Experimentelle Untersuchungen zur Wirkung von Endothelin-1 auf die Lungenstrombahn am Modell der isolierten Kaninchenlunge

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Wolfram Georg Rothfischer

aus Esslingen/Neckar

Gießen 2002

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik I
Leiter: Prof. Dr. med. H. Tillmanns
Klinische Pathophysiologie und Experimentelle Medizin
Leiter: Prof. Dr. med. H. Neuhof
des Universitätsklinikums Gießen

Betreuer: PD Dr. J. Schmeck
Gutachter: Prof. Dr. H. Neuhof
Gutachter: Prof. Dr. W. Kummer

Tag der Disputation: 02. Mai 2003

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis:

1 EINLEITUNG 4

2 MATERIAL UND METHODIK 13

2.1 Das Modell der isoliert perfundierten Kaninchenlunge
— "halboffenes" System 13
2.1.1 Verwendetes Tiermodell 13
2.1.2 Präparation und Organentnahme 13
2.1.3 Perfusions- und Flowsteigerungsphase 15
2.1.4 Extrakorporales Zirkulationssystem 16
2.1.5 Erfassung physiologischer Meßgrößen 18
2.1.6 Beatmung und pH-Wert-Einstellung 18

2.2 Das Modell der isoliert perfundierten Kaninchenlunge
— "geschlossenes" System 20
2.2.1 Verwendetes Tiermodell 20
2.2.2 Präparation und Organentnahme 20
2.2.3 Perfusions- und Flowsteigerungsphase 21
2.2.4 Extrakorporales Zirkulationssystem 21
2.2.5 Erfassung physiologischer Meßgrößen 21
2.2.6 Gravimetrische Bestimmung des kapillären
Filtrations-Koeffizienten (K_{fc}) 22

2.3 Verwendete Materialien 24
2.3.1 Perfusionsmedium 24
2.3.2 Verwendete Substanzen 25
2.3.2.1 Arzneimittel 25
2.3.2.2 Infusionslösungen 25
2.3.2.3 Sonstige 25

2.4 Versuchsaufbau 26
2.4.1 Versuchsserien 26
2.4.2 Versuchsdurchführung 26

2.5 Statistik 29

3 ERGEBNISSE 30

3.1 Halboffenes System 30

3.1.1 Änderung des PAP 31

3.1.2 Änderung des Lungengewichtes 32

3.2 Geschlossenes System 33

3.2.1 Änderung des PAP 34

3.2.2 Änderung des Lungengewichtes 35

3.2.3 Kapillärer Filtrationskoeffizient (K_{fc}) 36

4 DISKUSSION 38

4.1 Allgemeines 38

4.2 Vaskuläre Effekte, Dosierungen und Übertragbarkeit auf den menschlichen Organismus 39

4.3 Mikrovaskuläre Permeabilität 43

5 ZUSAMMENFASSUNG 48

6 LITERATUR 49

Glossar

ACE	Angiotensin converting enzyme
ANF	Atrialer natriuretischer Faktor
ARDS	Adult respiratory distress syndrome
ECE	Endothelin converting enzyme
ET	Endothelin
K_{fc}	Kapillärer Filtrationskoeffiizient
KG	Körpergewicht
KHHP	Krebs-Henseleit-Hydroxyläthylstärke-Puffer
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PAP	Pulmonal-arterieller Druck
PCP	Pulmonal-kapillärer Druck
PEEP	Positive end expiratory pressure
PGI_2	Prostaglandin I_2 (Prostacyclin)
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
PVP	Pulmonal-venöser Druck

1 Einleitung

Die Familie der Endotheline (ETs), die aus drei Strukturisomeren besteht (ET-1, ET-2, ET-3), wurde seit ihrer Erstbeschreibung 1988 mit größtem Interesse untersucht. Damals wurden erstmals Endotheline aus Endothelzellen der Schweineaorta isoliert [133]. Endothelin-1 (ET-1) ist das am intensivsten erforschte Isopeptid dieser Familie. Ein vielfältiges Wirkungsspektrum, bei dem vor allem die vaskuläre Wirkung im Vordergrund steht, das jedoch auch die Modulation des Tonus der Atemwege [66], Leukozyten-stimulierende [87] sowie mitogene [128] Effekte beinhaltet, konnte bisher nachgewiesen werden. Von hohem Interesse ist zweifellos die Beteiligung der ETs an Erkrankungen der Lunge, wie Asthma, Lungenfibrose, pulmonale Hypertonie und ARDS (Adult respiratory distress syndrome). Dies kann zum einen schon allein aufgrund des Wirkungsspektrums postuliert werden, zum anderen konnte dieser Verdacht durch den Nachweis eines erhöhten Plasma-ET-Spiegels bzw. einer erhöhten ET-Produktion bei genannten Krankheiten konkretisiert werden. Von nicht minderem Interesse, aber im Rahmen unserer Untersuchungen an der isolierten Kaninchenlunge nur sekundär, ist selbstverständlich die Rolle der ETs bei pathologischen Prozessen in anderen Organen, wie zum Beispiel Herz, Gehirn oder Niere.

Die Familie der Endotheline besteht aus drei Isopeptiden, die jeweils aus 21 Aminosäuren aufgebaut sind. ET-2 und ET-3 unterscheiden sich von ET-1 lediglich in zwei bzw. fünf Aminosäuren [39, 62]. Die genetische Information zur Bildung von ET-1 ist beim Menschen auf Chromosom 6 codiert [74]. Die Gene für ET-2 befinden sich auf Chromosom 1 [8] und für ET-3 auf Chromosom 20 [104, 9]. Die Synthese der Endotheline erfolgt in mehreren Schritten, die exemplarisch an ET-1 dargestellt werden, da dieser Syntheseweg am

gründlichsten erforscht ist. Das erste Syntheseprodukt ist das aus 212 Aminosäuren bestehende Praeproendothelin-1, welches durch eine Carboxypeptidase zu big ET-1 gespalten wird [61]. Dieses aus 39 Aminosäuren bestehende Peptid wird sowohl ins Plasma sezerniert als auch intrazellulär durch das Endothelin converting enzyme (ECE) zum maturen ET-1 transformiert [132, 82]. Am Rande sei hier erwähnt, daß ECE durch verschiedene Substanzen inhibiert werden kann [27]. In Ergänzung zu diesem spezifischen Metabolisierungsweg wird die Existenz einer alternativen unspezifischen Synthese diskutiert [7]. Eine intrazelluläre Speicherung von Endothelin existiert nicht. Es kann innerhalb von Minuten eine de-novo-Synthese erfolgen, wobei die wichtigsten Stimuli Hypoxie [12, 28], Ischämie und Scherkräfte sind [92, 71].

Die Metabolisierung ist bisher noch nicht hinreichend untersucht worden. Durch die exogene Zufuhr von radioaktiv markiertem ET-1 bei Ratten konnte eine Halbwertszeit von wenigen Minuten nachgewiesen werden [42]. Diese kurze Halbwertszeit resultiert wahrscheinlich aus der hohen Klärfähigkeit der Lunge für ET-1, die 80-90 % des zirkulierenden Endothelins bei der ersten Passage eliminiert. Beim Mensch wird eine zusätzliche Elimination im Splanchnikusgebiet diskutiert [127]. In der pulmonalen Strombahn erfolgt die Hydrolyse durch membrangebundenes ECE und ACE (Angiotensin converting enzyme) [82,83] sowie durch Ektoenzym Endopeptidase E24.11 [88]. ET_B-Rezeptoren scheinen für die Metabolisierung von ET-1 bedeutsam zu sein [42], da durch die Gabe des selektiven ET_B-Rezeptorantagonisten BQ788 die pulmonale Klärfähigkeit für ET-1 reduziert wird [64]. Im Gegensatz zu den geschilderten Daten konnten andere Arbeitsgruppen keinen First-Pass-Effekt für ET-1 in der Lunge bei Untersuchungen an Menschen [105] und Katzen [76] nachweisen.

Die hydrophilen Endotheline entfalten ihre biologische Wirksamkeit nach Kopplung an spezifische Rezeptoren, die nach ihrer unter-

schiedlichen Sensitivität für ET-1 und ET-3 klassifiziert werden. ET_A-Rezeptoren besitzen die höchste Affinität zu ET-1, während ET_B-Rezeptoren gleiche Affinitäten zu ET-1 und ET-3 aufweisen [2, 109]. Humane ET_A- und ET_B-Rezeptoren konnten bereits kloniert werden [3, 57]. Die Endothelinrezeptoren gehören zu einer Gruppe von Membranproteinen, die an G-Protein gekoppelt sind [2,109]. Nach der Rezeptorbindung erfolgt eine G-Protein-vermittelte Aktivierung der Phospholipase C, welche zur Synthese von Inositol 1,4,5-triphosphat und Diacylglycerin führt [122, 4]. Inositol 1,4,5-triphosphat mobilisiert intrazelluläres Kalzium, welches zusammen mit Diacylglycerin zu einer Aktivierung der Proteinkinase C führt [36, 135]. Diese Mechanismen führen zu Vasokonstriktion, Zellproliferation und Änderung der transmembranen Ionenströme [70, 97]. Ein nicht unbeträchtlicher Teil der endothelinvermittelten Wirkung wird durch die Freisetzung sekundärer Mediatoren, insbesondere von Arachidonsäure-Metaboliten, Histamin, Stickstoffmonoxid und Plättchen-aktivierender Faktor (PAF) mediiert, wie unter anderem aus eigenen Versuchsreihen hervorging [11, 41]. Zur Analyse der Rezeptorverteilung in den verschiedenen Organsystemen wurden Untersuchungen mit selektiven ET_A- und ET_B-Rezeptorantagonisten sowie dem ET_B-Rezeptoragonisten Sarafotoxin S6c, welches aus dem Gift der Schlange *Atractaspis engadensis* isoliert wurde [54], durchgeführt. Die pharmakologischen Studien, die mit den Rezeptorantagonisten durchgeführt wurden, lassen die Existenz von zwei Subtypen sowohl des ET_A-Rezeptors als auch des ET_B-Rezeptors vermuten [119,120]. Am Endothel befindliche ET_B-Rezeptoren werden ET_{B1}, an der glatten Muskulatur befindliche ET_{B2} genannt. Es wird vermutet, daß sowohl ET_A- als auch ET_B-Rezeptoren an der glatten Muskulatur zur Kontraktion führen, wohingegen die am Endothel liegenden ET_{B1}-Rezeptoren jedoch über eine Freisetzung von NO und Prostacyclin PGI_2 eine Relaxation der Muskulatur erzeugen können [10]. Bei

physiologischen Untersuchungen verschiedener Organsysteme konnten vasokonstriktorische Wirkungen von Endothelin im Koronarkreislauf [52], im Splanchnikusgebiet [130], in den Nierengefäßen [100, 130], in Hirnarterien [121] sowie im systemischen Kreislauf [130], wo auch vasodilatierende Effekte beschrieben wurden [102], nachgewiesen werden.

Durch intensive Erforschung der Effekte von ET-1 wurden Interaktionen mit anderen zellulären und humoralen Systemen beschrieben, die eine proinflammatorische Rolle von ET-1 vermuten lassen. Die Aggregation von Neutrophilen [45] sowie die Stimulation der Elastasefreisetzung [46] und der Bildung toxischer Sauerstoffradikale [47] gehört ebenso zum Wirkungsspektrum von ET-1, wie die Aktivierung der Eicosanoid-Synthese in Makrophagen und Monozyten. Weiterhin werden Monozyten zur Freisetzung von Interleukinen angeregt [86], und PAF wird aus Makrophagen freigesetzt [45, 78]. Umgekehrt induzieren PMN auch die Synthese von big ET-1 und ET-1 in Endothelzellen [81]. Zirkulierendes big ET-1 kann durch granulozytäre Enzyme zum maturen ET-1 konvertiert werden [115]. Ebenso scheinen Granulozyten am ET-1-Abbau beteiligt zu sein, da sie die hierzu notwendigen Enzyme im Cytosol aufweisen [115, 98]. Die inflammatorische Wirkung von ET-1 wird durch die Fähigkeit zur Steigerung der Proliferation von glatten Muskelzellen der Atemwege [94] und der Gefäße [65] sowie von Fibroblasten [99] ergänzt. Man kann also davon ausgehen, daß ET-1 einen wichtigen Faktor bei inflammatorischen und proliferativen Prozessen darstellt.

Eine Übersicht der physiologischen Rolle von ET-1 an der Gefäßwand zeigt Abbildung 1.

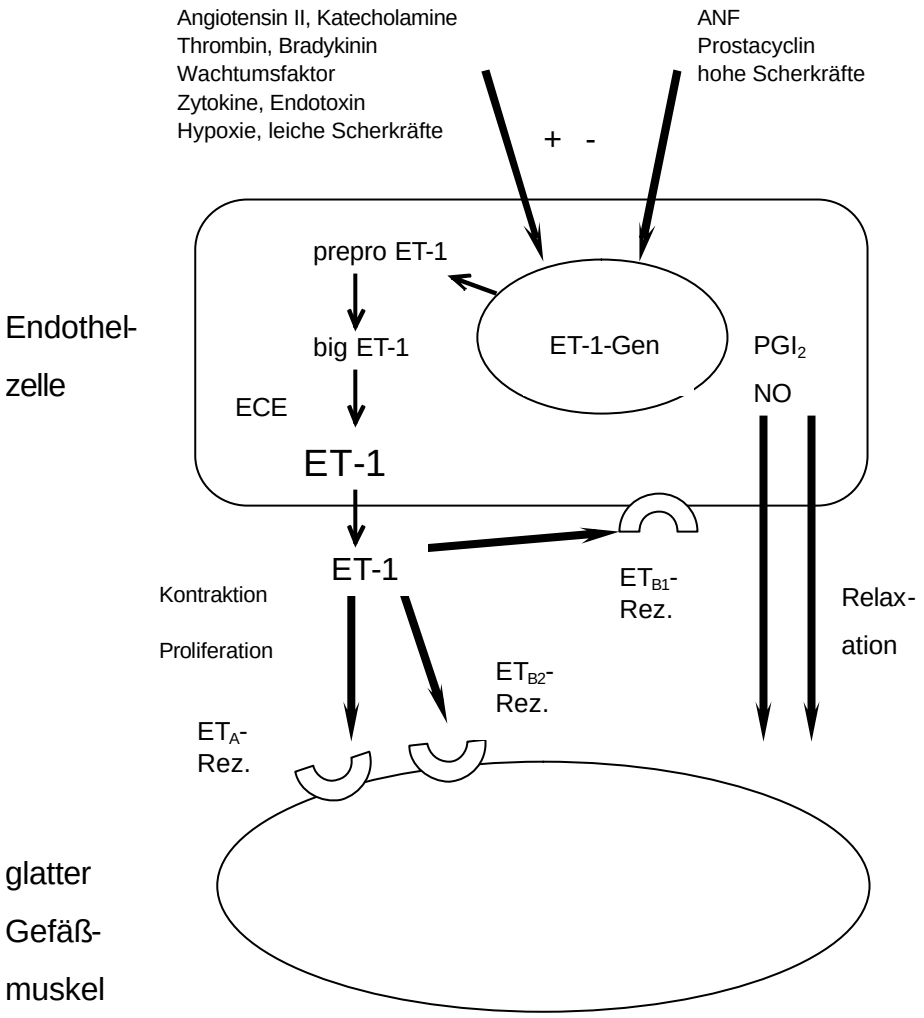

Abb. 1: Aktion und Interaktion von Endothelin an der Gefäßmuskulatur (modifiziert nach Boscoe 2000 [10])

Physiologische und pathophysiologische Rolle von ET in der Lunge

Das Lungengewebe weist eine Vielzahl von Zellen auf, die zur ET-1-Synthese befähigt sind. Zu ihnen gehören Bronchialephitelzellen, Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Makrophagen und pulmonale neuroendokrine Zellen [34, 126, 84]. Als Auslöser der ET-Synthese im Lungengewebe konnten hauptsächlich inflammatorische Stimuli sowie Hypoxie identifiziert werden [90, 17, 12]. Die pulmonale Strombahn scheint hinsichtlich der ET-1-Freisetzung Unterschiede zur systemischen Zirkulation aufzuweisen. So wird die Produktion von ET-1 im großen Kreislauf durch AT II und Vasopressin erhöht, welche keinen Einfluß auf die pulmonale ET-Synthese haben [95, 60]. Darüber hinaus verfügt die pulmonale Strombahn bei Versuchen mit Ratten über eine ausgeprägte Klärfähigkeit für ET-1, wie oben bereits beschrieben wurde [127]. Eine mögliche Erklärung hierfür mag in der hohen Konzentration von ECE und ACE in der Lunge sowie in der Präsenz zahlreicher Leukozyten in der pulmonalen Mikrozirkulation gesehen werden.

