271(26):15810-4, 1996.
- 34 Girard, T.D. and Bernard, G.R. Mechanical ventilation in ARDS: A State-of-the-Art Review. *Chest.*;131(3):921-9, 2007.
- 35 Goppelt-Struebe, M. Regulation of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isoenzyme expression. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*;52:213-222, 1995.
- 36 Granström, E. and Kumlin, M. Metabolism of prostaglandins and lipoxygenase products: Relevance for eicosanoid assay. In *prostaglandins and related substances: a practical approach*, ed. by C. Benedetto, R.G. McDonald-Gibson, S. Nigam and T.F. Slater, pp. 5-25, IRL Press, Oxford, 1987.

- 37 Greenberg, S., McGowan, C. and Glenn, T.M. Pulmonary vascular smooth muscle function in porcine splanchnic arterial occlusion shock. *Am. J. Physiol.*;241:2431-2436, 1981.
- 38 Grimminger, F., Becker, G. and Seeger, W. High yield enzymatic conversion of intravascular leukotriene A4 in blood-free perfused lungs. *J. Immunol.*;141:2431-2436, 1988.
- 39 Grimminger, F., Kreuzler, B., Schneider, U., Becker, G. and Seeger, W. Influence of microvascular adherence on neutrophil leukotriene generation. Evidence for cooperative eicosanoid synthesis. *J. Immunol.*;144:1866-1872, 1990.
- 40 Grimminger, F., Walmrath, D., Walter, H., Lutz, F. and Seeger, W. Induction of vascular injury by *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin in rabbit lungs is associated with the generation of different leukotrienes and hydroxyeicosatetraenoic acids. *J. Infect. Dis.*;163:362-370, 1991.
- 41 Grimminger, F., Wahn, H., Kraemer, H.-J., Stevens, J., Mayer, K., Walmrath, D. and Seeger, W. Different influence of arachidonic vs. eicosapentaenoic acid on experimental pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol.*;268:2252-2259, 1995.
- 42 Harris, R.C., McKanna, J.A., Akai, Y., Jacobson, H.R., Dubois, R.N. and Breyer, M.D. Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J. Clin. Invest.*;94:2504-2510, 1994.
- 43 Hawkey, C.J. Cox-2 inhibitors. *Lancet*;353(9149):307-14, 1999.
- 44 Hempel, S.L., Monick, M.M. and Hunninghake, G.W. Lipopolysaccharide induces H synthase-2 protein and mRNA in human alveolar macrophages and blood monocytes. *J. Clin. Invest.*;93:391-396, 1994.

- 45 Hersh, E.V., Lally, E.T. and Moore, P.A. Update on cyclooxygenase inhibitors: has a third COX isoform entered the fray? *Curr. Med. Res. Opin.*;21(8):1217-26, 2005.
- 46 Holtzman, M.J. Arachidonic acid metabolism. Implications of biological chemistry for lung function and disease. *Am. Rev. Respir. Dis.*;143:188-203, 1991.
- 47 Iseki, S. Immunocytochemical localization of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the rat stomach. *Histochemical J.*;27:323-328, 1995.
- 48 Johnson, J.L., Wimsatt, J. and Buckel, S.D. Purification and characterization of prostaglandin H synthase-2 from sheep placental cotyledons. *Arch. Biochem. Biophys.*;324:26-34, 1995.
- 49 Kang, K.H., Morrow, J.D., Roberts, L.J., Newman, J.H. and Banerjee, M. Airway and vascular effects of 8-epi-prostaglandin F2a in isolated perfused rat lung. *J. Appl. Physiol.*;74(1):460-5, 1993.
- 50 Kargman, S., Wong, E. and Greig, G.M. Mechanism of selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase-1 and -2 in intact cells. *Biochem. Pharmacol.*;52:1113-25, 1996.
- 51 Kashimura, O., Sakai, A. and Yanagidaira, Y. Effects of exercise-training on hypoxia and angiotensin II-induced pulmonary vasoconstrictors. *Acta Physiol. Scand.*;155(3):291-5, 1995.
- 52 Kirchner, H., Kruse, A., Neustock, P. and Rink, C. *Cytokine und Interferone*, 1. Auflage, Spektrum Verlag, 1993.
- 53 Kirtikara, K., Swankul, S. and Ballou, L.R. The analysis of nonsteroidal antiinflammatory drug selectivity in prostaglandin G/H synthase (PGHS)-null cells. *Inflamm. Res.*;50(6):327-32, 2001.

