Selektive Hemmung der Aktivität des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor-kappa B im Modell der isolierten Rattenlunge nach Stimulation mit bakteriellem Endotoxin

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

vorgelegt von Eisenhardt, Nils Alexander
aus Gießen

Gießen 2005

Aus dem Zentrum für Pathologie, Leiter: Prof. Dr. A. Schulz,
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH,
Standort Gießen

Gutachter: PD Dr. L. Ermert
Gutachter: PD Dr. T. Menges

Tag der Disputation: 24.10.2006

Meinen lieben Eltern

„Ich will nach oben.
Aber nicht zu schnell.“
Jan Ullrich

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

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Fragestellung 1

1.1 Einleitung 1

1.1.1 Pathogenese des akuten Lungenversagens 1

1.1.2 Rolle der Endotoxine 3

1.1.3 Pulmonaler Zyklooxygenase-abhängiger Arachidonsäure-metabolismus 4

1.1.4 Priming 7

1.1.5 LPS-vermittelte Signaltransduktion 8

1.1.6 Der Transkriptionsfaktor NF-κB 10

1.1.7 Struktur der NF-κB- und IκB-Proteine 11

1.1.8 Aktivierung von NF-κB durch den IκB-Kinasekomplex (IKK) 12

1.1.9 Bedeutung von NF-κB 15

1.2 Zielsetzung der vorliegenden Studie 16

2 Material und Methoden 18

2.1 Material 18

2.1.1 Versuchstiere 18

2.1.2 Reagenzien 18

2.2 Methodik 19

2.2.1 Das Modell der isolierten Lunge 19

2.2.1.1 Präparation der Lunge 20

2.2.1.2 Das Ventilationssystem 21

2.2.1.3 Das Perfusionssystem 21

2.2.2 Meßparameter und Meßwertregistrierung 24

2.2.2.1 Kapillärer Filtrationskoeffizient 24

2.2.2.2 Bestimmung des Kapillardrucks durch Doppelokklusion 27

2.3 Versuchsablauf und Versuchsprotokoll 28

2.3.1 NF-κB-Inhibitoren 29
2.3.2 VPE und Clamping 30
2.3.3 Perfusatanalysen 30
2.4 ELISA-Messungen 31
2.5 Statistik 31

3 Ergebnisse 32
3.1 Versuchsgruppen ohne Inhibitorzugabe 32
3.2 Reaktion der Lunge nach NF-κB-Hemmung 32
3.3 Metabolite des AA-Stoffwechsels im Perfusat 34
3.3.1 Versuchsgruppen ohne Inhibitorzusatz 34
3.3.2 Inhibitorgruppen 35
3.3.2.1 TxB_2 im Perfusat 35
3.3.2.2 PGE_2 im Perfusat 35
3.3.2.3 6-keto PGF_{1alpha} im Perfusat 36
3.3.2.4 PGF_{2alpha} im Perfusat 36
3.4 Kapillärer Druck (Pc) und Gewichtsveränderung (ΔW) während hydrostatischer Druckerhöhung (VPE) 37
3.5 Kapillärer Filtrationskoeffizient (Kfc) 38

4 Diskussion 40

5 Literaturverzeichnis 58

6 Anhang 73
6.1 Tabellen und Diagramme 73
6.2 Substanzen 92
6.3 Geräte 93

7 Abkürzungsverzeichnis 94

8 Zusammenfassung 96

Abstract 98

Wissenschaftliche Publikationen 100

Danksagung 101

Lebenslauf 102

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Einleitung

Die Lunge ist ein entscheidendes Zielorgan inflammatorischer Mediatoren, welche während entzündlicher Prozesse oder nach schweren Traumen freigesetzt werden. Das akute septische Lungenversagen resultiert aus einem komplexen Zusammenspiel zwischen aggressiven Entzündungszellen und immunologischen Mediatoren. Die Transkription von proinflammatorischen Genen wird über eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade mit anschließender Aktivierung diverser Transkriptionsfaktoren reguliert. Nuklear Faktor-kappa B (NF-κB) ist ein ubiquitär vorkommender Transkriptionsfaktor, der die Transkription vieler proinflammatorischer Enzyme und Mediatoren steuert, die in der Pathogenese des akuten septischen Lungenversagens eine Rolle spielen. Genauere Kenntnisse über die Aktivität von NF-κB in einem komplexen Organ, wie der Lunge, liegen bisher nur unzureichend vor. Die Untersuchung der pulmonalen Reaktion nach Stimulation mit bakteriellem Endotoxin bei selektiver Hemmung des Transkriptionsfaktors NF-κB, wie in der vorliegenden Studie geschehen, könnte dazu beitragen, die Details der pathophysiologischen Sequenzen bei der Entstehung des akuten septischen Lungenversagens aufzuklären um zukünftige therapeutische Optionen zu eröffnen.

1.1.1 Pathogenese des akuten septischen Lungenversagens

Von Ashbaugh et al. wurde im Jahre 1967 ein klinisches Syndrom beschrieben, welches Tachypnoe, diffuse alveoläre Infiltrate, persistierende Hypoxämie trotz Sauerstoffgabe und verminderte pulmonale Compliance zusammenfasste. Dieses trat bei 12 Patienten akut auf, und manifestierte sich bei Personen, die keine pulmonalen Erkrankungen in der Vorgeschichte aufwiesen (1). Aus den

verschiedenen Synonyma wie „Schocklunge“ oder „septische Lunge“ setzte sich der Begriff ARDS („Acute Respiratory Distress Syndrome“) für diese Lungenfunktionsstörung durch. Es dauerte über 20 Jahre, bis eine einheitliche Definition dieser Erkrankung durch die North American-European Consensus Conference (NAECC) im Jahre 1994 festgelegt wurde. Diese Definition richtet sich sowohl nach dem zeitlichen Verlauf, als auch nach den klinischen, radiologischen und physiologischen Veränderungen der Lunge und ihrer Funktion, welche nicht durch linksventrikuläre Hypertension erklärt werden können (2, 3, 4).

Zu den pathophysiologischen Veränderungen, die zum akuten respiratorischen Versagen führen, zählen die Permeabilitätserhöhung des kapillären Gefäßendothels mit Schäden an der alveolären Epithelschranke und die akute pulmonale Gefäßwiderstandserhöhung durch prä- und postkapilläre Vasokonstriktion. Diese Veränderungen, kombiniert mit Mikroembolisationen, führen in der frühen, sogenannten „exsudativen“ Phase des ARDS zu einem proteinreichen interstitiellen- und anschließend alveolären Lungenödem mit Untergang von Surfactant produzierenden alveolären Epithelzellen Typ I. Durch das Missverhältnis zwischen Lungenperfusion und Ventilation kommt es zu vermehrtem Shunt-Fluss, zu Vasokonstriktion und Diffusionsstörungen. In der anschließenden „proliferativen“ Phase bewirkt eine Aktivierung von Makrophagen und Fibroblasten einen fibrotischen Umbau der Lungenstruktur.
Klinische Leitsymptome des akuten Lungenversagens sind die arterielle Hypoxämie, Dyspnoe und Tachypnoe resultierend aus einem erhöhten pulmonalen Gefäßwiderstand, der Bronchokonstriktion und dem perivaskulären und intraalveolären Ödem.

Auch heute noch stellt das ARDS ein persistierendes Problem in der modernen Intensivmedizin dar. Die Inzidenz der Erkrankung wird je nach Studienansatz zwischen 1,5 bis 8,4 Fällen pro 100.000 Einwohnern angegeben (5, 6, 7). Bei den etwa 150.000 Fällen, die jährlich alleine in den USA auftreten, wird eine Mortalitätsrate von 30-60%, in einigen Studien sogar bis 90% angegeben (8).