Die Verteilung von ET_A- und ET_B-Rezeptoren in den Atemwegen weist eine charakteristische Häufung von ET_A-Rezeptoren in den großen Atemwegen und von ET_B-Rezeptoren in den Bronchiolen auf [50]. In den menschlichen Atemwegen wird eine Bronchokonstriktion vornehmlich über ET_B-Rezeptoren mediiert [50], wohingegen ET_A-Rezeptoren an der Prostaglandinfreisetzung beteiligt sind [50, 49]. Bronchokonstriktion und Eicosanoidfreisetzung treten nach Entfernen des Bronchialepithels verstärkt auf [18]. Da bei Asthma und akutem Lungenversagen (ARDS) häufig Epithelschäden auftreten, mag der bronchokonstriktorische Effekt von ET-1 bei diesen Krankheiten von Bedeutung sein. ET-1 wirkt in den Atemwegen mitogen auf glatte Muskelzellen und erhöht somit die DNA- und Proteinsynthese sowie die Proliferation der Muskelzellen [80, 123].

In menschlichen Pulmonalgefäßen sind beide Rezeptorsubtypen, ET_A- und ET_B-Rezepzoren, exprimiert [26, 43], wobei das Übergewicht in den größeren Gefäßen auf seiten der ET_A-Rezeptoren liegt. ET_B-Rezeptoren oder atypische Rezeptoren scheinen dagegen in kleineren Gefäßen zu dominieren [13]. ET-Rezeptoren sind auch im pulmonal-venösen Anteil und in perivaskulären Nervenfasern nachgewiesen worden [103]. Die von ET-1 ausgelöste pulmonale Vasokonstriktion wird vornehmlich über ET_A-Rezeptoren mediiert [13], wobei auch ET_B-Rezeptor-mediierte Effekte eine geringe Rolle zu spielen scheinen [43]. Weiterhin wird der mitogene Effekt von ET-1 auf glatte Gefäßmuskelzellen über ET_A-Rezeptoren vermittelt [133]. Auch die sekundäre Mediatorsynthese, insbesondere die Aktivierung des Arachidonsäuresystems, scheinen über ET_A-Rezeptoren mediiert zu werden [11].

Dieses Wirkungsprofil legt den Zusammenhang von ETs mit verschieden Krankheitsbildern der Lunge nahe.

Zuerst, aber nur am Rande erwähnt sei hier das Asthma, bei welchem ET-1 eine Rolle zu spielen scheint, da hier, zumindest in bestimmten Phasen der Erkrankung, erhöhte Plasma-ET-Spiegel vorliegen [10]. Auf weitere Ausführungen hierzu soll aber verzichtet werden, da die Versuche im Rahmen dieser Arbeit nur das Gefäßsystem bzw. den interstitiellen Raum des Lungenparenchyms betreffen.

Bei Menschen, die an Erkrankungen leiden, deren Verlauf durch das Auftreten einer pulmonalen Hypertension kompliziert wird, wurden ebenfalls erhöhte Plasma ET-1-Spiegel gefunden. So waren die ET-1 Werte bei Patienten mit primärer pulmonaler Hypertonie [14, 15, 16], hypoxischer Lungenerkrankung [118], angeborenen Herzfehlern [15], Kollagenosen [125], pulmonaler Thromboembolie [118], Herzklappenfehler [22] und kongestiver Kardiomyopathie [22] erhöht. Bei Patienten mit primärer pulmonaler Hypertonie wurde eine vermehrte pulmonale ET-1-Produktion bei gleichzeitig verminderter

pulmonaler Klärfähigkeit für ET-1 nachgewiesen [118]. Patienten mit sekundärer pulmonaler Hypertonie weisen ebenfalls eine erhöhte ET-1-Immunoreaktivität im Endothel auf [44]. Bei pulmonaler Hypertonie infolge kongestiver Kardiomyopathie korrelieren die Plasma-ET-1-Werte im Gegensatz zur primären pulmonalen Hypertonie direkt mit der Höhe des pulmonal-arteriellen Druckes [22, 23]. Diese geschilderten Befunde weisen auf die Bedeutung von ET-1 bei pulmonal-vaskulären Erkrankungen hin.

Die Bedeutung, die ET-1 bei der Ausbildung des Lungenversagens (ARDS) zukommt, ist trotz eingehender Forschung unklar.

Das ARDS entsteht entweder durch direkte (z.B. Reizgase) oder indirekte (z.B. Sepsis, Polytrauma oder Schock jedweder Genese) Affektion der alveolo-kapillären Einheit. In diesen inflammatorischen Prozess sind eine Vielzahl von Mediatorsystemen und inflammatorisch kompetente Zellen involviert. Zu den humoralen Faktoren zählen vor allem Eicosanoide, PAF, Zytokine, Sauerstoff-Radikale und Proteasen. Zu den beteiligten Zellen zählen PMN, Makrophagen, Endothelzellen und Pneumozyten Typ II [91, 114]. Weitgehend unklar ist gegenwärtig die zeitliche Abfolge, die Hierarchie und die quantitative Bedeutung der einzelnen Komponenten. In der Frühphase tritt eine akute Störung der pulmonalen Zirkulation mit Erhöhung des pulmonal-vaskulären Widerstandes, eine Störung der intrapulmonalen Flüssigkeitsbilanz durch Erhöhung der Gefäßpermeabilität mit proteinreichem Ödem und eine konsekutive Störung des Gasaustausches mit Hypoxämie und später Hyperkapnie auf. Im weiteren Verlauf kommt es zur Bildung von alveolären hyalinen Membranen und zu teilweise massiver Atelektasenbildung, was in einer zunehmenden Fibrosierung des Lungeninterstitiums endet.

Eine Beteiligung von ET-1 bei diesem Prozess mag wahrscheinlich sein, da ET-1 neutrophile Granulozyten aktivieren kann [46] und des weiteren eine Erhöhung des pulmonal-arteriellen Druckes und eine

Bildung sekundärer Mediatoren, insbesondere Thromboxan, Prostazyklin und PAF [11], induziert.

Einen Hinweis auf die Beteiligung von ET-1 in der Genese des ARDS liefert auch die Beobachtung erhöhter Plasma-ET-1-Spiegel bei Patienten, die an ARDS leiden [32, 73]. Auch bei Patienten, die infolge von Trauma, Verbrennung, septischen Komplikationen, disseminierter intravasaler Koagulopathie oder HELLP-Syndrom ein erhöhtes Risiko der Entwicklung eines ARDS aufweisen, wurden erhöhte ET-1 Werte registriert [58, 63, 59, 129]. Ebenso konnte dies an Tierexperimenten nachvollzogen werden [116, 96, 89].

Die bisherigen Untersuchungen liefern trotz neuer Erkenntnisse zur pathophysiologischen Bedeutung kein genaues Wissen über die qualitative und vor allem die quantitative Wirkung von ETs bei pulmonalen Erkrankungen, die mit erhöhtem pulmonal-arteriellem Druck sowie einer Ödembildung einhergehen. Unklar ist auch, ob erhöhte ET-Plasmaspiegel Ursache oder vielleicht Folge dieser Krankheiten sind.

Zur Untersuchung der Wirkung von ET in dem geschilderten Zusammenhang ist es sinnvoll, die Komplexität gegenseitiger Beeinflussung, wie sie in einem intakten Organismus vorliegt, soweit wie möglich zu reduzieren. In der vorliegenden Arbeit werden die Effekte von gentechnisch synthetisiertem ET-1 am erprobten Modell der isolierten, mit einem zell- und plasmafreien Krebs-Henseleit-Hydroxyethylstärke-Puffer perfundierten Kaninchenlunge untersucht.

Die vorliegenden Dosis-Wirkungs-Studien dienten in erster Linie dazu, eine ET-Konzentration zu finden, mit der gearbeitet und reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden konnten.

Im Vordergrund standen Versuche, bei denen der kapilläre Filtrationskoeffizient (K_{fc}) bestimmt wurde, welcher ein Maß für die Permeabilität des Lungengefäßbettes darstellt.

2 MATERIAL UND METHODIK

2.1 Das Modell der isoliert perfundierten Kaninchenlunge — “halboffenes” System

2.1.1 Verwendetes Tiermodell

Alle Versuche, sowohl im “halboffenen” als auch im “geschlossenen” System, wurden an dem Modell der isolierten ventilierten und perfundierten Kaninchenlunge durchgeführt. Als Organspender für die Untersuchungen dienten insgesamt 49 Kaninchen (*Ortictolagus caniculus*) aus einer Standardkoloniezucht der Behring-Werke, Marburg. Die verwendeten Tiere beiderlei Geschlechtes hatten ein durchschnittliches Gewicht von 2793 g (±191 g) und wurden bis kurz vor Versuchsbeginn mit Altromin®-Standarddiät und Wasser ad libidum ernährt. Die Versuche wurden entsprechend den Regeln des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und als Organentnahmen dem Regierungspräsidium in Gießen angezeigt.

2.1.2 Präparation und Organentnahme

Die Tiere wurden nach Kanülierung der lateralen Ohrvene mit Pentobarbital-Natrium (Nembutal®) langsam soweit narkotisiert, bis eine deutliche Relaxation, aber keine ausgeprägte Atemdepression eintrat und auf dem Rücken gelagert. Zur Antikoagulation wurden 1000 I.E./kg KG Heparin (Liquemin®) injiziert. Anschließend wurde ein subkutanes Depot von ca. 10 ml einer 1% Lidocain-HCl-Lösung (Xylocain® 2%) prätracheal gesetzt und die ventrale Abdomen-, Thorax- und Halspartie rasiert. Nach Wirkungseintritt des Lokalanästhetikums wurde über eine mediane Inzision der kraniale Teil der Trachea freipräpariert, etwa 1 cm unterhalb des Larynx eröffnet und mittels eines PVC-Schlauches (Ø 3,5/5,0 mm innen/außen) intubiert. Kurz vor der Intubation wurde ein weiterer Bolus Pentobarbital-Natrium intravenös

injiziert, um die Spontanatmung aufzuheben und einer Vagusreizung mit Bronchospasmen durch die Intubation und das Einbinden des Tubus vorzubeugen.

Unmittelbar mit der Intubation beginnend, wurden die Lungen mittels einer volumengesteuerten Starling-Pumpe (B.Braun, Melsungen) kontinuierlich bis zum Ende des Versuchs kontrolliert beatmet.

Im Anschluß an die Intubation wurde die Narkose mit weiterem Pentobarbital i.v. bis zum Erlöschen jeglicher Schmerzreize unter palpatorischer Kontrolle der Herzaktion weiter vertieft. Die Gesamtdosis Pentobarbital betrug wärend der Präparation 50-70 mg pro kg KG.

Über eine mediane, entlang der Rippenbögen nach lateral erweiterte Laparatomie wurde das Diaphragma von kaudal dargestellt. Hierbei mußten fast immer die durchtrennten Aa. epigatricae craniales abgeklemmt werden, um Blutverlust zu vermeiden. Unter Eröffnung beider Pleurahöhlen wurde das Diaphragma von Sternum und Rippen abpräpariert. Dann wurde der Processus xyphoideus angehoben und das Perikard und das obere Mediastinum scharf von der Rückseite des Sternums abgetrennt. Anschließend wurde der Thorax über eine mediane Sternotomie bis zur Tracheotomie-Inzision eröffnet. Nachdem die Sternotomieränder mit Kocher-Klemmen angeklemmt und seitlich fixiert waren, wurden der Thymus sowie die ventralen Anteile des Perikards abpräpariert und der Truncus pulmonalis mit einer losen Ligatur versehen. Nun wurde der Truncus pulmonalis knapp distal der Klappenebene inzidiert und ein Silikonkatheter mit abgerundeter Polyethylen-Knopfkanüle (Ø 3,0/5,0 mm innen/außen) unter laufender Perfusion (30 ml/min) mit zellfreiem **K**rebs-**H**enseleit-**H**ydroxyläthylstärke-**P**uffer (KHHP, siehe Rezeptteil) in das Gefäß vorgeschoben und dort mittels der Ligatur fixiert. Um eine pulmonale Stauung zu verhindern, wurden sofort die Ventrikel durch Resektion der Herzspitze eröffnet.

Anschließend wurde die Trachea kranial der Intubationsstelle durchtrennt und mit Lungen, Herz, Ösophagus und Aorta descendens vollständig aus dem Thorax herausgelöst. Bevor die Lunge an einem mit einer Wägezelle verbundenen Haken berührungsfrei in einem Organbehälter plaziert und alle zu- und abführenden Schläuche zur Vermeidung äußerer Krafteinwirkung spannungsfrei fixiert wurden, wurde das paratracheale und mediastinale Gewebe einschließlich Ösophagus und Aorta zur Vermeidung von Druckatelektasen abpräpariert und das Herz abgesetzt, so daß das aus der pulmonalen Zirkulation kommende Perfusat ungehindert aus den Vv. pulmonales ablaufen konnte.
Die gesamte Präparation dauerte im Durchschnitt 20 Minuten.

2.1.3 Perfusions- und Flowsteigerungsphase

Sobald die Lunge in dem Organbehälter befestigt war, wurde der Flow sofort auf 50 ml/min gesteigert und von da an alle 4 Minuten um je 30 ml/min, so daß nach 20 Minuten der Endflow von 200 ml/min erreicht wurde, welcher in etwa dem Herzminutenvolumen eines Kaninchens in Ruhe entspricht. Das aus den Vv. pulmonales abfließende Perfusat wurde während der Flowsteigerungsphase verworfen, um die Rezirkulation von Blutzellbestandteilen und gebildeten Mediatoren (Thromboxan, Prostaglandine etc.) zu vermeiden. Nach Erreichen des Endflows wurde wiederum mit ca. 500 ml KHHP-Lösung nicht-rezirkulierend gespült.

Nachdem die Gewichtsregistrierung auf Null gesetzt und alle Statham-Druckwandler noch einmal abgeglichen worden waren, begann im Anschluß an die letzte Spülphase eine Steady-State-Phase von 30 Minuten Dauer. In dieser Zeit fand die Einstellung des pH-Wertes auf 7,3 - 7,4, wie in 2.1.6. beschrieben, statt, die für die Dauer des

Versuchs beibehalten wurde. Für die eigentlichen Versuche wurden nur solche Organe ausgewählt, die während dieser Periode ihr Gewicht minimal veränderten (Abweichung ±1 g vom Ausgangsgewicht) und einen konstanten pulmonal-arteriellen Druck (Abweichung <2 mmHg) aufwiesen. Außerdem mußten die sichtbaren subpleural gelegenen Parenchymteile homogen weißlich erscheinen, d.h. sie durften keine Anzeichen von hämorrhagischen bzw. nicht perfundierten Kapillarbezirken oder einer bereits bestehenden Ödembildung aufweisen. In Vorversuchen (n=6) konnte gezeigt werden, daß die Integrität der Mikrozirkulation und damit ein stabiles Lungenpräparat unter Perfusion mit KHHP-Lösung für 5 Stunden aufrecht erhalten werden konnte, wenn diese genannten Stabilitätskriterien erfüllt und keine weiteren experimentellen Veränderungen vorgenommen wurden. Licht- und elektonenmikroskopische Studien ergaben eine homogene kapilläre Organperfusion und zeigte keinerlei stukturelle Schäden des Endothels (hydropische Schwellungen, Vakuolisierung, Mitochondrienverlust) [68].

Im Anschluß an die stabile Steady-State-Phase begann mit der Leerwertabnahme der eigentliche jeweilige Versuch.