- 54 Klein, T., Nüsing, R.M., Pfeilschifter, J. and Ullrich, V. Selective inhibition of cyclooxygenase-2. *Biochem. Pharmacol.*;48:1605-1610, 1994.
- 55 Kraemer, H.-J., Stevens, J. and Seeger, W. Analysis of 2- and 3-series prostanoids by post-HPLC ELISA. *Anal. Biochem.*;214:535-543, 1993.
- 56 Lee, S.H., Soyoola, E., Chanmugam, P., Hart, S., Sun, W., Zhong, H., Liou, S., Simmons, D. and Hwang, D. Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.*;267:25934-25938, 1992.
- 57 Levitt, J.E. and Matthay, M.A. Treatment of acute lung injury: historical perspective and potential future therapies. *Semin. Respir. Crit. Care Med.*;27(4):426-37, 2006.
- 58 Littner, M.R. and Lott, F.D. Edema from cyclooxygenase products of endogenous arachidonic acid in isolated lung. *J. Appl. Physiol.*;67: 846-855, 1989.
- 59 Liu, F., Orr, J.A. and Wu, J.Y. Prostaglandin B2-induced pulmonary hypertension is mediated by TxA2/PGH2 receptor stimulation. *Am. J. Physiol.*;267(5Pt1):L602-8, 1994.
- 60 Lukkarinen, H., Laine, J., Aho, H., Asikainen, E., Penttinen, P. and Kaapa, P. Inhibition of Cox-2 aggravates neutrophil migration and pneumocyte apoptosis in surfactant depleted rat lungs. *Pediatr. Res.*;59(3):412-7, 2006.
- 61 Malik, A.B., Perlman, M.B., Cooper, J.A., Noonan, T. and Bizios, R. Pulmonary microvascular effects of arachidonic acid metabolites and their role in lung vascular injury. *Federation Proc.*;44:36-42, 1985.
- 62 Martin, C., Ullrich, V. and Uhlig, S. Effects of the thromboxane receptor agonist U46619 and endothelin-1 on large and small airways. *Eur. Resp. J.*;16(2):316-23, 2000.

- 63 Masferrer, J.L., Zweifel, B.S., Manning, P.T., Hauser, S.D., Leahy, K.M., Smith, W.G., Isakson, P.C. and Seibert, K. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is anti-inflammatory and nonulcerogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci.*;91:3228-3232, 1994.
- 64 Mayeux, P.R., Kadowitz, P.J. and McNamara, D.B. Evidence for a bidirectional prostaglandin endoperoxide shunt between platelets and bovine coronary artery. *Biochem. Biophys. Acta*;1011:18-24, 1989.
- 65 Mitchell, J., Akarasereenont, P., Thiememann, C. and Flower, R.J. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*;90:11693-7, 1993.
- 66 Nossaman, B.D., Feng, C.J., Wang, J. and Kadowitz, P.J. Analysis of angiotensin I, II and III in pulmonary vascular bed of the rat. *Am. J. Physiol.*;266(4Pt1):L389-96, 1994.
- 67 Oguma, T., Asano, K., Shiomi, T., Fukunaga, K., Suzuki, Y., Nakamura, M., Matsubara, H., Sheldon, H.K., Haley, K.J., Lilly, C.M., Drazen, J.M. and Yamaguchi, K. Cyclooxygenase-2 expression during allergic inflammation in guinea-pig lungs. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*;165(3):382-6, 2002.
- 68 Ouellet, M. and Percival, M.D. Effect of inhibitor time-dependency on selectivity towards cyclooxygenase isoforms. *Biochem. J.*;306:247-51, 1995.
- 69 Ozaki, T., Rennard, S.I. and Crystal, R.G. Cyclooxygenase metabolites are compartmentalized in the human lower respiratory tract. *J. Appl. Physiol.*;62(1):219-22, 1987.
- 70 Reitz, D.B., Li, J.J., Norton, M.B., Reinhard, E.J., Collins, J.T., Anderson, G.D., Gregory, S.A., Koboldt, C.M., Perkins, W.E., Seibert, K. and Isakson, P.C. Selective cyclooxygenase inhibitors: novel 1,2-Diacrylcyclopentenes are potent and orally active COX-2 inhibitors. *J. Med. Chem.*;37:3878-3881, 1994.