1.1.2 Rolle der Endotoxine

Neben direkten, primären Schäden an der Lunge, wie durch Pneumonien oder Aspiration hervorgerufen, sind es in der Mehrzahl extrapulmonale sekundäre Ereignisse, welche zu einem ARDS führen können. Dazu gehören unter anderem das Polytrauma, Verbrennung, Schock oder Sepsis (5, 6). Ursächlich an erster Stelle für die Lungenfunktionsstörung, aus der sich das klinische Bild eines ARDS entwickelt, steht weiterhin eindeutig die Sepsis (6, 7, 9).

Im Rahmen einer Sepsis sind bakterielle Endo- oder Exotoxine die entscheidenden Auslöser der inflammatorischen Kaskade, die sich als ARDS oder schließlich organübergreifend als septisches Multiorganversagen manifestieren kann (9, 10, 11). Endotoxine sind Lipopolysaccharide (LPS), die auf der äußeren Membran gram-negativer Bakterien lokalisiert sind. Diese Lipopolysaccharide setzen sich aus drei verschiedenen Hauptkomponenten zusammen: der O-spezifischen Seitenkette, die als Hauptantigenkomponente die Bildung von Antikörpern hervorruft, einem Kernpolysaccharid und dem Lipid A mit einer variablen Zahl von Fettsäureketten. Membrangebunden hat LPS keine toxische Wirkung, erst beim Zerfall gram-negativer Bakterien wird LPS freigesetzt und kann seine toxische Wirkung entfalten (12, 13). Dabei stellt das Lipid A, fest verankert in der Bakterienmembran, den Hauptpathogenitätsfaktor dar, der nach seiner Freisetzung im betroffenen Organismus über eine Interaktion mit Empfängerzellen des Immunsystems für die pathophysiologischen Veränderungen im Rahmen der Sepsis im Organismus verantwortlich ist (14).

Die Zirkulation von freigesetztem LPS bewirkt neben einer direkten Schädigung der Organe auch eine Aktivierung verschiedenster Entzündungszellen wie Granulozyten, Monozyten, B-Lymphozyten und Alveolarmakrophagen. Die aktivierten Immunzellen setzen nun ihrerseits aggressive Mediatoren frei, um Bakterien zu zerstören und deren Toxine zu inaktivieren. Bei diesen Mediatoren handelt es sich um proinflammatorische Zytokine, darunter Interleukine (IL-1, IL-6, IL-8) und Tumor-

Nekrose-Faktor α (TNFα). Diese Mediatoren bewirken in weiteren Zielzellen die Freisetzung von Stickoxid (NO), Komplement, plättchenaktivierender Faktor (PAF) und Prostanoiden. Als Prostanoide werden Metabolite der Arachidonsäure bezeichnet, welche über den Zyklooxygenaseweg gebildet werden (15).

1.1.3 Pulmonaler Zyklooxygenase-abhängiger Arachidonsäuremetabolismus

Enzyme und Metabolite des Zyklooxygenase-abhängigen Arachidonsäure-metabolismus nehmen eine zentrale Rolle in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen der Lunge ein. Sie sind entscheidend an den Tonusveränderungen pulmonaler Gefäße sowie der Bronchokonstriktion beim akuten Lungenversagen beteiligt und haben eine wichtige Funktion bei der Regulierung der Permeabilität des Kapillarendothels und des Alveolarepithels (16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23).

Die Zyklooxygenase (Cox) katalysiert die Umwandlung der Arachidonsäure (AA) zu Prostaglandin H_2 (PGH_2). Dieses chemisch instabile Endoperoxid wird durch die verschiedenen Synthetasen in weitere Metabolite umgewandelt (Abb. 1). Aus AA entstehen auf diesem Weg die klassischen Prostaglandine D_2, E_2 und $F_{2\alpha}$, sowie die Prostanoide Thromboxan (TX) A_2 und Prostazyklin (PGI_2).

Diese Metabolite der AA haben zum Teil antagonistische Wirkungen auf vasomotorische Regulation und Sepsis-induzierte inflammatorische Vorgänge in der Lunge (21).

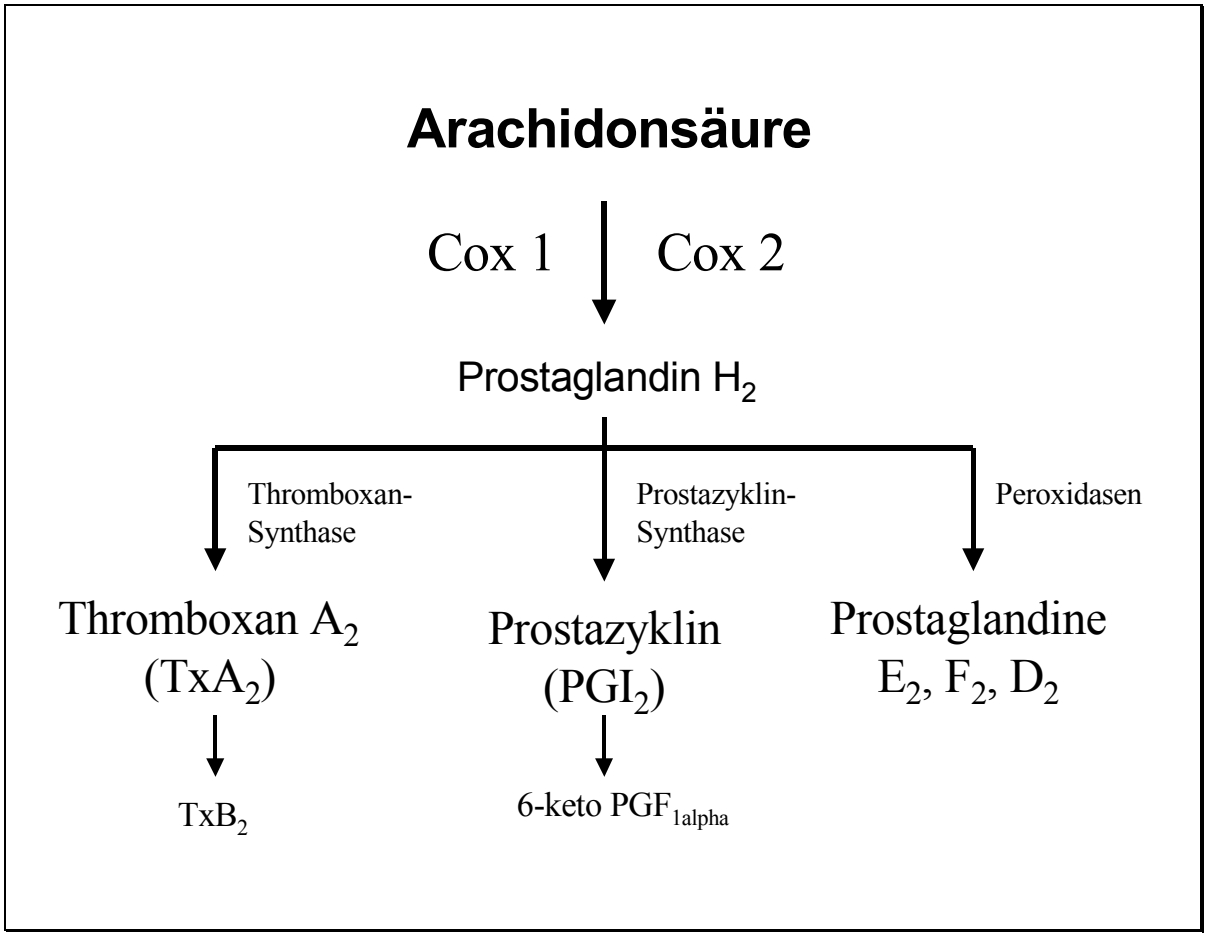


Abb. 1. Schematische Übersicht der Zyklooxygenaseprodukte der Arachidonsäue (Prostanoide).