2.1.4 Extrakorporales Zirkulationssystem

Das Perfusionssystem setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen: Einem doppelwandigen Glasgefäß (Ströhmann Glastechnik, Herborn) mit einem Volumen von 250 ml, das als Vorrats- und Auffangbehälter für das rezirkulierende Perfusat diente, sowie dreier gleicher Gefäße, die über Dreiwegehähne parallel zum ersten geschaltet waren, und über die bei Bedarf in die Zirkulation frisches Perfusat abgegeben werden konnte. Von dem Hauptreservoirbehälter wurde das Perfusat mittels einer Rollenpumpe (BP 741 Fresenius Apparatebau, Bad Homburg) mit regulierbarer Förderleistung über

einen 40µm Filter (Pall Bluttransfusionsfilter®, Pall Corporation, NY, USA) und eine Blasenfalle durch den arteriellen Katheter in die Arteria pulmonalis gepumpt. Filter und Blasenfalle sollten korpuskuläre und gasförmige Embolien verhindern. Nach Passage der Lungenstrombahn tropfte das Perfusat aus den Vv. pulmonales in den Organbehälter und wurde von dessen Boden in das Hauptperfusatreservoir zurückgeführt.

Als Organbehälter diente eine feuchte doppelwandige Glaskammer (Stöhmann Glastechnik, Herborn). Sowohl diese, als auch die Perfusatbehälter wurden mittels eines Wasserthermostates (Thermomix UB, B.Braun, Melsungen) beheizt, um das Perfusat am distalen Ende des arteriellen Katheters auf einer Temperatur von 38,5°C zu halten. Das Schlauchsystem bestand aus Polyethylen- (Bentley By Pass® Tubings Inc.) und Silikonschläuchen (Deutsch&Neumann). Verbunden waren die einzelnen Segmente mit Polyethylen- und Polypropylen-Schlauchverbindern (Bürkle NeoPlast® oder Nalge Connectors®).

Während der Perfusion wurden fortlaufend pro Minute 10 ml Perfusat mittels einer Kassettenrollenpumpe (Ismatec Typ MS-CA2 840) aus dem arteriellen System abgezweigt und durch eine pH- und Temperatur-Meßkammer in den venösen Schenkel zurückgepumpt.

Alle Halterungen, Deckel für die Organ- und Perfusatgefäße sowie die pH-Meßkammer bestanden aus Polymethacrylat (Plexiglas® Röhm Industrie Darmstadt) und wurden selbst angefertigt.

Das gesamte Schlauchsystem wurde mehrfach wiederverwendet und deshalb nach Abschluß eines jeden Versuches zusammen mit den Glasbehältern mit 70°C heißer Mucapur®-Reinigungslösung rezirkulierend perfundiert, dann über eine halbe Stunde mit heißem Wasser und abschließend mit mehr als 20 l Aqua dest. gespült und mit Preßluft getrocknet. Vor Beginn eines neuen Versuches wurde das System nach dem Zusammenstecken wiederum für 30 min mit 40°C warmer 0,9% NaCl-Lösung, die mehrfach gewechselt wurde, rezirkulierend gespült.

2.1.5 Erfassung physiologischer Meßgrößen

Das Gewicht des Präparats wurde fortlaufend mit Hilfe einer elektronischen Wägezelle (Typ U1, Meßbereich 0 - 500g, Auflösung 0,01g) mit nachgeschaltetem Meßverstärker (KWS3073, Hottinger-Baldwin Messtechnik, Darmstadt) gemessen.

Die Druckmessung in der Arteria pulmonalis erfolgte über einen kleinen Polyethylen-Innenkatheter (Ø 0.5/1.0 mm), der im Perfusionskatheter lag und seine Öffnung auf gleicher Ebene im Truncus pulmonalis hatte. Dieser Innenkatheter war über konventionelle Druckmeßleitungen mit Statham-Druckwandlern (PD 23, Hato Rey, Puerto Rico) verbunden. Die Druckdome waren mit Aqua dest., die Innenkatheter und Druckleitungen luftblasenfrei mit 0.9% NaCl-Lösung gefüllt.

Der pH-Wert und die Temperatur wurden mit Eintauchelektroden (pH-Einstabmeßkette E56 und Temperaturfühler TFK150, WTW, Weilheim) gemessen und auf einem pH-Meter (Typ pH537, WTW, Weilheim) angezeigt.

Der pulmonalarterielle Druck, das Gewicht sowie der pH-Wert wurden kontinuierlich auf einem Sechs-Kanal-Kompensations-schreiber (R-10 Series, Rikadenki, Freiburg) aufgezeichnet. Daneben wurden diskontinuierlich in festgelegten Zeitabständen aus Perfusatproben mit einem Blut-Gas-Analysator (ABL300, Radiometer, Kopenhagen) die Werte für physikalisch gelösten Sauerstoff, Kohlendioxid, Standardbicarbonat, Base-Excess und pH bestimmt.

2.1.6 Beatmung und pH-Wert-Einstellung

Für die maschinell kontrollierte Ventilation wurde, wie bereits oben erwähnt, eine volumenkonstant arbeitende Kolbenpumpe (Starling-pumpe Typ 874072, B.Braun, Melsungen) verwendet. Zur Gasversorgung diente Raumluft, der nach Bedarf O_2, N_2 und CO_2 aus Gasvorratsflaschen nach Reduktion des Flaschendruckes über Vorventile mit Hilfe von Nadelventilen und Flowmetern (Rotameter®

MFG. Co., LTD England) feindosiert beigemischt wurden. Die Atemfrequenz betrug 30 Hübe/min, das Atemzugvolumen 25 ml/Hub und das resultierende Atemminutenvolumen 750 ml/min. Das Inspirations-/Exspirationsverhältnis betrug 1:1. Diese Atemparameter wurden von der Intubation bis zum Ende des Versuchs beibehalten. Variiert wurden lediglich die Zusammensetzung des Gasgemisches und der PEEP, der notwendig war, um die Lunge ausreichend zu entfalten und einer Atelektasenbilung entgegenzuwirken.

Während der Präparationsphase wurden die Tiere mit einer inspiratorischen Sauerstoffkonzentration von 50% und einem PEEP von maximal 0,5 cm Wassersäule beatmet. Die während der Präparation entstandenen Atelektasen wurden durch (teilweise mehrmalige) Kompression des Expirationsschenkels des Beatmungsschlauches zur Entfaltung gebracht. Um deren weitere Ausbildung im Verlauf des Versuches entgegenzuwirken, wurde ein positiver endexpiratorischer Druck von 0,5 - 1,5 cm Wassersäule mit Hilfe eines PEEP-Ventils aufgebaut. Während der Versuchsphase wurde die Lunge dann mit Raumluft ventiliert

Die Regulation des pH-Wertes der Perfusionsflüssigkeit auf einen Wert zwischen 7,3 und 7,4 erfolgte durch Beimischung von 5 - 40 ml CO_2/min zum Beatmungsgas.

2.2 Das Modell der isoliert perfundierten Kaninchenlunge — “geschlossenes” System

Das Prinzip des “geschlossenen” Systems besteht darin, daß das Perfusat im venösen Schenkel nicht aus den Vv.pulmonales abtropft, sondern über einen im linken Vorhof liegenden Katheter direkt dem Hauptperfusatreservoir zugeführt werden kann. Somit besteht die Möglichkeit den pulmonal-venösen Druck zu beeinflussen.

2.2.1 Verwendetes Tiermodell

Es wurden Tiere wie in 2.1.1 beschrieben verwendet.

2.2.2 Präparation und Organentnahme

Die Präparation erfolgte bis zur Ligatur des Truncus pulmonalis in der gleichen Weise wie in 2.1.2 bereits beschrieben. Anschließend wurde die Aorta ascendens dargestellt und lose ligiert. Nach Einführen des Pulmonalis-Katheters wurde der Perfusatflow sofort durch Abschalten der Pumpe unterbrochen.

Die Kanülierung des linken Vorhofes erfolgte über eine Inzision der Aortenwand im Beginn des Aortenbogens. Mit einer kleinen Pean-Klemme wurde der Aortenklappenring durch Spreizung der Branchen gedehnt, nachdem sie retrograd eingeführt worden war. Nun wurde ein Silikonkatheter mit einem geraden, 4 cm langen, an der Spitze mehrfach gefensterten Polyethylenkopfstück (Ø 4,0/6,0 mm innen/außen) auf dem gleichen Weg über den linken Ventrikel in den Linken Vorhof plaziert und mit dem Ligaturfaden in der Aorta ascendens fixiert. Anschließend wurden beide Ventrikel knapp unterhalb der Klappenebene mit einer Ligatur abgebunden, um ein Weiterschlagen des Myokards, eine Flüssigkeitsansammlung in den

Ventrikeln und eine Dislokation der Katheterspitze zu verhindern. Die weitere Präparation erfolgte wie in 2.1.2 beschrieben. Das Herz wurde jedoch nicht abgesetzt. Die Ischämiezeit bis zum Wiedereinsetzen des Flow betrug durchschnittlich 8 Minuten.

2.2.3 Perfusions- und Flowsteigerungsphase

Im Unterschied zu 2.1.3 begann die Flowsteigerung bei 0 ml/min. Die Steigerung wurde ebenfalls alle 4 Minuten mit je 30 ml/min durchgeführt, so daß der Endflow (200 ml/min) nach etwa 24 Minuten erreicht war.

2.2.4 Extrakorporales Zirkulationssystem

Beim “geschlossenen” System floß das Perfusat nach Passage der Lungenstrombahn über den linken Vorhof und den venösen Katheter über eine höhenvariable “Kaskade”. Da letztere eine offene Verbindung zur Atmosphäre besaß, konnte mit der Höhe der Aufhängung der “Kaskade” eine entsprechende hydrostatische Druckbelastung auf pulmonal-venöser Ebene erfolgen.

2.2.5 Erfassung physiologischer Meßgrößen

Beim “geschlossenen” System wurde zusätzlich der venöse Druck gemessen. Die Technik der venösen Druckmessung ist identisch mit der der arteriellen. Der venöse Druck wurde ebenfalls vom Sechs-Kanal-Kompensationsschreiber aufgezeichnet.

2.2.6 Gravimetrische Bestimmung des kapillären Filtrations-Koeffizienten (K_{fc})

Der Bestimmung des K_{fc} zur Beurteilung der mikrovaskulären Permeabilität der Lungenstrombahn lag folgendes Verfahren zugrunde. Entsprechend dem Versuchsprotokoll wurde zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf der Experimente eine akute hydrostatische Druckbelastung von 7 mmHg für jeweils 7 Minuten auf den venösen Schenkel durchgeführt. Zur Berechnung wurde die Steigung der Lungengewichtsveränderung pro Zeiteinheit während dieser Erhöhung des venösen Abflußdruckes bestimmt [30, 35]. Vorversuche (n=6) hatten im Vergleich mit Kontroll-Lungen ohne diese Drucksteigerungen gezeigt, daß dieses Verfahren der venösen Druckerhöhung zu keiner Veränderung des Gewichtes im weiteren Verlauf der Perfusion führte. Sowohl der Perfusatfluß als auch de Beatmungsparameter wurden während der hydrostatischen Druckbelastung unverändert beibehalten.

Die Gewichtsveränderung nach Anheben des venösen Druckes konnten in eine schnelle Phase als Ausdruck der anfänglich dominierenden druckbedingten Steigerung der Gefäßbettfüllung von maximal einer Minute Dauer und in eine langsame gleichmäßige Filtationsphase über die restlichen 6 Minuten unterteilt werden. Der initiale Gewichtssprung während der ersten Minute nach Beginn der venösen Druckbelastung , der mit dem Ausmaß der Auslagerung nach Beendigung der Stauung korrelierte, wurde der Gefäßbettdilatation [106] zugerechnet. Nur die anschließende 6-minütige Phase der Flüssigkeitseinlagerung wurde zur Errechnung des K_{fc}-Wertes herangezogen. Dazu wurden nach jeder Druckanhebung Tangenten an den entsprechenden Teil der Gewichtskurve gelegt und der Gewichtsanstieg pro Zeiteinheit aus der Steigung ermittelt. Die so gewonnen Werte der Gewichtsveränderung pro Zeit für die Erhöhungen des venösen Abflußdruckes wurden gegen den kalkulierten pulmonal-kapillären Druck (PCP) graphisch aufgetragen und die lineare

Regressionsgerade bestimmt. Der pulmonal-kapilläre Druck wurde hierzu nach einer Formel von Drake et al. [29] berechnet:

PCP=PVP+0.44(PAP-PVP)

(PAP: pulmonal-arterieller Druck, PVP: pulmonal-venöser Druck).

Der kapilläre Filtrationskoeffizient für jede untersuchte Lunge ergab sich aus der Steigung der linearen Regressionsgeraden bezogen auf 100 g Lungenfeuchtgewicht und wurde in der Einheit ml/min/mmHg/100g ausgedrückt. Unter der Voraussetzung einer gleichmäßigen Dichte des Filtrats wurde das Feuchtgewicht der Lungen durch Multiplikation des Körpergewichtes (g) der Spendertiere mit dem Faktor 0,0024 errechnet. Dieser Faktor beschreibt das Verhältnis zwischen Körpergewicht der Kaninchen (gleiche Zucht, gleiches Alter) und deren Lungengewicht abzüglich des vaskulären Volumens, welches durch vorherige Applikation von ^{125}I-Albumin [21] ermittelt worden ist. Die Berechnung des Lungenfeuchtgewichtes erwies sich als weit zuverlässiger als das Rückrechnen auf das individuelle Ausgangsgewicht der Lungen nach passiver Drainage und anschließendem Wiegen der Präparate am Versuchsende.

$$\mathbf{K_{fc}} = \text{Filtration (g x min}^{-1}) \times \text{PCP (mmHg)}^{-1} \times \text{Lungenfeuchtgewicht (KG (g) x 0.0024)}^{-1}$$

2.3 Verwendete Materialien

2.3.1 Perfusionsmedium

“Halboffenes” System:

Als Perfusionsflüssigkeit diente jeweils frisch angesetzter zell- und plasmafreier Krebs-Henseleit-Puffer (KHP), dem zusätzlich zur Steigerung des kolloidosmotischen Druckes Poly-(0-2-hydroxyethyl)-stärke zugesetzt wurde (KHHP)

Die Bestandteile für 1000 ml KHHP sind:

650 ml HAES-steril® 10%

200 ml einer Elektrolytlösung (NaCl 9.78 g
KCl 0.98 g
KH_2PO_4 0.45 g
$MgCl_2$ 0.81 g
$CaCl_2$ 1.05 g
Aqua dest. ad 1000 ml)

115 - 135 ml Natriumbikarbonat 0,9 %

25 ml Glucose 10 %

so, daß folgende Endkonzentrationen resultieren:

Na^+	138	mmol/l	Mg^{2+}	1.33	mmol/l
K^+	4,5	mmol/l	Ca^{2+}	2,38	mmol/l
Cl^-	135	mmol/l	P	1.1	mmol/l
Stärke	65	g/l	Glucose	12	mmol/l

Der osmotische Druck betrug etwa 330 mosmol/l.

Das Perfusat wurde mittels 0,9 %iger Natriumbikarbonatlösung auf einen pH-Wert von 7,3 - 7,4 und einem Mindestbikarbonatgehalt >12 mmol/l eingestellt (ABL 330, Radiometer, Kopenhagen).

“Geschlossenes” System:

Hier wurde dieselbe Lösung wie in 2.4.2 (KHHP) mit Human-Albumin (Human-Albumin 20% Behring®) versetzt, so daß eine Endkonzentration von 2% Human-Albumin entstand. Aus ökonomischen Gründen wurde das Human-Albumin erst bei bereits isolierter Lunge unmittelbar vor der Steady-State-Phase und nach der letzten Spülphase dem zirkulierenden Perfusat in entsprechender Menge beigemischt.