- 71 Rietschel, E.T., Brade, L., Brandenburg, K., Flad, H.D., de Jong-Leuvenick, J., Kawahara, K., Lindner, B., Loppnow, H., Luderitz, T. and Schade, U. Chemical structure and biologic activity of bacterial and synthetic lipid. *A. Rev. Infect. Dis.*;9,Suppl. 5:S527-36, 1987.
- 72 Rimarichin, J.A., Jacobson, J.A., Szabo, P., Maclouf, J., Creminon, C. and Wechsler, B.B. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in aortic smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb.*;14:1021-1031, 1994.
- 73 Rosenstock, M., Danon, A. and Rimon, G. PGHS-2 inhibitors, NS-398 and DUP697, attenuate the inhibition of PGHS-1 by aspirin and indomethacin without altering its activity. *Biochem. Biophys. Acta*;1440:127-37, 1999.
- 74 Schneidkraut, M.J. and Carlson, R.W. Bacterial sepsis-induced decrease in lung vascular reactivity to 9,11-dideoxy-11a9a-epoxymethano-prostaglandin F2 alpha (U46619) in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*;253(3):1171-6, 1990.
- 75 Schulz, R. and Seeger, W. Release of leukotrienes into the perfusate of calciumionophore stimulated rabbit lungs. Influence of 5-lipoxygenase inhibitors. *Biochem. Pharmacol.*;35:183-193, 1986.
- 76 Seeger, W., Wolf, H., Stähler, G., Neuhof, H. and Roka, L. Increased pulmonary vascular resistance and permeability due to arachidonate metabolism in isolated rabbit lungs. *Prostaglandins*;23:157-173, 1982.
- 77 Seeger, W., Walmrath, D., Menger, M. and Neuhof, H. Increased lung vascular permeability after arachidonic acid and hydrostatic challenge. *J. Appl. Physiol.*;61:1781-1789, 1986.

- 78 Seeger, W., Menger, M., Walmrath, D., Becker, G., Grimminger, F. and Neuhof, H. Arachidonic acid lipoxygenase pathways and increased vascular permeability in isolated rabbit lungs. *Am. Rev. Respir. Dis.*;136:964-972, 1987.
- 79 Seeger, W., Walmrath, D., Grimminger, F., Rosseau, S., Schuette, H, Kraemer, H.-J., Ermert, L. and Kiss, L. Adult respiratory distress syndrome: model systems using isolated perfused rabbit lungs. *Methods Enzymol.*;233:549-584, 1994.
- 80 Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, J., Perkins, W., Lee, L. and Isakson, P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci.*;91:12013-17, 1994.
- 81 Seibert, K., Masferrer, J. and Needleman, P. Pharmacological manipulation of cyclooxygenase-2 in the inflamed hydronephrotic kidney. *Br. J. Pharmacol.*;117:1016-20, 1996.
- 82 Selig, W.M., Noonan, T.C., Kern, D.F. and Malik, A.B. Pulmonary microvascular responses to arachidonic acids in isolated guinea pig lung. *J. Appl. Physiol.*;60:1972-1979, 1986.
- 83 Shore, S.A., Austen, K.F. and Drazen, J.M. Eicosanoids and the lung. In *Lung Cell Biology (Lung biology in health and disease, Vol. 41)*, ed by D. Massaro, pp. 1012-1089, Marcel Dekker, Inc., 1989.
- 84 Spannhake, E.W., Lemen, R.J., Wegmann, M.J., Hyman, A.L. and Kadowitz, P.J. Effects of arachidonic acid and prostaglandins on lung function in the intact dog. *J. Appl. Physiol.*;44:397-405, 1978.
- 85 Spragg, R. Acute Lung Injury in 2003. *Acta Pharmacol. Sin.*;24 (12):1288-1291, 2003.