Dargestellt ist die Entstehung des zentralen Produkts PGH_2 und die wichtigsten Metabolite. Die einzelnen Schritte werden enzymatisch katalysiert. Die Abbauprodukte 6-keto PGF_{1alpha} aus PGI_2 und TxB_2 aus TxA_2 entstehen durch spontanen Zerfall.

Thromboxan A_2 wird z.B. in Thrombozyten, Bronchialepithelzellen, glatten Muskelzellen und Alveolarmakrophagen durch eine Thromboxan-Synthase produziert und ist verantwortlich für eine Kontraktion der glatten Muskulatur mit konsekutiver potenter Vaso- und Bronchokonstriktion, während Prostazyklin, unter anderem in Endothelzellen durch eine Prostazyklin-Synthase gebildet, zu einer Vasodilatation führt (16, 20, 36). Der funktionelle Antagonismus dieser beiden Arachidonsäuremetabolite stellt in der Regulation des pulmonalen Vaso- und

Bronchotonus einen wichtigen Steuerungsmechanismus dar. PGF_{2alpha} wird eine potente bronchokonstriktorische Aktivität in den glatten Muskelzellen der Atemwege zugeschrieben und gilt als pulmonal vasokonstriktorisch wirksam (24). PGE_2 ist ein starker Vasokonstriktor und Bronchodilatator und nimmt Einfluß auf die Sekretliberation und proliferative Prozesse (25).

Das Schlüsselenzym der LPS-induzierten Prostanoidbildung, die Zyklooxygenase, existiert in mindestens zwei Isoformen: Cox-1, die ubiquitär gebildet wird, und der man die Kontrolle physiologischer Funktionen in Lunge, Magen und Niere zuschreiben konnte (26, 27 28) sowie Cox-2, die lange Zeit als eine nur unter inflammatorischen Bedingungen induzierbare Isoform galt (27, 29, 30 31). In den letzten Jahren zeigten neuere Untersuchungen, dass auch Cox-2, konstitutiv exprimiert, an der Regulation physiologischer Prozesse in den verschiedenen Organsystemen wie den Nieren (32), im Gastrointestinaltrakt (33), sowie im zentralen Nervensystem (34) und der Lunge (35, 43) beteiligt ist.
In normalem Lungengewebe lässt sich sowohl Cox-1 als auch Cox-2 nachweisen, wobei sich unterschiedliche Lokalisationen der beiden Isoenzyme aufzeigen (35). Während Alveolarmakrophagen und pulmonale Endothelzellen unter physiologischen Bedingungen beinahe ausschließlich Cox-1 exprimieren, findet man Cox-2 hauptsächlich in makrophagen-ähnlichen Zellen im perivaskulären und peribronchialen Bindegewebe, und besonders ausgeprägt in glatten Muskelzellen der pulmonalen Widerstandsgefäße (35). Weiterhin sind eine gemeinsame Lokalisation von Cox-2 und der Thromboxan-Synthase in der glatten Gefäßmuskulatur sowie eine Koppelung von Cox-1 mit der Prostazyklin-Synthase im Gefäßendothel bekannt (36, 37). Somit ist eine Regulation des pulmonalen Gefäßtonus über eine spezifische Koppelung von Cox-2/Thromboxan-Synthase in der glatten Gefäßmuskulatur (Vasokonstriktion) und von Cox-1/Prostazyklin-Synthase in den Endothelzellen (Vasodilatation) möglich.
Die Auswirkungen von LPS auf den pulmonalen Cox-abhängigen AA-Metabolismus, besonders im Rahmen einer Sepsis, sind in sogenannten „Priming“-Versuchen am Modell der isolierten Lunge genauer untersucht worden (38, 41).

1.1.4 Priming

Als „Priming“ bezeichnet man das Phänomen, dass die Vorstimulation der isolierten Lunge mit geringen Mengen Endotoxin in Kombination mit einem zweiten Reiz, wie z.B. Arachidonsäure, eine verstärkte Reaktion der physiologisch messbaren Parameter wie pulmonalarterieller Druck, Ventilationsdruck und Gewicht zur Folge hat, während weder die alleinige Endotoxin-Gabe, noch der zweite allein verabreichte Stimulus zu vergleichbar starken pulmonalen Reaktionen führen würde (22, 39, 40). Diese überschießende Reaktivität der isolierten Lunge auf den Primingeffekt wird unter anderem durch eine erhöhte Expression der Zyklooxygenaseenzyme bedingt (41, 42). Durch LPS-Priming mit nachfolgender Arachidonsäurestimulation in isolierten Rattenlungen läßt sich eine Erhöhung von Cox-2 und Thromboxan-Synthase in der glatten Gefäßmuskulatur der bronchialen Arterien nachweisen (36, 42). Die durch das Priming hervorgerufene Überexpression von Cox-2 führt zu einer Erhöhung des bereits beschriebenen Zyklooxygenase-abhängigen Arachidonsäuremetabolismus, resultierend in der Bildung des potenten Vasokonstriktors TxA_2 (43). Die Cox-2-abhängige, Thromboxan-vermittelte Gefäß- und Bronchialdruckerhöhung im Modell der isolierten Lunge kann zu Rückschlüssen auf die vaskulären Veränderungen während septischer Lungenerkrankungen herangezogen werden (35, 36, 41, 42). Diese „Priming“-Reaktion durch Endotoxin spielt klinisch eine wichtige Rolle beim ARDS. Patienten die im Zuge einer Infektion mit bakteriellem Endotoxin in Kontakt kommen, d.h. ein „Priming“ durchlaufen, sind durch eine bakterielle Mischinfektion erheblich gefährdet. Die gesteigerte Aktivierung proinflammatorischer Metabolite führt zu pathophysiologischen Reaktionen, die sich klinisch in pulmonalem Hypertonus, erhöhtem Atemwegswiderstand und in der Ausbildung eines Lungenödems äußern können. Um die ablaufende inflammatorische Kaskade, ausgelöst durch LPS, bis zur Aktivierung des Arachidonsäuremetabolismus zu verstehen, muss man die zellulären Mechanismen der Signaltransduktion genauer betrachten.