2.3.2 Verwendete Substanzen

2.3.2.1 Arzneimittel

Xylocain®, Lidocainhydrochlorid, Astra GmbH, Wedel

Liquemin®N, Heparin-Natrium Hoffmann-LaRoche AG, Genzach-Wyhlen

Nembutal®, Pentobarbital-Natrium, Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG, Hannover

2.3.2.2 Infusionslösungen

Aqua destillata (Aqua ad injectabilia), Pharmacia&Upjohn AS, Halden, Norwegen

Glucose 10%, B.Braun, Melsungen

Isotonische NaCl-Lösung, Pharmacia&Upjohn AS, Halden, Norwegen

HAES-steril® 10%, Poly(0-2-hydroxyethylstärke, Fresenius AG, Bad Homburg

Human-Albumin 20% Behring®, Behringwerke AG, Marburg

2.3.2.3 Sonstige

Endothelin-1, Alexis Corp., Läuflingen, Schweiz

2.4 Versuchsaufbau

2.4.1 Versuchsserien

38 Lungenpräparate wurden auf 6 Versuchsserien verteilt. Eine Dosis-Wirkungs-Studie zum Effekt von ET-1, am „halboffenen“ System durchgeführt, wurde an den Versuchsserien 1 – 4 erarbeitet. Die Serie 0 beinhaltet als Kontrollserie Vorversuche ohne Applikation von ET-1 bzw. Kontrollversuche die in regelmäßigen Abständen innerhalb der Serien 1 - 4 durchgeführt wurden.

Serie 0: Kontollversuche ohne Endothelin (n=11)

Serie 1: 10^{-6} M ET-1-Endkonzentration (n=6)

Serie 2: 10^{-7} M ET-1-Endkonz. (n=6)

Serie 3: 5 x10^{-8} M ET-1-Endkonz. (n=12)

Serie 4: 10^{-8} M ET-1-Endkonz. (n=2)

Die Versuchsserien 5 und 6 wurden zur Bestimmung des K_{fc} (s. 2.2.6.) am „geschlossenen” System durchgeführt. In **Serie 5** (n=6) erfolgte die Gabe von ET-1 (Endkonzentration: 5 x 10^{-8} M), während **Serie 6** (n=6) die Kontrollserie ohne ET-1 darstellt.

2.4.2 Versuchsdurchführung

Serie 1 - 4:

Nachdem die Lungen die Steady-State-Phase von 30 Minuten stabil durchlaufen hatten, wurde zum Zeitpunkt 0 min eine Perfusatprobe von 4 ml zur Bestimmung der Ausgangswerte entnommen und direkt danach 1 ml ET-1-Lösung in entsprechender Konzentration als Bolus in den arteriellen Schenkel des Systems injiziert. Jeweils nach 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 150 und 180 Minuten wurden Perfusatproben entnommen. Der Beobachtungszeitraum betrug 180 Minuten. Eine Übersicht zeigt Abbildung 2. Eine Erhöhung des PAP über 20 mmHg oder ein Anstieg des Lungengewichtes um über 20 g führte zum

vorzeitigen Versuchsabbruch.

Während des gesamten Versuches wurden fortlaufend pH-Wert, PAP und Gewichtszunahme registriert sowie die jeweils gewonnen Proben auf ihren pH-, pCO_2-, pO_2-Wert und ihre 0_2-Sättigung kontrolliert (s. 2.1.5.).

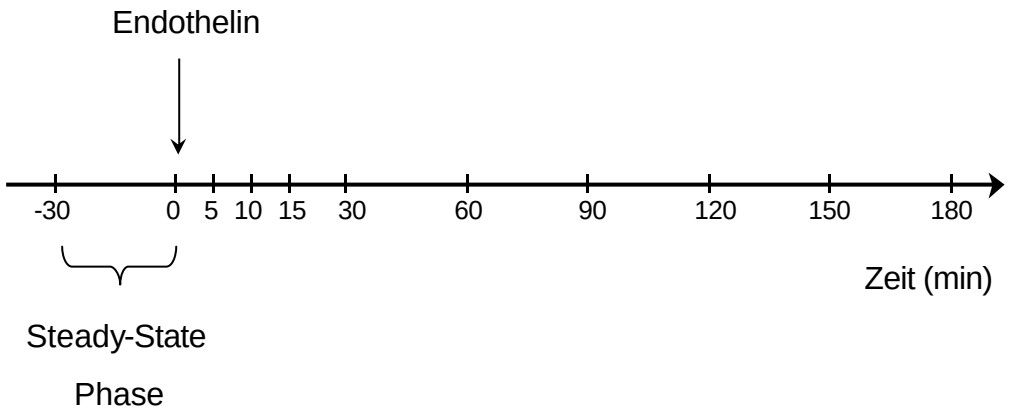

Abb. 2: Zeitplan der Serien 1 - 4.

Die Markierungen von 0 bis 180 min zeigen die Perfusat-probenentnahmen an.

Serie 5:

Die Versuche begannen ebenfalls nach der Steady-State-Phase mit der Entnahme einer 4-ml-Probe zum Zeitpunkt 0 min. Weitere Perfusatproben folgten nach 10, 30, 60, 90 und 120 Minuten, um, identisch wie in den Serien 1 - 4, pH- und Blutgasmessungen durchzuführen. Unmittelbar nach der 0-, 30-, 60-, 90- und 120-Minuten-Entnahme wurde der pulmonal-venöse Druck (PVP) für 7 Minuten von 0 auf 7 mmHg angehoben. In diesen Zeiträumen konnte somit der in

2.2.6 beschriebene kapilläre Filtrationskoeffizient (K_{fc}) bestimmt werden. Unmittelbar nach der 10-Minuten-Entnahme, also nach der Bestimmung des Ausgangs-K_{fc}, wurde 1 ml ET-1-Lösung wie in den Serien 1-4 injiziert. Eine Übersicht dazu zeigt Abbildung 3. Die ET-1-Konzentration dieser Lösung betrug 10^{-5} M, so daß eine Endkonzentration (in 200 ml Perfusat) von $5x10^{-8}$ M resultierte. Die Kontrolle der physiologischen Parameter erfolgte ebenfalls wie in den Serien 1 - 4.

Serie 6 wurde wie Serie 5 durchgeführt, jedoch ohne ET-Gabe.

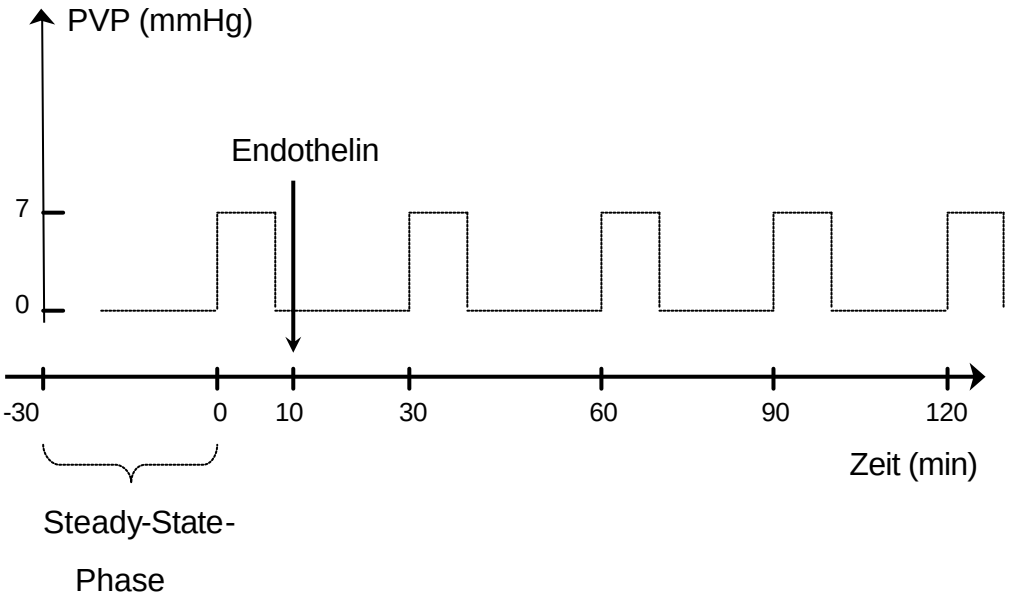

Abb. 3: Zeitplan der Serie 5.

Der PVP wird alle 30 min für 7 min um 7 mmHg angehoben. Ebenfalls werden Perfusatproben an den Markierungen 0 bis 120 min entnommen.

2.5 Statistik

Die Ergebnisdaten der Messungen aus den Versuchsserien 0 – 6 sind als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. Die in den Serien 5 und 6 notwendige statistische Vergleichsanalyse wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test durchgeführt, wobei eine Signifikanz bei $p < 0,05$ angenommen wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Halboffenes System

Nach der 30-minütigen Steady-State-Phase begannen die Versuche zum Zeitpunkt 0 min. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die erste Perfusatprobe und unmittelbar anschließend die Gabe von Endothelin als Bolus. Die aufgeführten Meßzeitpunkte stehen stellvertretend für eine kontinuierliche Messung des PAP und der Gewichtsänderung. Ebenfalls erfolgten zu diesen Zeitpunkten weitere Abnahmen von Perfusatproben. Die vor und nach der Gabe von Endothelin gemessenen pH-, pCO_2 - und pO_2-Werte sowie die Sauerstoffsättigung blieben zumindest bis zur massiven Ödembildung nahezu konstant. Die jeweils in den Serien 0 – 4 bestimmten Mittelwerte der pulmonalarteriellen Drücke nach Ende der Steady-State-Phase lagen zwischen 6,5 und 9,5 mmHg, übereinstimmend mit Ergebnissen aus weiteren Arbeiten [68, 69].

Die im Folgenden angegebenen Druck und Gewichtswerte zeigen jeweils die Veränderung in Bezug auf die Basalwerte.

3.1.1 Änderung des PAP

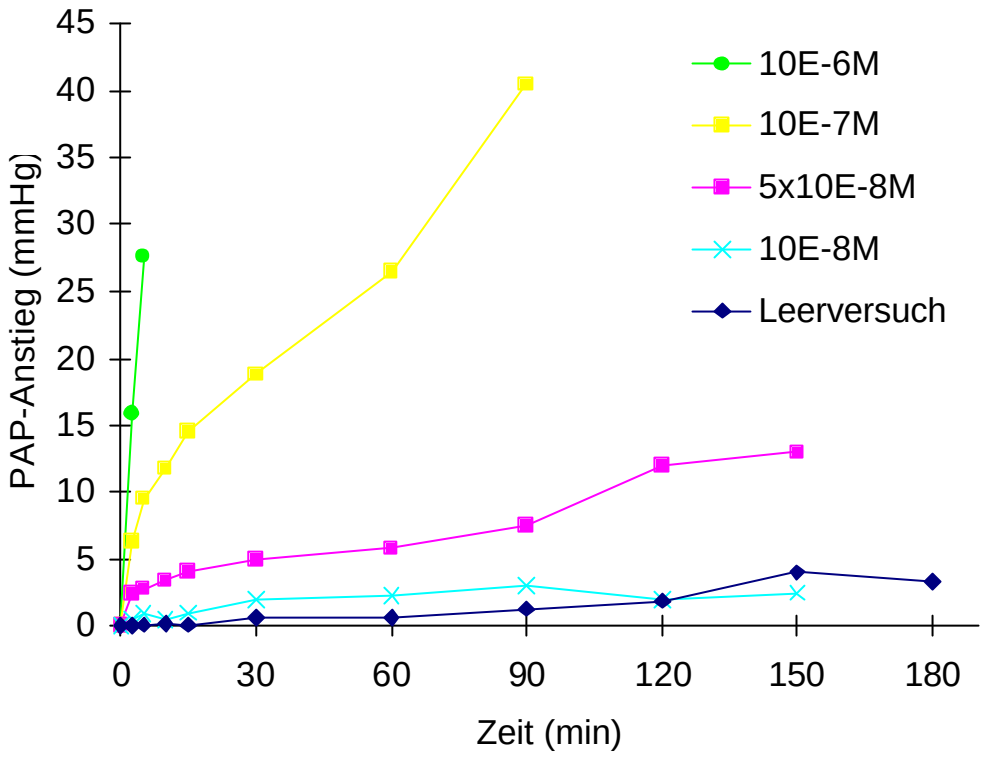

Abb. 4: Unmittelbare pulmonal-arterielle Duckreaktion bei allen Versuchen mit ET.

Die nach Bolusinjektion von Endothelin aufgetretenen Effekte bestanden vor allem in einer unmittelbaren Druckreaktion. In den Serien 1 und 2 mußten alle Versuche aufgrund zu starker Druckerhöhung und Ödembildung vorzeitig abgebrochen werden. In Serie 3 war der vorzeitige Abruch (nach Ablauf von 150 min) bei 5 von 12 Versuchen notwendig.

Zwischen Serie 4 und der Kontrollgruppe war bis auf den geringen initialen PAP-Anstieg kein wesentlicher Unterschied erkennbar.

Angemerkt werden muß noch, daß innerhalb von etwa 150 Versuchen 2

„Non-Responder“ auftraten. Materialfehler konnten hier jedoch nicht ganz ausgeschlossen werden.

3.1.2 Änderung des Lungengewichtes

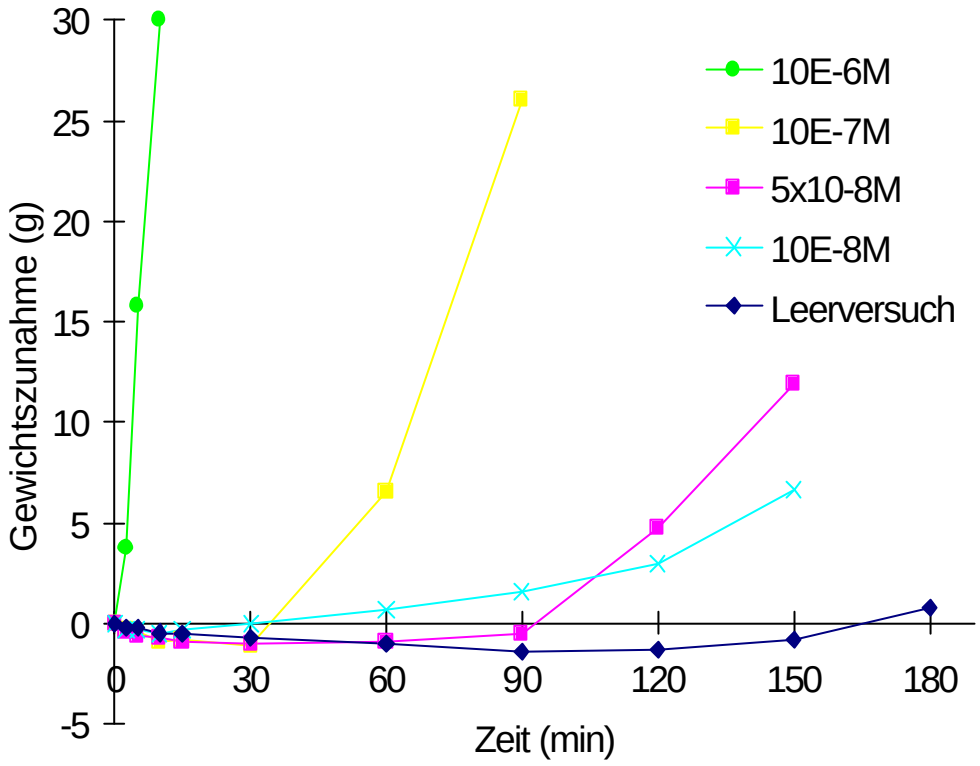

Abb. 5: Nach initialer Gewichtsabnahme tritt im Verlauf bei allen Serien mit ET ein Anstieg des Lungengewichtes auf.

Initial kam es bei allen Versuchen zu einem geringen Gewichtsverlust der Kaninchenlungen. In Serie 1, mit der höchsten Endothelinkonzentation, kam es unmittelbar und gleichzeitig einhergehend mit der PAP-Erhöhung zum massiven Gewichtsanstieg. In den anderen Serien war eine Latenzzeit vom Zeitpunkt der

Bolusgabe bis zum Beginn des Gewichtsanstiegs deutlich erkennbar und ebenfalls deutlich von der verwendeten ET-Konzentration abhängig. Durchschnittlich wurde eine Gewichtszunahme von über 10 g in Serie 2 zwischen 60 und 90 min erreicht; in Serie 3 zwischen 120 und 150 min und in Serie 4 bei mehr als 150 min. Die Kontrollserie zeigte allenfalls gegen Ende des Versuches geringgradige Gewichtszunahmen.