- 86 Spragg, R., Lewis, J.F., Walmrath, H.D., Johannigman, J., Bellingan, G., Laterre, P.-F., Witte, M., Richards, G., Rippin, G., Rathgeb, F., Häfner, D., Taut, F. and Seeger, W. Effect of Recombinant Surfactant Protein C-based Surfactant on the Acute Respiratory Distress Syndrome. *N. Engl. J. Med.*;351(9):884-892, 2004.
- 87 Steudel, W., Kramer, H.J., Degner, D., Rosseau, S., Schütte, H., Walmrath, D. and Seeger, W. Endotoxin priming of thromboxane related vasoconstrictor responses in perfused rabbit lungs. *J. Appl. Physiol.*;83(1):18-24, 1997.
- 88 Townsley, M.I., Korthuis, R.J. and Taylor, A.E. Effects of arachidonate on permeability and resistance distribution in canine lung. *J. Appl. Physiol.*;58:206-210, 1985.
- 89 Uhlig, S. *The isolated perfused lung*. Hugo Sachs, 1994.
- 90 Uhlig, S. and Wollin, L. An improved setup for the isolated perfused rat lung. *J. Pharm. Meth.*;31:85-94, 1994.
- 91 Uhlig, S., Brasch, F., Wollin, L., Fehrenbach, H., Richter, J. and Wendel, A. Functional and fine structural changes in isolated rat lungs challenged with endotoxin *ex vivo* and *in vitro*. *Am. J. Path.*;146(5):1235-47, 1995.
- 92 Uhlig, S., Nüsing, R., von Bethmann, A., Featherstone, R.L., Klein, T., Brasch, F., Müller, K.M., Ullrich, V. and Wendel, A. Cyclooxygenase-2-dependent bronchoconstriction in perfused rat lungs exposed to endotoxin. *Mol. Med.*;2(3):373-83, 1996.
- 93 Viganò, T., Habib, A., Hernandez, A., Bonazzi, A., Boraschi, D., Leuret, M., Cassina, E., Maclouf, J., Sala, A. and Folco, G. Cyclooxygenase-2 and synthesis of PGE₂ in human bronchial smooth-muscle cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*;155:864-868, 1997.

- 94 Voelkel, N.F., Czartolomna, J., Simpson, J. and Murphy, R.C. FMLP causes eicosanoid-dependent vasoconstriction in lungs from endotoxin-primed rats. *Am. Rev. Respir. Dis.*;145:701-11, 1992.
- 95 Wakerlin, G.E., Benson, G.V. and Pearl, R.G. A thromboxane analog increase pulmonary capillary pressure but not permeability in the perfused rabbit lung. *Anaesthesiology*;75:475-80, 1999.
- 96 Walmrath, D., Schneider, U. Kreuzler, B., Grimminger, F., Ennis, M. and Seeger, W. Intravascular anti-IgE challenge in perfused lungs: mediator release and vascular pressor response. *J. Appl. Physiol.*;71:2499-2506, 1991.
- 97 Walmrath, D., Scharmann, M., Konig, R., Pilch, J., Grimminger, F. and Seeger, W. Staphylococcal alpha-toxin induced ventilation-perfusion mismatch in isolated blood-free perfused rabbit lungs. *J. Appl. Physiol.*;74:1972-1980, 1993.
- 98 Walmrath, D., Pilch, J., Scharmann, M., Grimminger, F. and Seeger, W. Severe VA/Q mismatch in perfused lungs evoked by sequential challenge with endotoxin and E. coli haemolysin. *J. Appl. Physiol.*;76:1020-1030, 1994.
- 99 Walmrath, D., Grimminger, F. and Seeger, W. *Lehrbuch der internistischen Intensivmedizin*, 3. Auflage, Schattauer Verlag;369-90, 1997.
- 100 Walmrath, D., Grimminger, F. and Seeger, W. Therapie des ARDS. *Intensivmed.*;36:104-125, 1999.
- 101 Ware, L.B. and Matthay, M.A. The Acute Respiratory Distress Syndrome. *N. Engl. J. Med.*;342(18):1334-49, 2000.