1.1.5 LPS-vermittelte Signaltransduktion

Um auf zellulärer Ebene seine Wirkung auf den Organismus zu vermitteln, stehen LPS membrangebundene Rezeptoren zu Verfügung. Eine wichtige Rolle spielt der Membran Rezeptor CD14 (mCD14) im Zusammenspiel mit dem Plasmaprotein „Lipopolysaccharide-Binding-Protein“ (LPB) (11, 44, 45, 46). In Zellen, die keine Oberflächenrezeptoren wie mCD14 exprimieren, z.B. Epithelzellen der kleinen Bronchien, glatte Muskelzellen der Bronchien, Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen der Arterien (42), sind plasmalösliche Formen von CD14 (sCD14) für die Oberflächenerkennung bekannt, die ebenfalls einen Komplex mit LPS und LPB bilden können (44, 45, 47). Aufgrund einer fehlenden eigenen intrazellulären Signaltransduktionsdomäne ist der CD14-Rezeptor allerdings nicht alleine in der Lage, das LPS-induzierte Signal in das Zellinnere weiterzugeben. Mitglieder der erst kürzlich entdeckten Toll-like-Rezeptor (TLR)-Familie übernehmen diese Funktion, da diese über eine intrazelluläre Signaltransduktionsdomäne verfügen, die durch Interaktion mit dem CD14-Rezeptor das Signal in das Zellinnere abgeben kann. Von den verschiedenen TLR fungieren die Transmembranproteine TLR2 und TLR4 wahrscheinlich als Korezeptoren von CD14 (48). Dabei gilt als erwiesen, daß TLR4 einen spezifischen Rezeptor für LPS gramnegativer Bakterien darstellt, während TLR2 andere bakterielle Komponenten, wie z.B. Lipoproteine (49), Lipopeptide (50) und Lipoteichonsäure grampositiver Bakterien erkennt (51, 52).

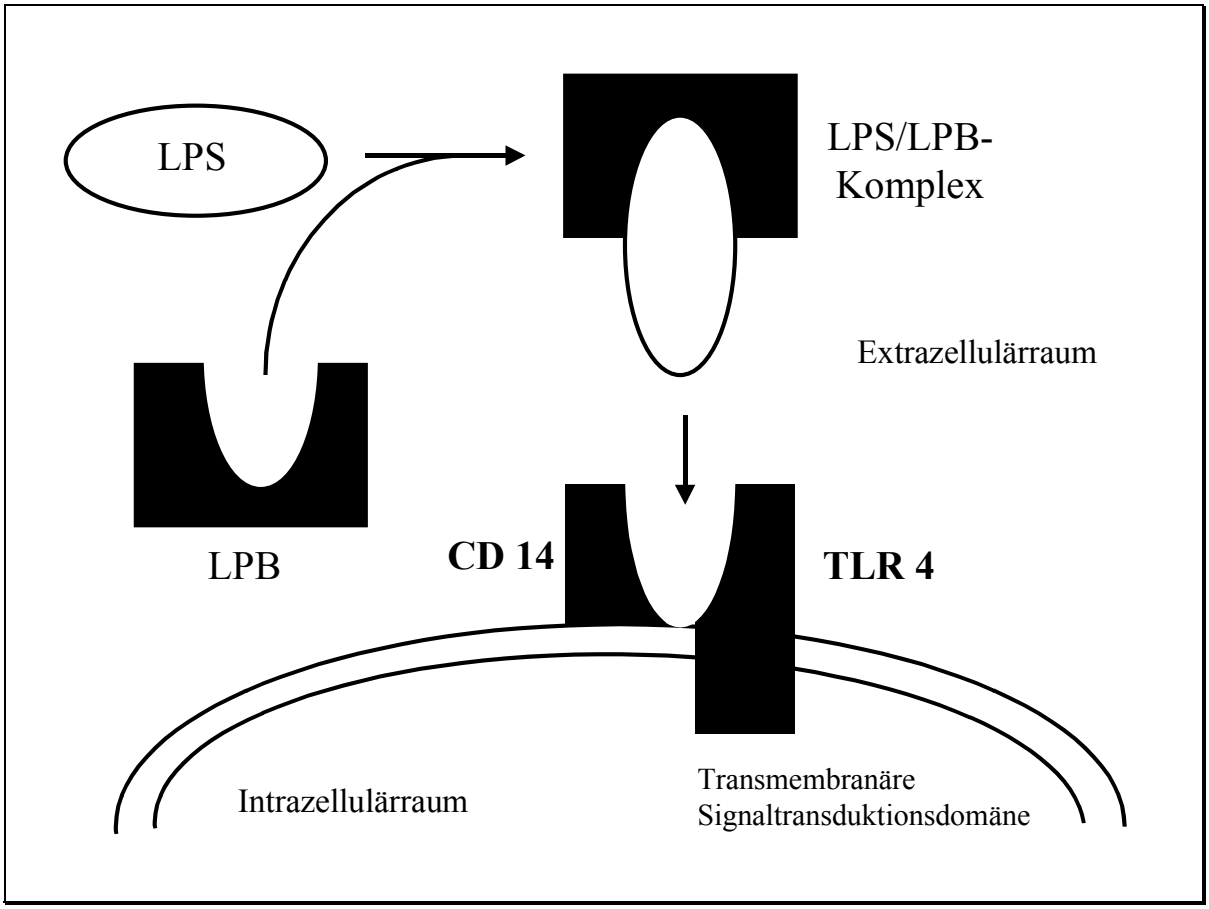


Abb. 2. Schematische Darstellung der LPS-vermittelten Signalübertragung in die Zelle.

LPS muß extrazellulär einen Komplex mit dem Lipopolysaccharide-Binding-Protein (LPB) eingehen, um mit den spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche eine Verbindung eingehen zu können. Über den transmembranösen Rezeptor CD14 im Zusammenspiel mit seinem Korezeptor TLR4, der über eine intrazelluläre Signaltransduktionsdomäne verfügt, kann das LPS-vermittelte Signal die Zellmembran passieren.

Die intrazelluläre Fortleitung des Signals wird durch Dimerisierung der TLRs ausgelöst. Im weiteren Verlauf kommt es zur Rekrutierung verschiedener Adapterproteine wie MyD88, der IL-1-Rezeptor-assoziierten Kinase (IRAK) oder des TNF-Rezeptor-assoziierten Faktor (TRAF)-6. An dieser Stelle teilt sich die intrazelluläre Signalkaskade auf. Schlüsselelemente der einen Signalkaskade der Signalübertragung im Zytoplasma der durch LPS aktivierten Zelle sind

Proteinkinasen, die als MAP-Kinasen (Mitogen aktivierte Protein Kinase, MAPK) oder als ERK (Extrazellulär regulierte Signal Kinase) bezeichnet werden. ERK1 (p44)- und ERK2 (p42)-Kaskaden regulieren das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung (53), die „c-Jun NH_2-terminal kinase“ (JNK)- und die p38 MAPK-Kaskaden kontrollieren vor allem Streßantworten wie Entzündung und Apoptose (54, 55).
Für die LPS-induzierte intrazelluläre Signalübertragung scheint besonders die p38 MAPK notwendig zu sein, wie Studien an Makrophagen zeigen. Weitere Untersuchungen bestätigen die Beteiligung des p38 MAPK Signaltransduktionsweges an der Bildung und Regulation der Cox-2/Thromboxan-Achse in LPS-stimulierten Lungen (38). Eine wichtige Funktion der MAP-Kinasen besteht somit in der Aktivierung von kerngängigen Transkriptionsfaktoren, welche über Transkription und Expression regulatorischer Gene die Bildung von immunologischen Zellen und Mediatoren während proinflammatorischer Prozesse kontrollieren.