3.2 Geschlossenes System

Nach der 30-minütigen Steady-State-Phase begann der Versuch mit dem Zeitpunkt 0 min. Die der Ermittlung des K_{fc} dienende Erhöhung des PVP zum Zeitpunkt 0, 30, 60, 90 und 120 min für jeweils 7 min führte regelmäßig zum gleichzeitig auftretenden Anstieg des PAP sowie des Lungengewichtes. Die in diesem Zusammenhang auftretenden Veränderungen der Druck- und Gewichtskurve kommen aus Gründen der besseren Übersicht in folgenden Diagrammen nicht zur Darstellung. Ebenfalls beachtet werden muß, daß die ET-Gabe als Bolus mit $5x10^{-8}$ M Endkonzentration (Serie 5) erst nach Bestimmung der Ausgangsparameter zum Zeitpunkt 10 min erfolgt.

Die Ausgangswerte des PAP waren in den Serien 5 und 6 ähnlich (Serie 5: 8,0 ± 0,6 mmHg, Serie 6: 8,8 ± 0,5 mmHg). Der Ausgangs-K_{fc} zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen (Serie 5: 0,29 ± 0,03 g x min^{-1} x $mmHg^{-1}$ x $100g^{-1}$, Serie 6: 0,21 ± 0,03 g x min^{-1} x $mmHg^{-1}$ x $100g^{-1}$).

Sämtliche folgende Daten sind als innerhalb der Serien ermittelte Mittelwerte ± Standardfehler in Diagrammen dargestellt.

3.2.1 Änderung des PAP

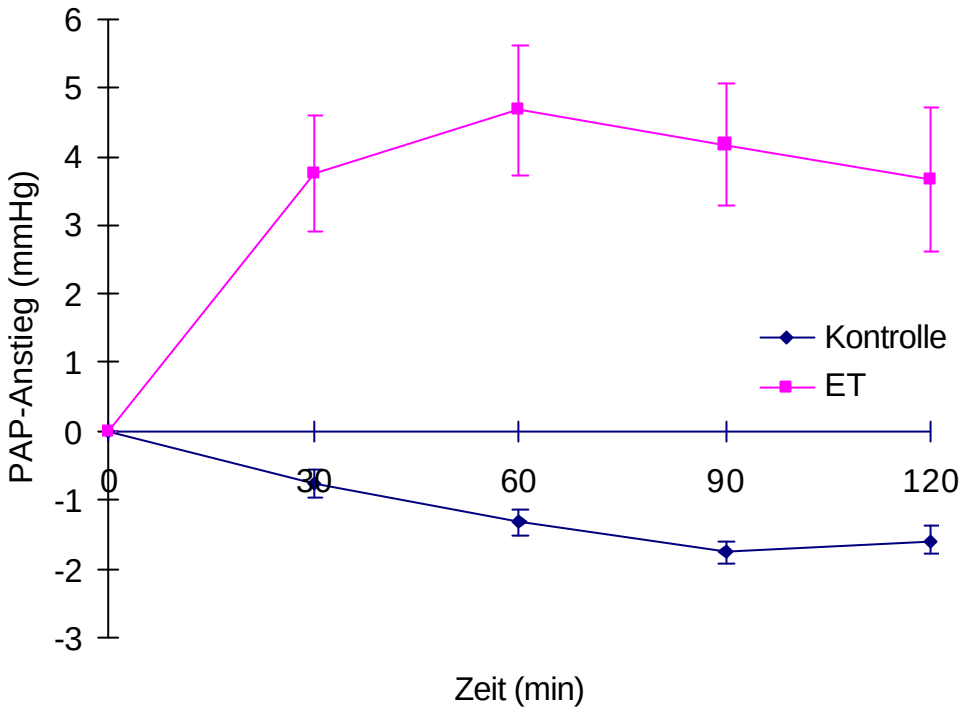

Abb. 6: Nach ET-Gabe in Serie 5 deutlicher Anstieg des PAP im Vergleich zur Kontrollgruppe (Serie 6).

Wie bereits in den Untersuchungen am „halboffenen“ System zeigte sich bei ähnlichem Ausgangswert nach ET-Gabe in beiden Serien ein Anstieg des PAP, der zu jedem der dargestellten Zeitpunkte (30, 60, 90 und 120 min.) deutlich signifikant war ($p<0,001$).

3.2.2 Änderung des Lungengewichtes

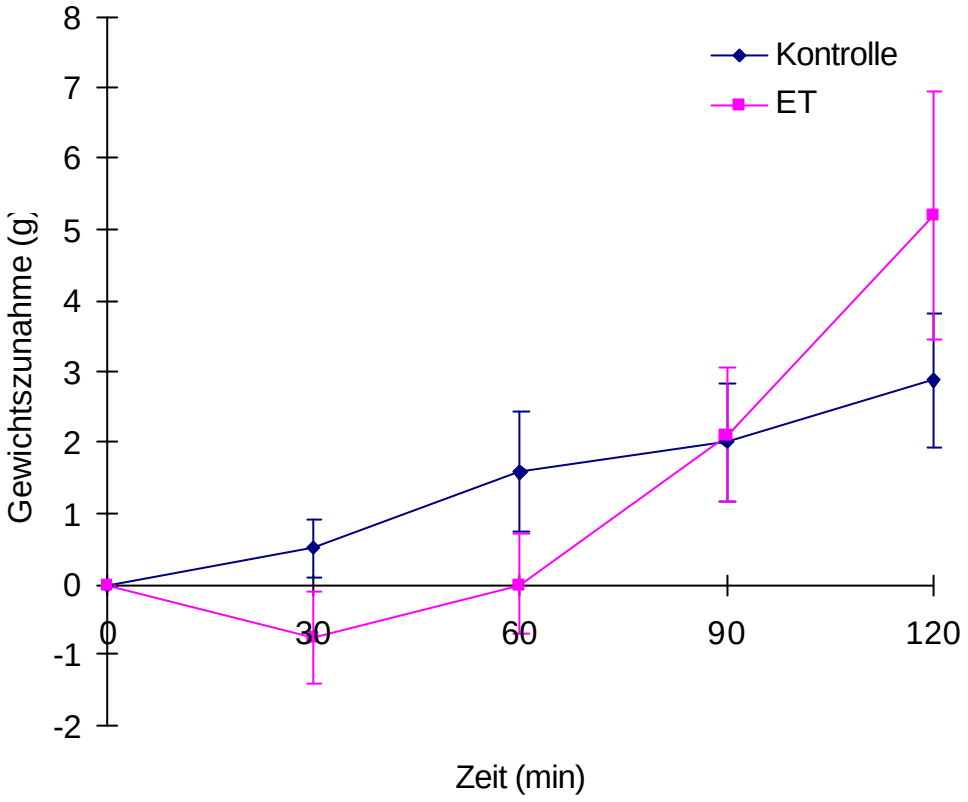

Abb. 7: Nach ET-Gabe (Serie 5) zunächst leichter Abfall des Lungengewichtes. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (Serie 6) nach 120 Minuten höhere Gewichtszunahme.

Zeitlich einhergehend mit dem Anstieg des PAP erfolgt nach ET-Gabe zunächst ein schneller, im Diagramm aufgrund der großen Abstände der Zeitpunkte nicht gut darstellbarer Abfall des Lungengewichtes bis auf –0,75 g bei 30 min. Das absolute Lungengewicht weist somit im Vergleich zur Kontrollgruppe einen Unterschied von 1,25 g nach 30 min und von 1,6 g nach 60 min auf. Nachdem bei 90 min in beiden Gruppen praktisch kein Gewichtsunterschied besteht, kommt es in der ET-Gruppe schließlich zum signifikanten Gewichtsanstieg bei 120 min,

welcher 5,4 g im Vergleich zu 2,8 g beträgt ($p<0,05$).

Betrachtet man nur den Gewichtsanstieg zwischen 60 und 120 min, so beträgt dieser 5,1 g in Serie 5 gegenüber 1,2 g in Serie 6 und zeigt damit einen noch deutlicheren Unterschied.

Dieser Gewichtsanstieg steht für eine vermehrte Flüssigkeits-einlagerung in den interstitiellen Raum der Lunge.

3.2.3 Kapillärer Filtrationskoeffizient (K_{fc})

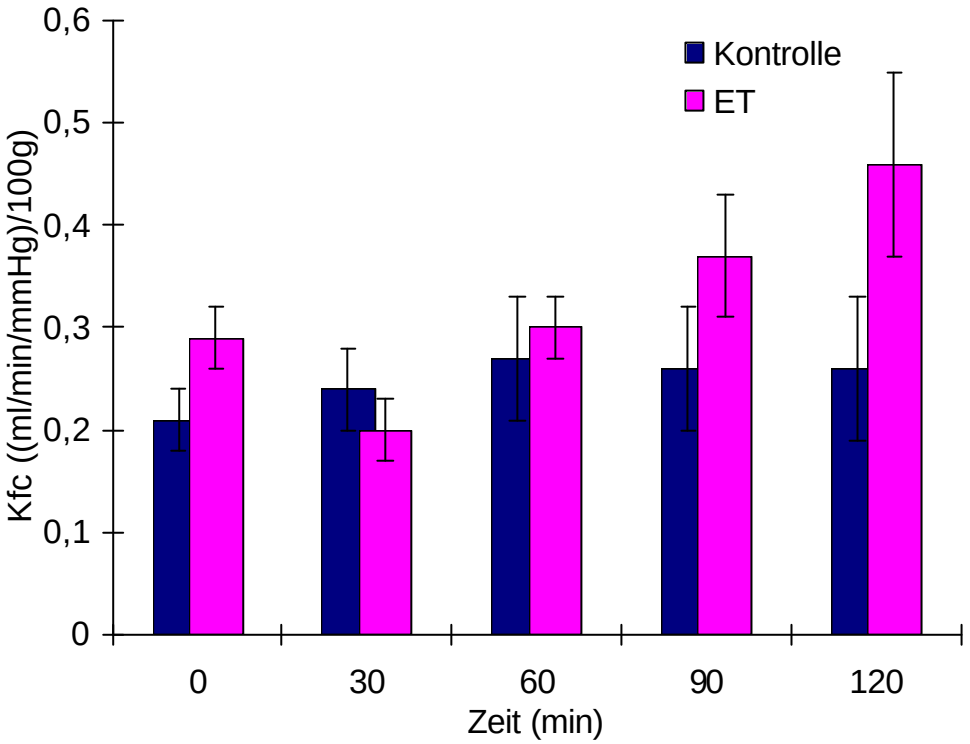

Abb. 8: Leichter, nicht signifikanter Anstieg des K_{fc} nach Gabe von ET-1 im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die ET-Gabe in Serie 5 führt bei annähernd gleichem Ausgangswert nur zu einem geringen Anstieg des K_{fc}. Zu keinem Zeitpunkt kam es jedoch vergleichend zu einer signifikanten Änderung ($p<0,05$) der Kapillarpermeabilität, die nur durch den kapillären Fitrations-koeffizienten und nicht durch die alleinige Messung der Flüssigkeitseinlagerung, welche für sich genommen stark vom Filtrationsdruck abhängt, bestimmt wird.

4 Diskussion

4.1 Allgemeines

Die Entdeckung der vasoaktiven Peptide aus der Familie der Endotheline (ET-1, -2 und -3) führte trotz intensiver wissenschaftlicher Bemühungen in den letzten Jahren nur zu einem unzureichenden Gesamtbild, was deren physiologische und pathophysiologische Bedeutung im Gesamtorganismus und an einzelnen Organen betrifft.

An der Lunge legt das bislang bekannte Wirkungsprofil einen Zusammenhang mit verschiedenen Krankheitsbildern nahe. Tatsächlich konnten bei Patienten mit zum Beispiel ARDS [32, 73, 110], primärer pulmonaler Hypertonie [15] oder akutem Höhenlungenödem [31, 111] erhöhte Plasma-Endothelin-Spiegel nachgewiesen werden.

Endothelin scheint auf humoraler und zellulärer Ebene vielfältig zu interagieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden an mit zell- und plasmafreien Krebs-Henseleit-Hydroxyethylstärke-Puffer perfundierten isolierten Kaninchenlungen die Effekte von Endothelin-1 auf das pulmonale Gefäßsystem untersucht. Das Prinzip der isolierten Tierlunge ist seit mehreren Jahren ein, teilweise in Modifikationen, häufig beschriebenes und etabliertes Versuchsmodell [113, 108]. Einflüsse von Blutzell- und Blutplasmabestandteilen können hier ebenso wie Einflüsse des Restorganismus (z.B. endokrinologische, metabolische) bei ansonsten annähernd physiologischen Bedingungen weitgehend aufgehoben werden.

4.2 Vaskuläre Effekte, Dosierungen und Übertragbarkeit auf den menschlichen Organismus

Sowohl im halboffenenen als auch im geschlossenen System zeigte sich an der isolierten Kaninchenlunge in allen Versuchen nach Bolusgabe von ET-1 ein unmittelbarer, anhaltender Anstieg des pulmonal-arteriellen Widerstandes. In den Serien 1 – 4 war eine deutliche Dosisabhängigkeit erkennbar. Ebenfalls war das Ausmaß und die Steilheit des Anstieges innerhalb der Serien gut reproduzierbar. Die regelmäßig abgenommenen Perfusatproben zeigten keine Veränderung im pH-, pO_2-, und pCO_2-Wert sowie in der Sauerstoffsättigung, so daß diese Faktoren nicht für die Druckreaktion verantwortlich zu sein scheinen.

Mit einer ET-1-Konzentration von $5x10^{-8}$ M konnten reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden, da ET-1 in dieser Konzentration deutliche Effekte zeigte, nicht aber den unmittelbaren Abbruch der Versuche erzeugte.

Nach den vorliegenden Dosis-Wirkungs-Studien kann eine Wirkungsschwelle angenommen werden, die etwas unterhalb einer ET-1-Konzentration von 10^{-8} M liegt.

Zahlreiche Studien bestätigen sowohl an der Lunge, wie auch an anderen Organen, den vasokonstriktorischen Effekt von ET-1. An der Lunge wurden dabei an verschiedenen Arten von Versuchstieren als Modell sowohl isolierte Lungengefäßringe, isolierte perfundierte Lungen oder das Ganztier mit Lunge in situ verwendet.

Bei Versuchen an der isolierten Rattenlunge [55, 107] zeigte sich eine Wirkungsschwelle bei einer ET-1-Konzentration von 10^{-9} M bis 10^{-10} M, was unseren Ergebnissen entspricht. An einzelnen Pulmonalarterienringen von Ratten [79, 107] konnte ebenfalls eine Schwellendosis im selben Bereich ausgemacht werden. Auch an

Gefäßringen von Meerschweinchenpulmonalarterien lag die Schwellendosis zwischen 10^{-9} M und $10^{-9,5}$ M [19]. Cardell et al. konnten in diesen Versuchen bezüglich Schwelle und Wirkungsstärke eine höhere Sensibilität von kleineren im Vergleich zu größeren Gefäßen erkennen. Versuche an kanülierten Kaninchenlungen in vivo wurden von Lippton et al. [77] durchgeführt. Hier lag die Schwellendosis bei 0,1 µg ET-1, was umgerechnet (1 mol ET-1 entspricht 2492 g) ebenfalls den obigen Zahlen entspricht. Auch an größeren Versuchstieren wie Katze, Hund, Schaf oder Schwein konnte eine vasokonstriktorische Wirkung am pulmonal-arteriellen System nachgewiesen werden [66, 6, 20, 52], die beim Hund jedoch vergleichsweise schwach ausgeprägt war.
Insgesamt wird bei Tierversuchen eine vasokonstriktorische Wirkung an vielen organspezifischen Gefäßsystemen wie Gehirn, Herz, Niere oder Splanchnikusgebiet beschrieben [121, 53, 100, 130].