102 Weissmann, N., Winterhalder, S., Nollen, M., Voswinckel, R., Quanz, K., Ghofrani, H.A., Schermuly, R.T., Seeger, W. and Grimminger F. NO and reactive oxygen species are involved in biphasic hypoxic vasoconstriction of isolated rabbit lungs. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*;280(4):L638-45, 2001.

103 Westcott, J.Y., McDonnell, T.J., Bostwick, P. and Voelkel, N.F. Eicosanoid production in isolated perfused lungs stimulated by calcium ionophore A23187. *Am. Rev. Respir. Dis.*;138:895-900, 1988.

104 Yoshimura, K., Tod, M.L., Pier, K.G. and Rubin, L.J. Role of venoconstriction in thromboxane-induced pulmonary hypertension and edema in lambs. *J. Appl. Physiol.*;66:929-935, 1989.

105 Zhao, L., al-Tubuly, R., Sebkhi, A., Owji, A.A., Nunez, D.J. and Wilkins, M.R. Angiotensin II receptor expression and inhibition in the chronically hypoxic rat lung. *Br. J. Pharmacol.*;119(6):1217-22, 1996.

9. Anhang

9.1 Substanzen

Arachidonsäure (Paesel und Lorei, D-Hanau)

Lipopolysaccharid (Cytogen, D-Bodenheim)

DUP697 (DuPont Merck Pharmaceutical Co., USA-Willington)

NS-398 (Biomol, D-Hamburg)

SC-236 (Searle, USA-St. Louis)

Dimethylsulfoxid (Merck, D-Darmstadt)

Kochsalzlösung 0,9% (Pharmacia, D-Erlangen)

Angiotensin II (Sigma, D-München)

U46619 (Calbiochem, D-Bad Soden, Taunus)

Acetylsalicylsäure (Bayer AG, D-Leverkusen)

Aqua da iniectabilia (Pharmacia, D-Erlangen)

Elektrolytlösung 1/3 (Serag-Wiesner, D-Naila)

Natriumhydrogencarbonat 8,4% (Serag-Wiesner, D-Naila)

Nembutal (Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte, D-Hannover)

Liquemin (Hoffmann La Roche, D-Grenzach-Whylen)

Xylocain 2,5% (Astra Chemicals, D-Wedel)

ELISA-Kit zur TxB₂-Bestimmung (Cayman Chemical, USA-Ann Arbor)

ELISA-Kit zur 6-keto PGF_{1α}-Bestimmung (Cayman Chemical, USA-Ann Arbor)

10. Publikationsverzeichnis

10.1 Originalarbeiten

Ermert, L., Ermert, M., Althoff, A., Merkle, M., Grimminger, F. and Seeger, W.

Vasoregulatory prostanoid generation proceeds via cyclooxygenase-2 in non-inflamed rat lungs. *J. Pharm. Exp. Ther.*;286(3):1309-14, 1998.

Klemm, A., Tschernig, T., Ermert, L., Althoff, A., Merkle, M., Gebert, A., Ermert, M., Seeger, W. and Pabst, R.

Blockade of mucoside function associated antigen-1 (LFA-1) decreases lymphocyte trapping in the normal pulmonary vasculature: studies in the isolated buffer perfused rat lung. *Clinical and experimental Immunology*;121(2):375-83, 2000.

Schulz, R., Fegbeutel, C., Althoff, A., Traupe, H., Grimminger, F. and Seeger, W.