1.1.6 Der Transkriptionsfaktor NF-κB

Nuclear factor-κB (NF-κB) wurde von Sen und Baltimore 1986 als ein Protein in B-Lymphozyten entdeckt, das die Fähigkeit hatte, sich in den Enhancer Regionen der Gene zu binden, welche die kappa leichte Kette (kL) von Immunglobulinen kodieren (56). Mittlerweile weiß man, dass NF-κB ein im Organismus ubiquitär vorkommender Transkriptionsfaktor ist, der eine wichtige Rolle bei inflammatorischen Prozessen spielt. Er scheint als zentraler Regulator sowohl an der Transkription vieler proinflammatorischer Zytokine wie TNFα, IL-1 und IL-6 als auch den mitogeninduzierten Enzymen Cox-2 und iNOS beteiligt zu sein (57, 58, 59, 60). Durch NF-κB regulierte Gene nehmen weiterhin eine wichtige Stellung in der Kontrolle der Immunantwort ein und sind an der Regulierung der Zellproliferation und der Apoptose beteiligt (60, 61). In den meisten Zellen wird NF-κB im Zytoplasma durch Wechselwirkung mit inhibitorischen IκB-Proteinen in einem inaktiven Zustand

gehalten. Eine Ausnahme bilden Antikörper-produzierende B-Zellen, aktivierte T-Zellen und Makrophagen, in denen der Transkriptionsfaktor konstitutiv im Zellkern aktiviert ist (56, 62, 63).

1.1.7 Struktur der NF-κB- und IκB-Proteine

NF-κB ist ein dimerer Transkriptionsfaktor, dessen Untereinheiten aus Proteinen der Rel-Familie bestehen. Derzeit sind fünf Mitglieder der NF-κB Familie in Säugetieren identifiziert, welche NF-κB1 (p50/p105), NF-κB2 (p52/p100), p65 (Rel A), Rel B und c-Rel einschließen (64). Die Mitglieder dieser Rel-Familie zeichnen sich alle durch eine gemeinsame Rel-Homologiedomäne aus, welche für die DNA-Bindung, die Interaktion mit IκB und die Dimerisierung verantwortlich zu sein scheint (65, 66). Verschiedene Kombinationen von homo- und heterodimeren Zusammensetzungen sind derzeit bekannt. Am häufigsten findet man NF-κB Heterodimere aus p50 oder p52 und einer p65 Untereinheit. Andere mögliche Formen beinhalten p65/c-Rel Heterodimere und p50/p50, p52/p52 und RelA/RelA Homodimere (65). Während alle Untereinheiten imstande sind sich an DNA zu binden, binden nur p65, Rel-B und c-Rel an DNA-Regionen, welche zur Aktivierung von Transkriptionsprozessen erforderlich sind (66, 67, 68).

Dass NF-κB im Zytoplasma unstimulierter Zellen inaktiviert vorliegt, bedingt die Interaktion mit einem Mitglied der inhibitorischen kappa B (IκB) Familie (65). IκB-Proteine binden im Zytoplasma an NF-κB, verdecken dadurch die Kernlokalisationssequenz der Rel-Proteine und behindern das Eindringen des Transkriptionsfaktors in den Zellkern (65, 66, 69, 70). Für die Inhibition von NF-κB sind hauptsächlich IκBα, IκBβ und IκBε von Bedeutung, die mit dem NF-κB Dimer in Form eines tertiären Komplexes wechselwirken. IκBα ist das am längsten bekannte und am besten charakterisierte inhibitorische Protein (71). Es wird ubiquitär im Organismus exprimiert und bindet bevorzugt an die p65 oder c-Rel Untereinheit von NF-κB (64, 72). Alle bekannten NF-κB aktivierenden Signale führen über einen

Abbau von IκBα zu einer transienten Aktivierung des Transkriptionsfaktors (73). Im Gegensatz dazu wird IκBβ nur nach Stimulation mit LPS und IL-1 abgebaut, die beide eine persistierende Aktivierung des Transkriptionsfaktors hervorrufen (74).

1.1.8 Aktivierung von NF-κB durch den IκB-Kinasekomplex (IKK)

Die Aktivierung von NF-κB ist ein wesentlicher regulatorischer Prozess in einer Signaltransduktionskaskade, die durch LPS-Stimulation an der Zelloberfläche beginnt und im Zellkern mit der Transkription proinflammatorischer Gene endet. Eine Vielzahl von Stimuli können zur Aktivierung von NF-κB führen. Zu den potentesten gehören Zytokine wie TNFα und IL-1 sowie das bereits beschriebene Endotoxin LPS gramnegativer Bakterien (67, 75). Die Aktivierungskaskade verläuft in mehreren Schritten im Zytoplasma stimulierter Zellen ab. Die Signaltransduktionswege dieser Stimuli beginnen zum Teil an unterschiedlichen Rezeptoren der Zelloberfläche, die intrazellulär gelegenen Abschnitte der Signalkaskade im Zytoplasma sehen für die verschiedenen NF-κB-Induktoren jedoch gleich aus.

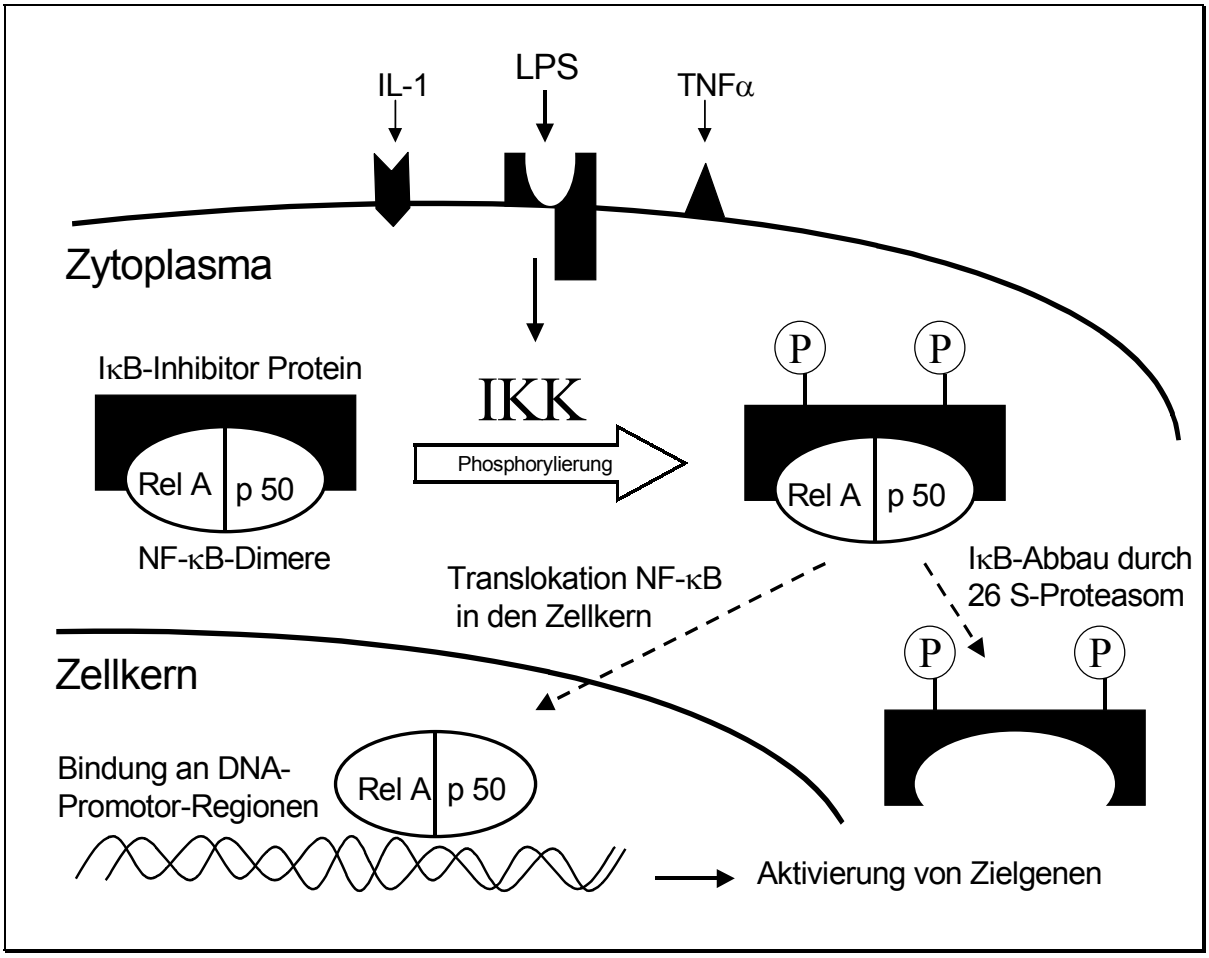


Abb. 3. Aktivierungsmechanismus von NF-κB.