Versuche mit Endothelin am lebenden Menschen in Zusammenhang mit der pulmonalen Zirkulation sind bisher nicht bekannt. Eine der wenigen Untersuchungen an Menschen stammen von Dahlöf et al. [25] und Pernow et al. [101]. Hierbei erfolgten intraarterielle ET-1-Infusionen über die A. brachialis, wobei es zur plethysmographisch gemessenen deutlichen Abnahme der Unterarmdurchblutung und dem daraus errechneten Anstieg des vaskulären Widerstandes kam. Die verwendeten Dosen lassen sich, sofern die methodischen Unterschiede dies zulassen, annähernd mit den von uns verwendeten vergleichen. Angemerkt werden kann noch, daß von Pernow et al. die Wirkpotenz als 10 – 20-fach stärker als die von Noradrenalin beschrieben wird.
Weiter wurden von McCulloch et al. [85] menschliche Arterien und Arteriolen untersucht, welche bei Lungenoperationen bei Carcinom entnommen und nach Kühlung innerhalb weniger Stunden verbraucht

wurden. Beginnende Kontraktionen der Gefäßringe konnten zwischen 10^{-11} und 10^{-9} M festgestellt werden, so daß die ET-Wirkung bei Tierversuchen, insbesondere bei dem von uns verwendeten Kaninchenmodel, mit der am Menschen vergleichbar erscheint. Unterschiede konnten Fukuroda et al. [43] aufzeigen, der die ET-Rezeptorenverteilung von Kaninchenlungenarterien mit entsprechenden menschlichen Gefäßen verglich. Das Verhältnis ET_A- zu ET_B-Rezeptoren lag beim Mensch bei 93:7 bzw. 23:77 beim Kaninchen. Dieser Unterschied, zumindest isoliert betrachtet, könnte die Übertragbarkeit vom Tierversuch auf den Menschen wesentlich beeinflussen, da ET_B-Rezeptoren zusätzlich eine vasodilatierende Wirkung haben können.

Im Gegensatz dazu zeigen verschiedene Arbeiten eine vasodilatatorische Wirkung von Endothelinen [48, 33, 76, 77, 24, 20]. Diese scheint jedoch, zumindest an der Lunge, abhängig vom vorbestehenden Gefäßtonus zu sein. Hasumuma et al. und Eddahibi et al. konnten an der isolierten Rattenlunge, Lippton et al. an der Katzen- und Kaninchenlunge in vivo und Cassin et al. an einer Schafsfötuslunge in situ eine deutliche arterielle Gefäßerweiterung bei bestehender hypoxischer Vasokonstriktion darstellen. Anhaltende Vasodilatation zeigte sich besonders bei sehr niedrigen Wirkstoffkonzentrationen, die eher unterhalb der eigentlichen Wirkschwelle für die Vasokonstriktion lagen. Bei höheren Konzentrationen folgte nach einem initialen Abfall des PA-Druckes ein anhaltender Anstieg. Auch anderweitig ausgelöste Anhebung des Gefäßtonus kann durch Endothelin abgeschwächt werden [48, 33].

Für den systemischen Blutdruck konnte bei niedrigen Konzentrationen ohne vorherige Tonusanhebung ebenfalls eine leicht senkende Wirkung bei Katzen und Kaninchen gezeigt werden [76, 77]. Bei den oben erwähnten Menschenversuchen konnte kein Blutdruckabfall, sondern

bei steigender ET-1-Dosis zunächst ein gleichbleibender, dann ein ansteigender systemischer Blutdruck beobachtet werden [101].
Vergleicht man die von uns verwendeten Wirkstoffkonzentrationen in den Serien 1 – 4 mit den ET-1-Konzentrationen, welche Patienten mit ARDS oder Sepsis aufweisen, so liegen diese deutlich niedriger. Sanai et al. [110] fanden bei ARDS-Patienten durchschnittliche ET-Plasmawerte von umgerechnet 17 pmol/l, Druml et al. [32] Werte von etwa 10 pmol/l und Langleben et al. [73] Werte von im Mittel 2 pmol/l. In einer Studie von Weitzberg et al. [129] wurden bei Sepsis-Patienten Mittelwerte für das Plasma-Endothelin von 11 pmol/l gemessen. Diese Werte lagen im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv jeweils signifikant erhöht. Betrachtet man nun die niedrigste in der vorliegenden Arbeit verwendete Konzentration von 10^{-8} M, so liegt diese immer noch um den Faktor 600 – 5000 höher als die am Patienten gemessenen. Dieser große Unterschied ist wohl zu einem großen Teil die Folge der Tatsache, daß nur ein kleiner Teil der Substanz intraluminal, der größere (mehr als 95%) aber in Richtung glatter Gefäßmuskulatur abgegeben wird [93]. Hinzu kommt die schnelle Plasma-Clearance im intakten Organismus [42].

Ein weiterer Effekt auf die Kaninchenlunge nach Gabe von ET-1 war, zeitlich einhergehend mit dem initialen PAP-Anstieg, zunächst ein leichter Abfall des Lungengewichtes. Als Ursache dieses Gewichtsverlustes ist das bei Vasokonstriktion verminderte intravasale Volumen anzusehen [112]. Im weiteren Verlauf kam es jedoch zu einem Gewichtsanstieg, der bezüglich Steilheit und zeitlichem Auftreten deutlich dosisabhängig war. In dieser Phase korrelierten Gewichts- und Druckanstieg.

4.3 Mikrovaskuläre Permeabilität

Nicht bekannt ist, ob das ET-induzierte Lungenödem die direkte Folge des erhöhten Perfusionsdruckes ist oder ob ET-1 eine erhöhte Permeabilität des Kapillarbettes erzeugt. Als Maßstab für das Ausmaß einer Permeabilitätsstörung wurde in vorliegender Arbeit die gravimetrische Bestimmung des kapillären Filtrationskoeffizienten (K_{fc}) herangezogen. Im Verlauf der Versuche kam es dabei zu einem leichten Anstieg des K_{fc} im Vergleich zur Kontrollserie, der jedoch nicht signifikant war. Somit läßt sich daraus schließen, daß die Gewichtsveränderung eher als Folge einer druckabhängig gesteigerten mikrovaskulären Filtration zu betrachten ist.
In bisher vorliegenden Arbeiten über die Wirkung von ET wurden verschiedene Methoden verwendet, um eine Permeabilitäts-veränderung darzustellen. Unabhängig von diesen sind die Ergebnisse widersprüchlich.

Einige Autoren benutzten ebenfalls die K_{fc}-Bestimmung [56, 67, 6, 25] bzw. die ähnliche FFR (Fluid Fitration Rate)-Messung [51]. Horgan et al. beschreiben an mit Ringer-Albumin-Lösung perfundierten isolierten Meerschweinchenlungen nach Zugabe von ET-1 keinen erhöhten K_{fc}, Khimenko et al. ebenso an isolierten Rattenlungen. Helset et al. fanden bei isolierten Rattenlungen unterschiedliche Ergebnisse. Bei Perfusion mit Blut, Leukozyten oder Blutplasma kam es zur Permeabilitätserhöhung, was jedoch unter Verwendung von Krebs-Puffer-Lösung nicht der Fall war. Um eventuelle Einflüße der Druckerhöhung möglichst vollkommen zu unterbinden, paralysierten Helset et al. hierbei die Gefäßmuskulatur mit Papaverin. Barnard et al. fanden bei isolierten Ratten-, Hunde- und Kaninchenlungen fast ausnahmslos keine Permeabilitätssteigerung. Lediglich bei Rattenlungen mit Zugabe von Ibuprofen kommt es zur K_{fc}-Erhöhung. Bei Dahlöf et al. kam es zu keiner Erhöhung des K_{fc} an einem präparierten

Rattenhinterlauf.

Von verschiedenen Autoren wird in diesem Zusammenhang die Genauigkeit der K_{fc}-Messung in angezweifelt. Unter der Vorstellung, daß sich bei entsprechender Vasokonstriktion die perfundierte Oberfläche deutlich verkleinert, kann es theoretisch bei vergleichenden Experimenten zu einem falschnormalen K_{fc} nach ET-Gabe kommen. Wie oben erwähnt benutzten Helset et al. aus diesem Grund Papaverin zur Verhinderung der Vasokonstriktion und damit der Verkleinerung der Gefäßoberflächengröße. Dieses gewichtige Argument gegen die Benutzung des K_{fc} als Hinweis für eine Permeabilitätsstörung wurde von Barnard et al. [6] teilweise entkräftet, die mit einer Fluoreszenz-technik zumindest bei Kaninchenlungen keine Reduktion der perfundierten Oberfläche nach ET-Gabe erkennen konnten.

Eine weitere in der Literatur mehrmals beschriebene Methode zur Objektivierung eines Gefäßleckes ist die Zugabe von Evans-Blau in die Zirkulation. Evans-Blau bindet sich an Albumin. Extravasales Albumin kann somit letztlich photospektrometrisch quantifiziert werden.

Sowohl Filep et al. [38, 40] als auch Sirois et al. [117] konnten in verschiedenen Organen der Ratte (Leber, Niere, Milz, Bronchien) eine Albuminextravasation finden. Im Lungenparenchym selbst kam es zu keinem signifikanten Evans-Blau-Anstieg nach ET-Gabe im Ganztierversuch.

Valentin et al. [124] konnten mit dieser Methode ebenfalls keine Permeabilitätsstörung in der Rattenlunge aufzeigen.

Lehoux et al. [75] fanden bei niediger ET-Konzentration keine, bei höherer ($>10^{-9}$ M) jedoch eine signifikante Albumin-Extravasation an der isolierten, mit Krebspuffer perfundierten Rattenlunge.

Als weitere Möglichkeit, eine Albumin-Extravasation zu erkennen und messbar zu machen wird die Markierung mit ^{125}I beschrieben. Zur

Messung dient ein Gammazähler.
Horgan et al. [56] konnten an gezüchteten Rinderlungenepithelzell-schichten keinen Albumin-^{125}I-Flux feststellen. Rodman et al. [107] berichteten bei Ganztierversuchen mit Ratten über keine signifikante Albumin-Extravasation in der Lunge. Auch konnte in derselben Arbeit bei Versuchen mit Rinder-Epithelien keine vermehrte Durchlässigkeit aufgezeigt werden. Im Gegensatz dazu wiesen Zimmermann et al. [136] mit dieser Methode an Ganztierversuchen mit Ratten an der Lunge sowie an anderen Organen eine Permeabilitätsstörung nach.

Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen erzeugt also laut den meisten Arbeiten Endothelin keine Erhöhung der Kapillarpermeabilität. Bezüglich der wenigen Arbeiten gegensätzlicher Ergebnisse ist zusammenfassend zu sagen, daß als Grund hierfür weder die Art des Versuchstieres, des Perfusionsmediums, noch die Höhe der ET-Dosis eine eindeutige Rolle zu spielen scheint.

Weitere indirekte Methoden bezüglich einer Aussage über die Ödemgenese von Endothelin an der Lunge werden ebenfalls beschrieben.
So konnten Ercan et al. [37] an isolierten Rattenlungen mit einem Thromboxan-A_2-Antagonist eine Abschwächung der Ödembildung bei gleichbleibendem pulmonal-arteriellen Druck erzeugen. Hieraus wurde der Schluß gezogen, daß die Ödembildung weitgehend gefäßdruckunabhängig ist. Die hierfür wesentlichen Messungen des mikrovaskulären und venösen Druckes wurden unterlassen.
Lal et al. [72] führten an isolierten Rattenlungen Versuche mit ET und Sarafotoxin 6c (SX6C, ET-B-Rezeptoragonist) durch. Bei gleichermaßen ansteigendem PAP kam es zu einer deutlich verminderten Ödembildung bei Sarafotoxin. Lal et al. erzeugten nun eine retrograde Perfusion vom linken Ventrikel ausgehend. Es folgte,

nun umgekehrt, eine wesentlich stärker ausgeprägte Ödembildung bei Sarafotoxin. Dies läßt den Schluß zu, daß ein erhöhter venöser und damit auch mikrovaskulärer Druck hauptsächlich an der Ödembildung beteiligt ist und eine Permeabilitätsstörung keine wesentliche Rolle spielt.

Diese Theorie des hydrostatischen ET-induzierten Ödems wird durch weitere Arbeiten unterstützt, welche einen erhöhten mikrovaskulären Druck bzw. eine deutliche Venokonstriktion nach ET-Gabe zeigen.
Sowohl Barman et al. [5], Horgan et al. [56] als auch Helset et al. [51] konnten in Doppel-Verschluß-Technik bei isolierten Kaninchen-, Meerschweinchen- bzw. Rattenlungen einen erhöhten kapillären Druck messen. Der Druckanstieg variierte hierbei zwischen dem 1,6- bis 3-fachen des Ausgangswertes.
Daß Endothelin die dafür notwenige Venokonstriktion erzeugt, ist ebenfalls in mehreren Arbeiten belegt.
Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Aharinejad et al. [1] zeigten, daß es nach ET-Injektion bei Ratten sogar zu einer stärkeren Konstriktion von Lungenvenen als Lungenarterien kommt. Besonders betroffen waren hierbei die Venolen. Anhängig von der verabreichten ET-Dosis verringerte sich der Gefäßdurchmesser um bis zu 23 %. Lippton et al. [77] und Rodman et al. [107] zeigten an Lungengefäßringen von Kaninchen bzw. von Ratten ebenfalls eine stärkere Veno- als Arteriokonstriktion auf. Auch Cardell et al. [19] beschrieben an isolierten Meerschweinchenlungengefäßen eine deutliche Venokonstriktion.

Letztlich scheint also ein erhöhter mikrovaskulärer Druck die Ursache für die ET-induzierte Lungenödembildung zu sein.
Betrachtet man in diesem Zusammenhang noch die „capillary stress failure“-Hypothese von West et al. [131], so wird vorstellbar, daß sich

ein erhöhter kapillärer Druck und eine Permeabilitätsstörung nicht unbedingt ausschließen, sondern unter Umständen sogar in unmittelbarem Zusammenhang stehen. West zeigt hier eindrücklich an elektronenmikroskopischen Untersuchungen am Kaninchen-lungenparenchym, daß erhöhte transmurale Drücke zur stellenweisen Ruptur des kapillären Endothels führen. Obwohl in diesen Versuchen Drücke von über 40 mmHg die Voraussetzung sind, vermutet West, auch basierend auf weiteren Arbeiten, daß es bereits bei niedrigeren Druckwerten zur Erweiterung der Endothelzellzwischenräume mit Bildung eines Protein-Leckes kommt.

Diese Theorie könnte die widersprüchlichen Ergebnisse der oben erläuterten Untersuchungen teilweise erklären.

5 Zusammenfassung

Die Entdeckung der Endotheline als eine Gruppe potenter vasoaktiver Peptide löste eine Vielzahl von Untersuchungen aus, welche die mögliche Bedeutung von ET-1 für die Regulation des Vasotonus sowie der vaskulären Permeabilität zum Ziel hatten. Dennoch werden die Effekte von ET-1 in der Lungenstrombahn zur Zeit noch kontrovers diskutiert.

In dieser Arbeit zeigte sich nach Bolusinjektion einer ET-1-Lösung an mit Krebs-Henseleit-Hydroxyethylstärke-Puffer perfundierten isolierten Kaninchenlungen eine anhaltende dosisabhängige Erhöhung des pulmonal-arteriellen Druckes sowie eine stetige Zunahme des Lungengewichtes. Die Effekte von Endothelin im beschriebenen Versuchsmodel sollten auf den menschlichen Organismus weitgehend übertragbar sein.

Um die Genese des Lungenödems zu eruieren, erfolgte bei einer ET-1-Konzentration im Perfusat isolierter Kaninchnlungen von $5x10^{-8}$ M die Bestimmung des kapillären Filtationskoeffizienten (K_{fc}), der als Maß für die mikrovaskuläre Permeabilität diente.

Im Vergleich zu einer Kontrollgruppe zeigte sich eine leichte, nicht signifikante Erhöhung des K_{fc}. Dies läßt den Schluß zu, daß ET an der Kaninchenlunge keine mikrovaskuläre Permeabilitätsstörung erzeugt, sondern daß es sich um ein hydrostatisches Ödem handeln muß. Die Kenntnis, daß ET-1 zu einer ausgeprägten Venokonstriktion und zur Erhöhung des mikrovaskulären Druckes führt, untermauert dies.