Central sleep apnea and unilateral diaphragmatic paralysis associated with vertebral artery compression of the medulla oblongata. *J Neurol.*;250(4):503-5, 2003.

Hocke, A.C., Ermert, M., Althoff, A., Brell, B., N'guessan, P.D., Suttorp, N. and Ermert, L.

Regulation of interleukin IL-4, IL-13, IL-10, and their downstream components in lipopolysaccharide-exposed rat lungs. Comparison of the constitutive expression between rats and humans. *Cytokine*;33(4):199-211, 2006.

Seeger, W. and Althoff, A.

Regenerative medicine - perspectives for internal medicine?! *Dtsch. Med. Wochenschr.*;131(16):859, 2006.

Althoff, A., Malacrida, R., Toome, V., Silverboard, H., Bshouty, Z., Hoviletho, S., Brandt, M.I. and Klein, M.

Localisation of radiographic infiltrates in patients with aspiration follows anatomy only in ARDS. *Int. Care Med.*;33:Suppl. 2, 2007.

Herausgeber:

Intensivmedizin und Notfallmedizin; 2002 39.1.

Medizinische Klinik; 2006 Apr.

Internist; 2006 47.

Internist; 2006 [Suppl 1] 47.

10.2 Abstracts und Posters

Ermert, L., Ermert, M., Althoff, A. and Seeger, W.

Immunohistology and polymerase chain reaction of cyclooxygenase-isoenzyme after lipopolysaccharide-“priming” on isolated perfused rat lungs. *Pneumologie*;51, Sonderheft I: 194, 1997. 38. Konferenz der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie.

Ermert, L., Ermert, M., Althoff, A. and Seeger, W.

COX-II inhibition eliminates thromboxane related vasoconstrictor response in isolated perfused rat lungs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*;155 (4),A787, 1997. San Francisco 1997, ALA/ATS International Conference.

Althoff, A., Malacrida, R., Toome, V., Silverboard, H., Bshouty, Z., Hovilehto, S., Brandt, M.I. and Klein, M.

Localisation of Radiographic Infiltrates in Patients with Aspiration Follows Anatomy Only in Absence of ARDS. Berlin 2007, Annual Congress of the European Society of Intensive Care Medicine.

11. Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht-veröffentlichten Schriften entnommen sind, und allen Angaben die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

12. Lebenslauf

André Althoff
 Nahrungsberg 68
 35390 Gießen
 andre.althoff@uglc.de

Geburtsdatum : 22. März 1970
 Geburtsort: Lünen / Nordrhein-Westfalen
 Familienstand: verheiratet, 2 Kinder
 Nationalität: deutsch
 Eltern: Gudrun Althoff, geb. Breier
 Rainer Althoff

Ausbildung: 1990 Abitur, Freiherr-vom-Stein-Gymnasium, Lünen
 Zivildienst: 1990-1992 Rettungssanitäter, Deutsches Rotes Kreuz, Lünen
 Studium: 1992-1998 Humanmedizin, Justus-Liebig-Universität, Gießen
 Physikum: 12.04.1994 Justus-Liebig-Universität, Gießen
 1. Staatsexamen: 23.03.1995 Justus-Liebig-Universität, Gießen
 2. Staatsexamen: 18.09.1997 Justus-Liebig-Universität, Gießen
 3. Staatsexamen: 26.10.1998 Justus-Liebig-Universität, Gießen
 Praktisches Jahr: 10/97-02/98 Medizinische Klinik und Poliklinik II, Gießen
 02/98-06/98 Department of Surgery, University Hospital Reykjavík, Ísland
 06/98-10/98 Abteilung für Anästhesie, Kreiskrankenhaus Wetzlar

Promotion: 1995-1998 Experimentelle Promotion im Rahmen der Klinischen Forschergruppe „Respiratorische Insuffizienz“, an isoliert perfundierten und ventilierten Rattenlungen, Labor Prof. Dr. W. Seeger, Justus-Liebig-Universität, Gießen