Beispielhaft ist die Aktivierung eines p65 (RelA)/p50-Hetreodimers in Komplex mit IκBα dargestellt. Unterschiedliche Stimuli aktivieren den IκB-Kinasenkomplex (IKK), welcher IκBα an zwei Serinresten phosphoryliert. Es folgt die Polyubiquitinierung von IκBα und dessen Degradierung durch das 26S-Proteasom. Das freigesetzte NF-κB kann in den Zellkern translozieren und an den Promotoren seiner Zielgene binden.

Die NF-κB aktivierende Phosphorylierung von IκBα nach proinflammatorischen Stimuli, wird durch den IκB-Kinasekomplex (IKK) katalysiert, der als Hauptregulator eine Schlüsselfunktion in der Signalkaskade einnimmt (76, 77, 78). An diesem Komplex konvergieren die meisten der durch unterschiedliche Stimuli ausgelösten Signaltransduktionswege. Den Hauptbestandteil von IKK bilden zwei Kinasen, die

IκB Kinase-1 (IKKα) und IκB Kinase-2 (IKKβ), welche eine große Sequenzhomologie aufweisen und in etwa äquimolaren Mengen in der Mehrheit der IKK-Komplexe enthalten sind (71, 79, 80, 81). Untersuchungen an Knock-out-Mäusen für IKKα und IKKβ haben gezeigt, dass IKKα für die Aktivierung des IκB-Kinasekomplex durch proinflammatorische Stimuli nicht notwendig ist, sondern eine wichtige Rolle in der Differenzierung der Epidermis spielt, wohingegen IKKβ die für die NF-κB-Aktivierung notwendige katalytische Untereinheit darstellt (16, 82, 83). Ein weiteres Molekül des IKK-Komplexes wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen entdeckt und wird als IKKγ (79), NEMO (NF-κB essential modifier) (80) oder IKK-associated protein 1 (IKKAP1) (84) bezeichnet. Seine regulatorische Funktion spielt eine entscheidende Rolle in der Aktivierung von NF-κB, ohne dabei direkt an der Phosphorylierung der IκBs beteiligt zu sein (79, 80).
Erst kürzlich konnte eine weitere Kinase des Komplexes durch Shimada et al. identifiziert werden (85). Sie isolierten einen Komplex namens IKKε oder IKK-i (für inducible IκB Kinase) aus Endotoxin-stimulierten Makrophagen. Diese neue Kinase unterscheidet sich funktional und strukturell von dem konstitutiv gebildeten Kinasenkomplex und weist lediglich zu 27% Homologie zu IKKα und IKKβ auf (81, 85, 86). IKK-i ist ebenfalls in der Lage IκBα zu phosphorylieren und nachweislich durch LPS oder andere inflammatorische Zytokine in verschieden Immunzellreihen, isolierten Makrophagen und Lymphozyten induzierbar (85, 87).

Wie die IκB-Proteine so wird auch IKK durch Phosphorylierung reguliert (88). Der exakte Mechanismus der Aktivierung des IKK-Komplex ist bisher noch nicht geklärt. Es wird angenommen, daß je nach Stimulus und Gewebe vorgeschaltete Kinasen die initiale Phosphorylierung übernehmen und die vollständige Aktivierung von IKK dann über Autophosphorylierungsreaktionen verläuft (71). Derzeit sind verschiedene verantwortliche Kinasen gefunden worden, darunter Mitglieder der Mitogen-aktivierten Protein Kinase Kinase Kinase (MAPKKK) Familie (84), NIK (NF-κB inducing kinase) (81, 85) NAK (NF-κB activating kinase) (89) und die Ubiquitin abhängige Kinase TAK1 (90). Derzeit ist noch weitgehend ungeklärt, welche Rolle

die verschiedenen Kinasen in der komplexen Aktivierung von NF-κB einnehmen, und es darf angenommen werden, dass noch nicht alle in der Aktivierung des IKK-Komplex beteiligten Kinasen identifiziert wurden.

1.1.9 Bedeutung von NF-κB

Man kennt inzwischen annähernd 200 Gene, die durch NF-κB reguliert werden (75). Ein großer Teil dieser Gene kodiert Zytokine, Zelladhäsionsproteine, Akute-Phase-Proteine und Proteine der Stressantwort, was die Bedeutung des Transkriptionsfaktors bei inflammatorischen Ereignissen aufzeigt (71, 72, 91). Über andere Zielgene kommt dem Transkriptionsfaktor eine regulierende Funktion in physiologischen Differenzierungsprozessen, der Zellzyklusprogression und der Apoptose zu (60, 61, 64, 92). Die transiente Induktion des Transkriptionsfaktors ermöglicht dem Organismus, auf pathogene und stressinduzierte Stimuli zu reagieren. Das in der Initialphase von septischen Prozessen in Leukozyten durch proinflammatorische Zytokine (IL-1 und TNFα) und bakterielles Endotoxin (LPS) aktivierte NF-κB führt zur Stimulation und Produktion von weiteren proinflammatorischen Zielgenen wie Interleukine, TNFα, iNOS und Cox-2 und hat somit einen entscheidenden Einfluss auf die Progression und Dauer der Entzündung (60, 65, 93). Bleibt NF-κB in den Entzündungszellen aktiviert, entfällt die Auflösung der Entzündung durch Bildung antiinflammatorischer Mediatoren und Apoptose eingewanderter Leukozyten. Zu den Krankheiten, bei denen durch NF-κB regulierte Gene eine Rolle spielen, gehören inflammatorische Ereignisse im Rahmen von Glomerulonephritiden, Arteriosklerose, dem septischen Schock oder Lungenfibrose sowie chronische Erkrankungen wie Asthma und rheumatische Arthritis (60, 65, 94, 95, 96). Auch in der Kontrolle der Immunantwort ist die NF-κB-Signalkaskade wichtig, da sie in der Proliferation und Differenzierung von B- und T-Lymphozyten modulierend eingebunden ist (75).

In den letzten Jahren wurde die Beteiligung von NF-κB in der Regulation von inflammatorischen Prozessen umfassend untersucht. Die genaue Funktion der verschiedenen NF-κB-Dimer-Kombinationen sowie die zellspezifische Aktivierung NF-κB-abhängiger Transkriptionsprozesse in komplexen Organen, wie der Lunge, müssen erst noch aufgedeckt werden. Außerdem gibt es bis jetzt noch zu wenig Information hinsichtlich der physiologischen Rolle von NF-κB-abhängigen Transkriptionsprozessen.

1.2 Zielsetzung der vorliegenden Studie

Die vorliegende Arbeit hat die Zielsetzung, wesentliche pathophysiologische Grundlagen der bronchialen und vaskulären Reaktion der Lunge in einem Modell der isoliert perfundierten Rattenlunge unter Endotoxinstimulation („Priming“) aufzuklären. Die „Priming Reaktion“ nach LPS-Stimulation ist durch eine erhöhte pulmonalarterielle Druckreaktion, eine Ventilationsdruckerhöhung und eine Gewichtszunahme sowie eine vermehrte Ausschüttung von Metaboliten des Zyklooxygenase-abhängigen Arachidonsäurestoffwechsels charakterisiert.