6 Literatur

1. Aharinejad S, Schraufnagel DE, Miksovsky A, Larson EK, Marks SC: Endothelin focally constricts pulmonary veins in rats. J Thorac Cardiovasc Surg 1995; 110:148-56.

2. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S; Cloning and expressing of a cDNA encoding an endothelin receptor. Nature 1990; 348: 732-35.

3. Arai H, Nakao K, Takaya K, Hosoda K, Ogawa Y, Nakanishi S,Imura H: The human endothelin-B receptor gene: structural organization and chromosomal assignment. J Biol Chem 1993; 268: 3463-70.

4. Aramosi I, Nakanishi S: Coupling of two endothelin receptor subtypes to differing signal transduction in transfected chinese hamster ovary cells. J Biol Chem 1992; 207: 12468-74.

5. Barman SA, Pauly JR: Mechanism of action of endothelin-1 in the canine pulmonary circulation. J Appl Physiol 1995; 79(6): 2014-20.

6. Barnard JW, Barman SA, Adkins WK, Longenecker GL, Taylor AE: Sustained effects of endothelin-1 on rabbit, dog and rat pulmonary circulations. Am J Physiol 1991; 261(2 Pt 2): H479-86.

7. Battistini B, Brown M, Vane JR: Selective proteolytic activation and degradation of ETs and big ETs in parenchymal strips of the guinea-pig lung. Biochem Biophys Res Commun 1995; 207: 675-681.

8. Bloch KD, Hong CC, Eddy RL, Shows TB, Quertermous T: cDNA cloning and chromosomal assigment of the endothelin-2 gene: vasoactive intestinal contractor peptide is rat endothelin-2. Genomics 1991; 10: 236-42.

9. Bloch KD, Eddy RL, Shows TB, Quertermous T: cDNA cloning and chromosomal assigment of the gene encoding endothelin-3. J Biol Chem 1989; 264: 18156-61.

10. Boscoe MJ, Goodwin AT, Amrani N, Yacoub MH: Endothelins and the lung. Int

J Biochem Cell Biol 2000; 32(1): 41-62.

11. Breil I, Koch T, Rothfischer W, Münter K, Neuhof H, van Ackern K: Endothelin induced effects on pulmonary vascular reaction and mediator release in the isolated lung. Br J Anaest 1996; 76 (Suppl 2): 106.

12. Brunner F, Stessel H, Graier WF: The effect of intracellular Ca^{2+}-concentration and hypoxia on basal endothelin-1 secretion by cultured porcine aortic endothelial cells. Agents Actions 1995; Suppl 45: 269-73

13. Buchan KW, Magnusson H, Rabe KF, Sumner MJ, Watts IS: Characterisation of the endothelin receptor mediating contraction of human pulmonary artery using BQ123 and Ro46-2005. Eur J Pharmacol 1994; 260: 221-25.

14. Cacoub P, Dorent R, Maistre G, Nataf P, Carayon A: Endothelin-1 in pulmonary hypertension. N Engl J Med 1993; 329: 1967-68.

15. Cacoub P, Dorent R, Maistre G, Nataf P, Carayon A, Piette JC, Godeau P, Cabrol C, Gandjbakhch I: Endothelin-1 in primary pulmonary hypertension and the Eisenmenger syndrome. Am J Cardiol 1993; 71: 448-50.

16. Cacoub P, Dorent R, Nataf P, Carayon A, Riquet M, Noe E, Piette JC, Godeau P, Gandjbakhch I: Endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. Cardiovasc Res 1997; 33(1): 196-200.

17. Campbell AM, Vignola AM, Chanez P, Godard P, Bousquet P: Low-affinity receptor for IgE on human bronchial epithelial in asthma. Immunology 1994; 82: 506-8.

18. Candenas ML, Naline E, Sarria B, Advenier C: Effect of epithelium removal and of enkephalin inhibition of the bronchoconstrictor response of three endothelins of the human isolated bronchus. Eur J Pharmacol 1992; 210: 291-97.

19. Cardell LO, Uddman R, Edvinson L. Analysis of endothelin-1 induced contractions of guinea-pig trachea, pulmonary veins and different types of pulmonary arteries. Acta Physiol Scand 1990; 139:103-11.

20. Cassin S, Kristova V, Davis T, Kadowitz P, Gause G: Tone-dependent responses to endothelin in the isolated perfused fetal sheep pulmonary circulation in situ. J Appl Physiol 1991; 70(3): 1228-34.

21. Chang RSY, Wright K, Effros AE. Estimation of albumin in prevention of edema in perfused rabbit lungs. J Appl Physiol 1981; 50: 1065-70.

22. Cody RJ: The potential role of endothelin as a vasoconstrictor substance in congestive heart failure. Eur Heart J 1992; 13: 1573-78.

23. Cody RJ, Haas GJ, Binkley PF, Capers Q, Kelly R: Plasma endothelin correlates with the extent of pulmonary hypertension in patients with chronic congestive heart failure. Circulation 1992; 85: 504-09.

24. Crawley DE, Liu SF, Barnes PJ, Evans TW:Endothelin-3 is a potent pulmonary vasodilator in the rat. J Appl Physiol 1992; 72(4): 1425-31.

25. Dahloef B, Gustafsson D, Hedner T, Jern S, Hansson L:Regional haemodynamic effects of endothelin-1 in rat and man: unexpected adverse reactions. J Hypertension 1990; 8: 811-17.

26. Davenport AP, O'Reilly G, Molenaar P, Maguire JJ, Kuc RE, Sharkey A, Bacon CR, Ferro A: Human endothelin receptors characterized using reverse transcriptase-polymerase chain reaction, in situ hybridization, and subtype-selective ligans BQ123 and BQ3020: evidence for expression of ET_B receptors in human vascular smooth muscle. J Cardiovasc Pharmacol 1993; 22 (Suppl 8): S22-5.

27. Descombes JJ, Mennecier JP, Versluys D, Baron V, De Nanteuil G, Laubie M, Verbeuren TJ: S 17162 is a novel selective inhibitor of big endothelin-1 response in the rat. J Cardiovasc Pharmacol 1995; 26 (Suppl 3): S61-4.

28. Dikranian K, Tomlinson A, Loesch R, Winter R, Burnstock G:Increase in immunoreactivity to endothelin-1 in the mucosal vasculature and epithelium of the large intestine during chronic hypoxia. J Anat 1994; 185: 609-15.

29. Drake R, Gaar KA, Taylor AE. Estimation of the filtration coefficient of

pulmonary exchange vessels. Am J Physiol 1978; 234: H266-74.

30. Drake RE, Smith JH, Gabel JL: Estimation of the filtration coefficient in intact dog lungs. Am J Physiol 1980; 238: H430-8.

31. Droma Y, Hayano T, Takabayashi Y, Koizumi T, Kubo K, Kobayashi T, Sekiguchi M: Endothelin-1 and interleukin-8 in high altitude pulmonary edema. Eur Respir J 1996; 9(9): 1947-49.

32. Druml W, Stelzner H, Waldhäusl W, Lenz K, Hammerle A, Vierhapper H, Gasic S, Wagner OF: Endothelin-1 in adult respiratory distress syndrome. Am Rev Respir Dis 1993; 148: 1169-73.

33. Eddahibi S, Springall D, Mannan M, Carville C, Charbrier PE, Levame M, Raffestin B, Polak J, Adnot S: Dilator effect of endothelins in pulmonary circulation:changes associatet with chronic hypoxia. Am J Physiol 1993; 265: L571-80.

34. Ehrenreich HR, Anderson RW, Fox CH, Rieckmann P, Hoffmann GS, Travis WD, Coligan JE, Kehrl JH, Fauci AS: Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages. J Exp Med 1990; 172: 1741-48.

35. Ehrhart JC, Granger WM, Hofmann WF. Filtration coefficient obtained by stepwise pressure elevation in isolated dog lung. J Appl Physiol 1984; 56:862-7.

36. Enoki T, Miwa S, Sakamoto A, Minowa T, Komuro T, Kobayashi S, Ninomiya H, Masaki T: Long-lasting activation of cation current by low concentration of endothelin-1 in mouse fibroblasts and smooth muscle cells of rabit aorta. Br J Pharmacol 1995; 115: 479-485.

37. Ercan ZS, Kilinc M, Yazar Ö, Korkusuz P, Türker RK. Endothelin-1 induced edema in rat and guinea pig isolated perfused lungs. Arch Int Pharmacodyn 1993; 323: 74-84.

38. Filep JG, Sirois M, Rousseau A, Fournier A, Sirois P: Effects of endothelin on

vascular permeability in the conscious rat: interactions with platelet-activating factor. Br J Pharmacol 1991; 104: 797-804.

39. Filep JG: Endothelin peptides: Biological actions and pathophysiological significiance in the lung. Life Sci 1992; 52: 119-31.

40. Filep JG, Sirois MG, Foeldes-Filep E, Rousseau A, Plante GE, Fournier A, Yano M, Sirois P: Enhancement by endothelin-1 of microvascular permeability via the activation of ETA-receptors. Br J Pharmacol 1993; 109: 880-86.

41. Filep JG, Foeldes-Filep E, Rousseau A, Sirois P, Fournier A: Vascular response to endothelin-1 following inhibition of nitric oxide synthesis in the conscious rat. Br J Pharmacol 1993; 110: 1213-21.

42. Fukuroda T, Fujikawa T, Ozaki S, Ishikawa K, Yano M, Nishikibe M: Clearance of circulating endothelin-1 by ET_B receptors in rats. Biochem Biophys Res Commun 1994; 199: 1461-65.

43. Fukuroda T, Kobayashi M, Ozaki S, Yano M, Miyauchi T, Onizuka M, Sugishita Y, Goto K, Nishikibe M: Endothelin receptor subtypes in human versus rabbit pulmonary arteries. J Appl Physiol 1994; 76: 1976-82.

44. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Path FRC, Stewart DJ: Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. N Engl J Med 1993; 328: 1732-39.

45. Gomez-Garre D, Guerra M, Gonzales E, Lopez-Farre A, Riesco A, Escanero J, Egido J: Aggregation of human polymorphonuclear leukocytes by endothelin: role of platelet-activating factor. Eur J Pharmacol 1992; 224: 167-72.

46. Halim A, Kanayama N, El Maradny E, Maehara K, Terao T: Activated neutrophil by endothelin-1 caused tissue damage in human umbilical cord. Thromb Res 1995; 77: 321-27.

47. Haller H, Schaberg T, Lindschau C, Lode H, Distler A: Endothelin increases $[Ca_2]i$, protein phosphorylation and O_2 production in human alveolar

macrophages. Am J Physiol 1991; 261: L478-84.

48. Hasunuma K, Rodman DM, O'Brien RF, McMurtry IF: Endothelin causes pulmonary vasodilatation in rats. Am J Physiol 1990; 259: H48- H54.

49. Hay DWP, Hubbard WC, Undem BJ: Endothelin-induced contraction and mediator release in human bronchus. Br J Pharmacol 1993; 110: 392-8.

50. Hay DWP, Luttmann MA, Hubbard WC, Undem BJ: Endothelin receptor subtypes in human and guinea-pig pulmonary tissues. Br J Pharmacol 1993; 110: 1175-83.

51. Helset E, Kjaeve J, Hauge A. Endothelin-1-induced increases in microvascular permeability in isolated, perfused rat lungs requires leukocytes and plasma. Circ Shock 1993; 39: 15-20.

52. Hemsen A, Franco-Cereda A, Matran R, Rudehill A, Lundberg JM: Occurrence, specific binding sites and functional effects of endothelin in human cardiopulmonary tissue. Eur J Pharmacol 1990; 191: 319-328.

53. Hemsen A, Larsson O, Lundberg JM: Characteristics of endothelin A and B binding sites and their vascular effects in pig peripheal tissues. Eur J Pharmacol 1991; 36(1): 71-83.

54. Heyl DL, Cody WL, He JX, Flynn MA, Welch KM, Reynolds EE, Doherty AM: Truncated analogues of endothelin and sarafotoxin are selective for the ET_B receptor subtype. Peptide Res 1993; 6: 238-41.

55. Hisaki K, Matsumura Y, Fujita K, Maekawa H, Takaoka M, Morimoto S: Differences in potency of big endothelin-1-induced pressor action in rat isolated perfused mesenteric artery, hindquater and lung. Life Sciences 1993; 54: 275-80.

56. Horgan MJ, Pinheiro JBM, Malik AB. Mechanism of endothelin-1-induced pulmonary vasoconstriction. Circ Res 1991; 69: 157-64.

57. Hosoda K, Nakao K, Tamura N, Arai H, Ogawa Y, Suga SI, Nakanishi S, Imura

H: Organization, strucure, chromosomal assignment, and expression of the gene encoding the human endothelin-A-receptor. J Biol Chem 1992; 267: 18797-804.

58. Huribal M, Cunningham ME, D'Aiuto ML, Pleban WE, McMillen MA: Endothelin-1 and prostaglandin E_2 levels increase in patients with burns. J Am Coll Surg 1995; 180: 318-22.

59. Ihara Y, Sagawa N, Hasegawa M, Okagaki A, Li XM, Inamori K, Itoh H, Mori T, Saito Y, Shirakami G, Nakao K, Imura H: Concentrations of endothelin-1 in maternal and umbilical cord blood at various stages of pregnancy. J Cardiovasc Pharmacol 1991; 17 (Suppl 7): S443-5.

60. Imai T, Hirata Y, Emori T, Yanagisawa M, Masaki T, Marumo F: Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells. Hypertension 1992; 19: 753-7.

61. Inoue A, Yanagisawa M, Takuwa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T: The human preproendothelin-1 gene: complete nucleotide sequence and regulation of expression. J Biol Chem 1989; 264: 14954-9.

62. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T: The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 2863-7.

63. Ishibashi M, Ito N, Fujita M, Furue H, Yamaji T: Endothelin-1 as an aggravating factor of disseminated intravascular coagulation associated with malignant neoplasms. Cancer 1994; 73: 191-5.

64. Ishikawa K, Ihara M, Noguchi K, Toshikai M, Mino N, Saeki T, Fukuroda T, Fukami T, Ozaki S, Nagase T, Nishikibe M, Yano M: Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin -B-receptor antagonist, BQ788. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 4892-6.

65. Janakidevi K, Fisher MA, Del Veccio PJ, Tiruppathi C, Figge J, Mailk AB: Endothelin-1 stimulates DNA synthesis and proliferation of pulmonary artery

smooth muscle cells. Am J Physiol 1992; 263: C1295-C1301.

66. Kadowitz PJ, McMahon TJ, Hood JS, Feng CJ, Minkes RK, Dyson MC: Pulmonary vascular and airway response to endotheli-1 are mediated by different mechanism in the cat. J Cardiovasc Pharmacol 1991; 17 (Suppl 7): S374-7.

67. Khimenko PL, Moore TM, Taylor AE: Blocked ET_A-receptors prevent ischemia and reperfusion injury in rat lungs. J Appl Physiol. 1996; 80(1): 203-7.

68. Koch T, Duncker HP, Rosenkranz S, van Ackern K, Neuhof H. Alterations of filtrations coefficients in pulmonary edema of different pathogenesis. J Appl Physiol 1992; 73 (6): 2396-402.

69. Koch T, Duncker HP, Heller A, Schaible R, Neuhof H, van Ackern K. Effects of stroma free hemoglobine solutions on pulmonary vascular resistance and mediator release, in the isolated perfused rabbit lung. Shock 1994; 1: 146-52.

70. Koh E, Morimoto S, Kim S, Nabata T, Miyashita Y, Ogihara T: Endothelin stimulates Na^+/H^+ exchange in vascular smooth muscle cells. Biochem Int 1990; 20: 375-80.

71. Kuchan MJ, Frangos JA: Shear stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells. Am J Physiol 1993; 264: H150-6

72. Lal H, Woodward B, Williams KI. Actions of endothelins and sarafotoxin 6c in the rat isolated perfused lung. Br J Pharmacol 1995; 115: 653-9.

73. Langleben D, Demarchie M, Laporta D, Spanier AH, Schlesinger RD, Stewart DJ: Endothelin-1 in acute lung injury and adult respiratory distress syndrome. Am Rev Respir Dis 1993; 148: 1646-50.