Beruf: 1998-2000 AiP, Medizinische Klinik und Poliklinik II, Prof. Dr. Werner Seeger, Universitätsklinikum Gießen
 seit 05/2000 Assistenzarzt, Medizinische Klinik und Poliklinik II

- Prof. Dr. Werner Seeger
 Universitätsklinikum Gießen, Gießen
- 20.06.2007 Facharzt für Innere Medizin
- 18.06.2008 Facharzt für Innere Medizin / Schwerpunkt Pneumologie
- Weitere Tätigkeiten: seit 05/2000 Kassenärztlicher Vertretungsdienst, Gelnhausen
- 22.08.2000 Fachkunde Rettungsdienst
- 2000-2005 Interdisziplinäre AG „Beatmung“, Deutsche interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI)
- 2000-2002 wissenschaftl. Kongresssekretär, 6. Kongress der DIVI
- seit 01/2001 Mitglied, Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin e.V. (DGIM), Wiesbaden
- 2001-2003 Studienkoordinator, Non-invasive positive Druck-Ventilation (NPPV) zur Behandlung des akuten Lungenversagens bei Patienten mit schwerer Pneumonie. Respironics, Paris, Frankreich
- seit 2002 AG „Pneumologische Kliniken“, Dt. Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. (DGP), Werne
- 11/03-04/08 Scientific Enrolment and Coordinating-Board der Valid-Study (Venticute (rSP-C Surfactant) in Patients with Pneumonia or Aspiration of Gastric Contents Leading to Intubation, Mechanical Ventilation and Severe Oxygenation Impairment), Nycomed, Konstanz
- 2005-2006 wissenschaftl. Kongresssekretär, 112. Kongress der DGIM
- 01.11.2005 Arzt für Notfallmedizin
- seit 01/2006 Leitender Notarzt des Landkreises Gießen
- seit 2006 Kongressberater der DGIM
- seit 2007 Kommission „klinische Forschung / Nachwuchsförderung“ der DGIM
- seit 04/2007 Mitglied, Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. (DGP), Werne
- 06/2007 Qualifikation „Ärztlicher Leiter Rettungsdienst“
- seit 06/2007 MBA-Studiengang „Health Care Management“, European Business School (EBS), Oestrich-Winkel
- 06/2008 Gesundheitsökonom (EBS)

13. Danksagung

Die experimentelle Grundlage der vorliegenden Arbeit wurde zwischen den Jahren 1995 und 1998 in der Abteilung für Pneumologie und Intensivmedizin der Medizinischen Klinik und Poliklinik II der Justus-Liebig-Universität, Gießen erarbeitet.

Mein Dank gilt zunächst meinem wissenschaftlichen und klinischen Lehrer Prof. Dr. med. Werner Seeger, Medizinische Klinik und Poliklinik II, Gießen sowie PD Dr. med. Leander Ermert, Institut für Pathologie, Gießen für Ihre weit reichende und anhaltende Unterstützung meiner klinischen und wissenschaftlichen Laufbahn.

Mein Dank gilt ferner den Kollegen, die an der Erarbeitung der Ergebnisse unterstützend mitgewirkt haben. Im Besonderen möchte ich an dieser Stelle Carmen Homberger und Karin Quantz hervorheben. Gleiches gilt für Prof. Dr. med. Ardeschir Ghofrani und Dr. med. Robert Voswinkel, deren freundschaftliche, wissenschaftliche und technische Unterstützung mir von besonderem Wert waren.

Nicht zuletzt danke ich meiner Mutter und meinen Großeltern für ihre ermutigende Unterstützung und ihr anhaltendes Verständnis, ohne die ein erfolgreiches Studium und vor allem die vorliegende Arbeit sehr viel schwieriger zu realisieren gewesen wären.

Last but not least danke ich meiner Frau und meinen zwei Töchtern, die mich insbesondere in der „kritischen Endphase“ der Abfassung dieser Arbeit immer wieder angespornt, aufgeheitert und abgelenkt haben.

Ihnen sei diese Arbeit gewidmet.