Folgende Fragestellungen sollen untersucht werden:

- Hat eine Hemmung des Transkriptionsfaktors NF-κB Einfluß auf die charakteristischen pathophysiologischen Veränderungen während der Endotoxin-vermittelten „Priming-Reaktion“?

- Ist NF-κB unter LPS-Stimulation an pulmonalen Cox-1 bzw. Cox-2-abhängigen Reaktionen beteiligt?

- Welchen Einfluß hat der Transkriptionsfaktor auf die Bronchotonusregulation und die Aufrechterhaltung der endothelialen Barriereeigenschaften pulmonalkapillärer Gefäße?

- Welche Auswirkung hat die Hemmung des Transkriptionsfaktors auf die Perfusatkonzentrationen der verschiedenen AA-Metabolite?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche CD-Ratten (Sprague Dawley) von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von 350-400 Gramm verwendet. Die experimentelle Durchführung der Versuche erfolgte in Übereinstimmung mit den deutschen Tierschutzgesetzbestimmungen und internationalen Richtlinien.

2.1.2 Reagenzien

Die Arachidonsäure (AA) wurde von Paesel und Lorei AG (Frankfurt, Deutschland) bezogen. Das Lipopolysaccharid (LPS) stammt von Salmonella abortus equi, hergestellt von Cytogen (Bodenheim, Deutschland). Als Narkotikum für die Ratte wurde Phenobarbital sodium (Nembutal), bezogen von der Wirtschafts-genossenschaft deutscher Tierärzte (Hannover, Deutschland), verwendet. Xylocain 2% wurde von Astra Chemical (Wedel, Deutschland) hergestellt, Heparin-Natrium wurde gekauft bei Hoffmann-La Roche (Grenzach-Wyhlen, Deutschland).
Die NF-κB-Inhibitoren BAY 11-7082 und BAY 11-7085 wurden erworben bei Biomol Feinchemikalien GmbH (Hamburg, Deutschland).
Beide NF-κB-Inhibitoren sowie die AA wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. LPS und Nembutal wurden mit 0,9% NaCl (Pharmacia, Erlangen, Deutschland) verdünnt.

2.2 Methodik

2.2.1 Das Modell der isolierten Lunge

Das Modell der isolierten Kaninchenlunge ist erstmals von Knowlton und Starling 1912 beschrieben worden. Das blutfrei perfundierte, ventilierte und isolierte Organ bietet die Möglichkeit, die komplexen (patho)physiologischen Zusammenhänge, unabhängig von zentralnervösen, humoralen und metabolischen Einflüssen des Organismus, zu untersuchen. Das Modell der isolierten Kaninchenlunge wird seit 1980 in der Arbeitsgruppe Seeger et al. (97) in verschiedenen Modifikationen eingesetzt. Seit 1995 ist das Modell der isoliert perfundierten Rattenlunge, das auch im Rahmen dieser Arbeit benutzt wurde, in Gießen etabliert (43).
Zur Versuchsdurchführung wird die mit einem definierten Gasgemisch beatmete Lunge dem Tier entnommen und an ein Perfusionssystem angeschlossen, welches die Lunge rezirkulierend mit einer Elektrolytlösung perfundiert. Neben der kontinuierlichen, computergestützten Erfassung des pulmonalarteriellen-, pulmonalvenösen- und des Beatmungsdrucks, werden Veränderungen des Lungengewichts aufgezeichnet. Während des Versuchs werden dem Perfusat verschiedene Wirkstoffe in festgelegten Konzentrationen zugeführt, und die Reaktion der Lunge anhand der Veränderungen der kontinuierlich gemessenen Parameter registriert. Es besteht weiterhin die Möglichkeit, in zeitlich festgelegten Abständen Proben aus dem zirkulierenden Perfusat für weitere Untersuchungen zu entnehmen. So können die in das Perfusat abgegebenen Mediatoren, welche die Lunge als Reaktion auf die zugegebenen Wirkstoffe abgibt, mittels ELISA-Messungen quantitativ bestimmt werden.

2.2.1.1 Präparation der Lunge

Die Narkotisierung des Tieres erfolgte durch eine perkutane intraperitoneale Applikation von 0,6 ml Nembutallösung (100 mg/kg Körpergewicht) verdünnt mit 0,4 ml NaCl in das rechte untere Abdomen. Nach Eintreten der Narkose wurde das Tier auf dem Präparationstisch in Rückenlage fixiert und das Präparationsgebiet mit Braunodermlösung desinfiziert. Nach einer subkutanen, prätrachealen Infiltrationsanästhesie mit 2% Xylocain konnte man das Tier nach vorsichtiger Präparation der Trachea über eine mediane Inzision tracheotomieren und eine Kanüle in die Luftröhre einbinden. Die Trachealkanüle (Hugo-Sachs-Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) wurde an das Beatmungssystem angeschlossen.
Nach Abpräparation des Bauchfells in der Medianlinie des Unterbauchs erfolgte die Laparatomie entlang der Rippenbögen und nach kaudal in der Medianen bis zur Blase. Das Tier wurde anschließend über die Vena renalis sinistra mit 1.000 I.E. Heparin-Natrium antikoaguliert.
Um dem Kollabieren der Lunge nach der Thorakotomie vorzubeugen, setzte man bei der Thoraxeröffnung ein Ventil zur Aufrechterhaltung eines positiv endexpiratorischen Beatmungsdrucks (PEEP) ein. Zeitgleich wurde der bisherigen Raumluftventilation eine CO_2-Insufflation von 4% zugeschaltet. Mit Hilfe von Thoraxklemmen konnte der Brustkorb zu beiden Seiten aufgespreizt werden.
Nach Entfernung des Thymus und Darstellung der Lungengefäße wurde eine Ligatur um Aorta und A. pulmonalis gelegt. Nun folgte die Eröffnung der rechten Herzkammer und das Einbinden eines Katheters (Hugo-Sachs-Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) in die A. pulmonalis, wobei man unverzüglich mit der Perfusion der Elektrolytlösung begann. Durch die Fixierung des Katheters wurde gleichzeitig die Aorta abgebunden. Das Abtrennen der Herzspitze ermöglichte den Ablauf des pulmonalvenösen Perfusats und verhinderte eine Druckerhöhung im Lungenkreislauf.
Zur Explantation wurde die Lunge vorsichtig entlang der Wirbelsäule aus dem Thorax herausgelöst und in den Versuchsaufbau eingebracht. Nach dem Einbinden des venösen Katheters (Hugo-Sachs-Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) in das

linke Herz konnte das Perfusionssystem zu einem Kreislauf geschlossen werden. Die Lunge, frei an einer Wägezelle aufgehängt, umgab nun eine auf 37^{o} Celsius equilibrierte Klimakammer. Jetzt wurden die Druckabnehmer zur kontinuierlichen Messwerterfassung angeschlossen. Die Versuchsaufzeichnung begann mit einer 30-minütigen „steady state“ Phase unter rezirkulierender Perfusion.

Lungen, die in die Studie aufgenommen wurden, hatten nach der Präparation eine einheitlich weiße Oberfläche ohne Zeichen von Hämostase oder Ödemen, einen im Normbereich liegenden pulmonalarteriellen- (5-7 mmHg) und Beatmungsdruck (4-5 mmHg) sowie ein gleichbleibendes Gewicht über einen Beobachtungszeitraum von 30 Minuten im „steady state“.