74. Lee ME, Bloch KD, Clifford JA, Quertermous T: Functional analysis of the endothelin-1 gene promoter: evidence for a endothelial cell-specific cis-acting sequence. J Biol Chem 1990; 265: 10446-50.

75. Lehoux S, Plante GE, Sirois MG, Sirois P, D`Orleans-Juste P. Phosphoramidon blocks big-endothelin-1 but not endothelin-1 enhancement of vascular permeability in the rat. Br J Pharmacol 1992; 107(4): 996-1000.

76. Lippton HL, Hauth TA, Summer WR, Hyman AL: Endothelin produces pulmonary vasoconstriction and systemic vasodilation. J Appl Physiol 1989; 66 (2): 1008-12.

77. Lippton HL, Ohlstein EH, Summer WR, Hyman AL: Analysis of responses to endothelins in the rabbit pulmonary and systemic vascular beds. J Appl Physiol 1991; 70 (1): 331-41.

78. Lopez-Farre A, Caramelo C, Esteban A, Alberola ML, Millas I, Monton M, Casado S: Effects of aspirin on platelet-neutrophil interactions: role of nitric oxide and endothelin-1. Circulation 1995; 91: 2080-8.

79. MacLean M, McCulloch KM, Baird M: Endothelin ET_A and ET_B-receptor-mediated vasoconstriction in rat pulmonary arteries and arterioles. J Cardiovasc Pharmacol 1994; 23: 838-45.

80. Malarkey K, Chilvers ER, Lawson MF, Plevin R: Stimulation by endothelin-1 of mitogen-activated protein kinases and DNA synthesis in bovine tracheal smooth muscle cells. Br J Pharmacol 1995; 116: 2267-73.

81. Marita T, Kurihara H, Yoshizumi M, Maemura K, Sugiyama T, Nagai R, Yazaki Y: Human polymorphonuclear leukocytes have dual effects on endothelin-1: the induction of endothelin-1 mRNA expression in vascular endothelial cells and modification of the endothelin-1 molecule. Heart Vessels 1993; 8: 1-6.

82. Matsumura Y, Ikegawa R, Tsukahara R, Takaoka M, Morimoto S: Conversion of big endothelin-1 to endothelin-1 by two types of metalloproteinases derived from porcine aortic endothelial cells. FEBS Lett 1990; 272: 166-70.

83. Matsumura Y, Ikegawa R, Tsukahara R, Takaoka M, Morimoto S: Conversion of big endothelin-1 by two types of metalloproteinases of cultured porcine vascular smooth muscle cells. Biochem Biophys Res Commun 1991; 178: 899-905.

84. Mattoli S, Mezzetti M, Riva G, Allegra L, Fasoli A: Specific binding of endothelin on human bronchial smooth muscle cells in culture and secretion of endothelin-like material from bronchial epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol 1990; 3: 145-51.

85. McCulloch KM, CC Docherty, Morecroft I, MacLean MR: Endothelinb receptor-mediated contraction in human pulmonary resistance arteries. Br J Pharmacol 1996; 119: 1125-30.

86. McMillen MA, Sumpio BE, Endothelins: polyfunctional cytokines. J Am Coll Surg 1995; 180: 621-37.

87. Millul V, Lagente V, Gillardeaux K, Boichot E, Dugas B, Mencia-Huerta JM, Bereziat G, Braquet P, Masliah J: Activation of guinea pig alveolar macrophages by endothelin-1. J Cardiovasc Pharmacol 1991; 17 (Suppl 7): S94-7.

88. Murphy LT, Greenhough KL, Turner AJ: Processing and metabolism of endothelin peptides by porcine lung membranes. J Cardiovasc Pharmacol 1993; 22 (Suppl 8): S94-7.

89. Nakamura T, Kasai K, Sekiguchi Y, Banba N, Takahashi K, EmotoT, Hattori Y, Shimoda SI: Elevation of plasma endothelin concentrations during endotoxin shock in dogs. Eur J Pharmacol 1991; 205: 277-82.

90. Nakano J, Takizawa H, Ohtoshi T, Shoji S, Yamaguchi M, Ishii A, Yanagisawa M, Ito K: Endotoxin and proinflammatory cytokines stimulate endothelin-1 expression and release by airway epithelial cells. Clin Exp Allergy 1994; 24: 330-6.

91. Neuhof H: Actions and interactions of mediator systems and mediators in the pathogenesis of ARDS and multiorgan failure. Acta Anaesthesiol Scand 1991; 35; Suppl 95: 7-14.

92. Newby DE, Webb DJ: Endothelin; in Grace PA, Mathie RT: Ischaemia-reperfusion injury. Backwell science, Oxford 1999: 196-208.

93. Noguchi Y, Uchida Y, Endo T, Ninomiya H, Nomura A, Sakamoto T, Goto Y, Haraoka S, Shimokama T, Watanabe T: The intoduction of cell differentiation and polarity of tracheal epithelium cultured on the amniotic membrane. Biochem Biophys Res Commun 1995, 210 (2): 302-9.

94. Noveral JP, Rosenberg SM, Anbar RA, Pawlowski NA, Grunstein MM: Role of endothelin-1 in regulating proliferation of cultured rabbit airway smooth muscle cells. Am J Physiol 1992; 263: L317-24.

95. Ohlstein EH, Arleth A, Ezekiel M, Horohnich S, Ator MA, Caltabiano MM, Sung CP: Biosynthesis and modulation of endothelin from bovine pulmonary arterial endothelial cells. Life Sci 1990; 46: 181-8.

96. Okada M, Yamashita C, Okada M, Okada K: Contribution of endothelin-1 to warm ischemia/reperfusion injury of the rat lung. Am J Respir Crit Care Med 1995; 152: 2105-10.

97. Ono K, Tsujimoto G, Sakamoto A: Endothelin-A receptor mediates cardiac inhibition by regulating calcium and potassium currents. Nature 1994; 370: 301-304.

98. Patrignani P, Del-Maschio A, Bazzoni G, Daffonchio L, Hernandez A, Modica R, Montesanti L, Volpi D, Patrono C, Dejana E: Inactivation of endothelin by polymorphonuclear leukocyte-derived lytic enzymes. Blood 1991; 78 (10): 2715-2720.

99. Peacock AJ, Dawes KE, Shock A, Gray AJ, Reeves JT, Laurent GJ: Endothelin-1 and endothelin-3 induce chemotaxis and replication of pulmonary artery fibroblasts. Am J Respir Cell Mol Biol 1992; 7(5): 492-9.

100. Pernow J, Boutier JF, Franco-Cereda A, Lacroix JS, Martan R, Lundberg JM: Potent selective vasoconstrictor effects of endothelin in the pig kidney in vivo. Acta Physiol Scand 1988; 134: 573-83.

101. Pernow J, Hemsen A, Lundberg JM, Nowak J, Kaijser L:Potent vasoconstrictor effects and clearance of endothelin in the human forearm. Acta physiol Scand

1991; 141: 319-24.

102. Pons F, Touvay C, Lagente V, Mencia-Huerta JM, Braquet P: Bronchopulmonary and pressor activities of endothelin-1 (ET-1), ET-2, ET-3, and big ET-1 in the guinea pig. J Cardiovasc Pharmacol 1991; 17 (Suppl 7): S326-8.

103. Power RF, Wharton J, Zhao Y, Bloon SR, Polak JM: Autoradiographic localization of endothelin-1 binding sites in the cardiovascular and respiratory systems. J Cardiovasc Pharmacol 1989; 13 (Suppl 5): S50-6.

104. Rao VVNG, Löffler C, Hansmann I: The gene for the novel vasoactive peptide endothelin 3 (EDN3) is localized to human chromosome 20q13.2-qter. Genomics 1991; 10: 840-1.

105. Ray SG, McMurray JJ, Morton JJ, Dargie HJ: Circulating endothelin is not extracted by the pulmonary circulating in man. Chest 1992; 102: 1143-4.

106. Richardson PDJ, Granger DN, Taylor AE. Capillary filtration coefficient: the technique and its application to the small intestine. Cardiovasc Res 1979; 13: 547-61.

107. Rodman DM, Stelzner TJ, Zamora MR, Bonvallet ST, Oka M, Sato K, O`Brien RF, McMurtry IF. Endothelin-1 increases the pulmonary microvascular pressure and œauses edema in salt solution but not blut perfused rat lungs. J Cardiovasc Pharmacol 1992; 20: 658-63.

108. Rosenzweig DY, Hughes JMB, Glazier JB: Effects of transpulmonary and vascular pressures on pulmonary bloos volume in isolated lung. J Appl Physiol 1970; 28 (5): 553-60.

109. Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T: Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. Nature 1990; 348: 732-5.

110. Sanai L, Haynes WG, MacKenzie A, Grant IS, Webb DJ: Endothelin production in sepsis and the adult respiratory distress syndrome. Intensive

Care Med 1996; 22: 52-6

111. Sartori C, Vollenweider L, Loeffler BM, Delabays A, Nicod P, Baertsch P, Scherrer U: Exaggerated endothelin release in high-altitude pulmonary edema. Circulation 1999; 99:2665-8.

112. Schaible RP: Effekte von stromafreiem Hämoglobin auf den pulmonal-arteriellen Widerstand der isolierten Kaninchenlunge und daran beteiligten Mediatoren. Dissertation Giessen 1997.

113. Seeger W, Walmrath D, Menger M, Neuhof H. Increased lung vascular permeability after arachidonic acid and hydrostatic challenge. J Appl Physiol 1986;61: 1781-9.

114. Seeger W, Walmrath D, Grimminger F: ARDS-Intensivtherapie des akuten Lungenversagens: Internist 1995; 36: 785-801.

115. Sessa WC, Kaw S, Zembowicz A, Anggard E, Hecker M, Vane JR: Human polymorphonuclear leukocytes generate and degradate endothelin-1 by two distinct neutral proteases. J Cardiovasc Pharmacol 1991; 17 (Suppl 7): S34-8.

116. Simmet T, Pritze S, Thelen KI, Preskar BA: Release of endothelin in the oleic-acid-induced respiratory distress syndrome in rats. Eur J Pharmacol 1992; 211: 319-22.

117. Sirois MG, JG Filep, Rousseau A, Fournier A, Plante GE, Sirois P: Endothelin-1 enhances vascular permeability in concious rats: role of thromboxane A_2. Eur J Pharmacol 1992; 214: 119-25.

118. Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, Langleben D: Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: maker of mediator of disease? Ann Intern Med 1991; 114: 464-469.

119. Sudjarwo SA, Hori M, Takai Y, Urade Y, Okada T, Karaik K: A novel subtype of endothelin –B receptor mediating contraction in swine pulmonary vein. Life Sci 1993; 53: 431-7.

120. Sudjarwo SA, Hori M, Tanaka T, Matsuda Y, Okada T, Karki H: Subtypes of endothelin ET_A and ET_B receptors mediating venous smooth contraction. Biochem Biophys Res Commun 1994; 200: 627-33.

121. Suzuki R, Masaoko H, Hirata Y, Marumo F, Misotani E, Hirakawa K: The role of endothelin-1 in the origin of cerebral vasospasm in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. J Neurosurg 1992; 77: 96-100.

122. Takigawa M, Sakurai T, Kasuya Y, Abe Y, Masaki T, Goto K: Molecular identification of guanine-nucleotide-binding regulatory proteins which couple to endothelin receptors. Eur J Biochem 1995; 228: 102-8.

123. Tomlinson PR, Wilson JW, Stewart AG: Inhibition by salbutamol of the proliferation of human airway smooth muscle cells grown in culture. Br J Pharmacol 1994; 11: 641-7.

124. Valentin JP, Gardner DG, Wiedemann E, Humphreys MH: Modulation of endothelin effects on blood pressure and hematocrit by atrial natriuretic peptide. Hypertension 1991; 17: 864-9.

125. Vaneeswaran R, Magoulas T, Efrat G, Wheeler-Jones C, Olsen I, Penny R, Black CM: Circulating endothelin-1 levels in systemic sclerosis subsets: a marker of fibrosis or vascular dysfunction? J Rheumatol 1994; 21: 1834-44.

126. Vittori E, Marini M, Fasoli A, Franchis R, Mattoli S. Increased expression of endithelin in bronchial epithelial cells of asthmatic patients and effect of corticosteroids. Am Rev Respir Dis 1992; 146: 1320-5.

127. Wagner OF, Vierhapper H, Gasic S, Nowotny P, Waldhäusl W: Regional effects and clearance of endothelin-1 across pulmonary and splanchnic circulation. Eur J Clin Invest 1992; 22: 277-82.

128. Warner TD: Characterization of endothelin synthetic pathways and receptor subtypes: physiological and pathophysiological implications. Eur Heart J 1993; 14 (Suppl 1): S42-7.

129. Weitzberg E, Lundberg JM, Rudehill A: Elevated plasma levels of endothelin in

patients with sepsis syndrome. Circ Shock 1991; 33:222-227.

130. Weitzberg E, Ahlborg G, Lundberg JM: Longlasting vasoconstriction and efficient regional extraction of endothelin-1 in human splanchnic and renal tissues.Biochem Biophys Res Commun 1991; 180: 1298-303.

131. West JB, Tsukimoto K, Mathieu-Costello O, Prediletto R: Stress failure in pulmonary capillaries. J Appl Physiol 1991; 70(4): 1731-41.

132. Xu D, Emoto N, Giaid A: ECE-1: a membrane-bound metalloproteinase that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. Cell 1994; 78: 473-485.

133. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Katsutoshi G, Masaki T: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature 1988; 332: 411-5.

134. Zamora MR, Dempsey EC, Walchak SJ, Stelzner TJ: BQ123, an ET_A receptor antagonist, inhibits endothelin-1-mediated proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. Am J Respir Cell Mol Biol 1993; 9: 429-33.

135. Zhang H, Inazu M, Weir B, Daniel E: Endothelin-1 inhibits inward rectifer potassium channels and activates nonspecific cation channels in cultured endothelial cells. Pharmacol 1994; 49: 11-22.

136. Zimmermann RS, Martinez AJ, Maymind M, Barbee RW: Effect of endothelin on plasma volume and albumin escape. Circulation Res 1992; 70: 1027-34.

Teile aus der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits veröffentlicht:

Schmeck J, Koch T, Haeussler A, Rothfischer W, Neuhof H, van Ackern K: Endothelin-1 induced pulmonary edema is not caused by enhanced capillary permeability in blood free perfused rabbit lungs. Appl Cardiopulm Pathophysiol 1997; 6: 241-6.

Lebenslauf

Name:	Wolfram Georg Rothfischer
Geburtsdatum:	27. Juli 1971
Geburtsort:	Esslingen/Neckar
Eltern:	Brigitte Rothfischer-Bernhard
	Jürgen Rothfischer
Schulbildung:	1977-1981 Grundschule Eislingen
	1981-1990 Erich-Kästner-Gymnasium Eislingen
Zivildienst:	8/1990-10/1991 Klinik am Eichert, Göppingen
Studium:	Beginn 10/1991
	Humanmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen
	Ärztliche Vorprüfung 9/1993
	1. Staatsexamen 8/1994
	2. Staatsexamen 9/1997
	3. Staatsexamen 10/1998
Arzt im Praktikum:	12/1998-5/2000 an der Orthopädischen Klinik der St.-Vincentius-Kliniken Karlsruhe bei Herrn Prof. Dr. med. Peter Schuler
Assistenzarzt:	seit 7/2000 am Departement für Allgemeinchirurgie der Universitätskliniken Basel bei Herrn Prof. Dr. med. Daniel Oertli

Weil am Rhein im August 2002

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Neuhof danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas, für seine engagierte Betreuung und seine jederzeit vorhandene hilfreiche Gesprächsbereitschaft.
Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank Frau Dr. med. Irmingard Kelbel sowie Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Joachim Schmeck für die hervorragende Zusammenarbeit.
Für die unverzichtbare Hilfe und das unermüdliche Engagement bei zahlreichen Problemen bedanke ich mich ebenfalls bei Frau Tiziana Wieth, Frau Anja Weber, Herrn Harald Michnacs und Herrn Peter Müller.
Nicht zuletzt danke ich Achim Häussler für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die ständigen Anregungen bei den Versuchsdurchführungen.