2.2.1.2 Das Ventilationssystem

Während des Versuchsablaufs wurde die Lunge mit 4% CO_2, 17% O_2 und 79% N_2 über eine spezielle Beatmungspumpe (Small Animal Ventilator KTR-4, Hugo-Sachs-Elektronik) mit einer Frequenz von 65/min und einem Atemzugvolumen 4 ml beatmet. Der positive endexpiratorische Druck betrug 3 cm Wassersäule. Vor Versuchsbeginn wurde die Lunge zweimal für jeweils zwei Atemzüge gebläht, um eventuell vorhandene atelektatische Bereiche zu eröffnen. Während des Versuchs wurde die Lunge manuell einmal alle 30 Minuten gebläht.
Die Beatmungsschläuche wurden vor jedem Versuch sterilisiert.

2.2.1.3 Das Perfusionssystem

Eine Masterflex-Schlauchpumpe (Cole-Parmer, Chicago, USA) mit Easy-Load Pumpenkopf (Model 7518-10, Cole-Parmer, Chicago, USA) ermöglichte eine pulsatile Perfusion. Die Pufferlösung enthielt 2,4 mM $CaCl_2$, 1,3 mM $MgCl_2$, 4,3 mM KCl, 1,1 mM KH_2PO_4, 125,0 mM NaCl, 25,0 mM $NaHCO_3$ und 13,32 mM Glukose.

Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug 13 ml/min. Als Perfusat-Reservoir dienten zwei 150 ml Doppelwandgefäße, die über eine Frigomix-Thermomix-Einheit (Braun, Melsungen, Deutschland) temperiert werden konnten und einen Perfusatwechsel ohne Perfusionsunterbrechung gewährleisteten.

Die zirkulierende Perfusatmenge im System betrug 100 ml. Um Luftembolien zu vermeiden mußte das Perfusat vor der Lunge eine Blasenfalle passieren. Der Zufluss erfolgte über den in die Pulmonalarterie eingebrachten Katheter. Nach Passage der Lungenstrombahn konnte das Perfusat über den im linken Ventrikel fixierten Katheter venös in die Vorratsbehälter abfließen (Abb. 4). Somit bestand ein geschlossenes und zur Rezirkulation befähigtes Zirkulationssystem. Die Möglichkeit zur Entnahme von Proben oder zur Bestimmung des pH-Wertes befand sich am ableitenden venösen Schenkel.

Während der Präparation betrug die Perfusattemperatur 4^{o} Celsius bei einem Perfusatfluss von 4 ml/min. Nach abgeschlossener Explantation der Lunge bis zum Versuchsbeginn wurde die Perfusattemperatur auf 37^{o} Celsius und der Perfusatfluss vorsichtig auf 13 ml/min erhöht. Über CO_2-Insufflation zur Beatmungsluft konnte der pH-Wert des Perfusats reguliert, und konstant zwischen 7,35 und 7,40 eingestellt werden. Die Perfusionsschläuche und die Vorratsbehälter wurden vor jedem Versuch sterilisiert.

Die folgende Abbildung zeigt schematisch den Aufbau des Ventilations- und Perfusionssystem für die isolierte Rattenlunge:

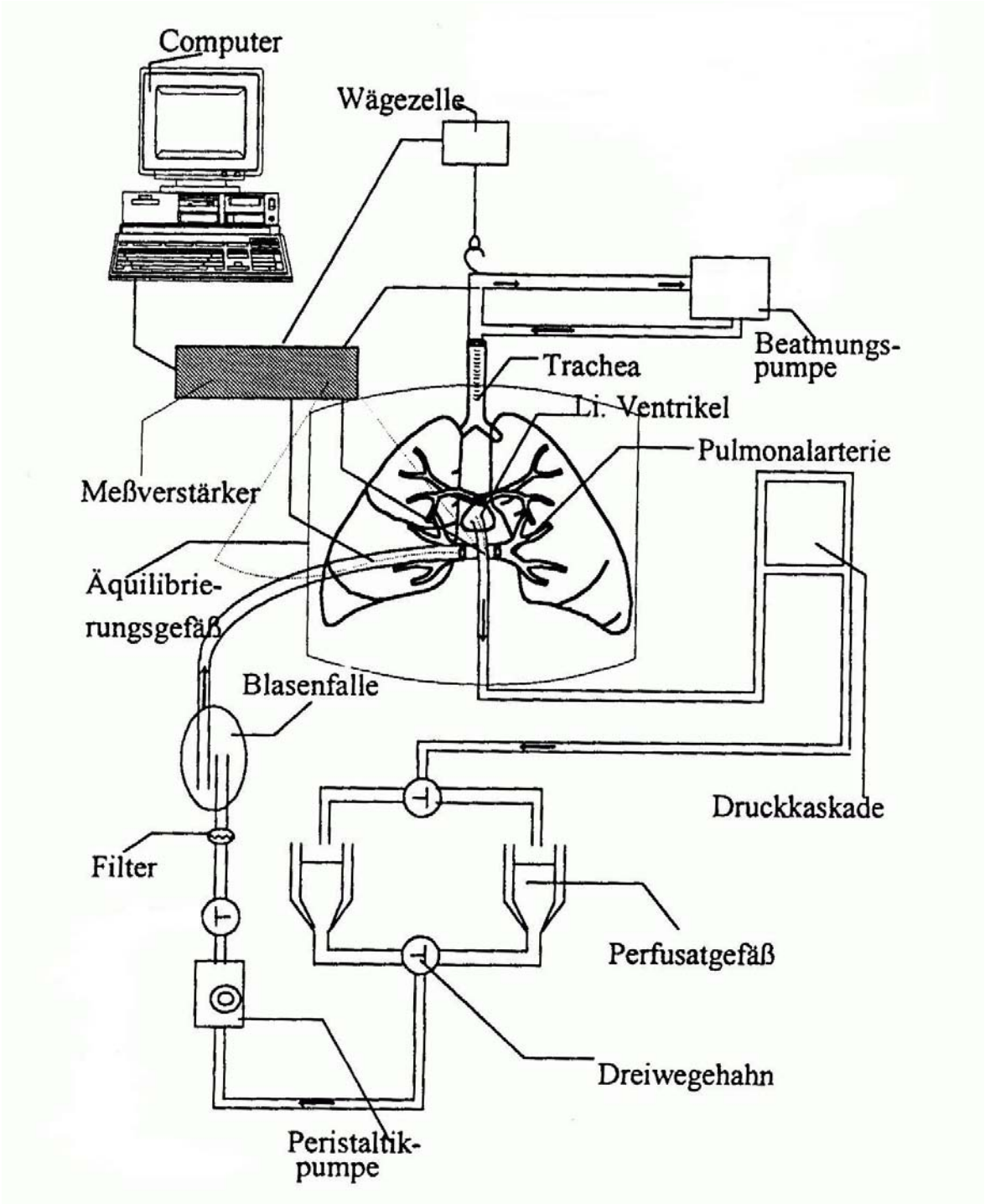


Abb. 4. Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.

2.2.2 Messparameter und Messwertregistrierung

Das isolierte Lungenpräparat wurde über eine elektronische Wägezelle U1-G (Holtinger Baldwin-Messtechnik, Darmstadt, Deutschland) frei aufgehängt, wodurch das Lungengewicht (W), als Indikator einer Ödementwicklung, permanent gemessen und aufgezeichnet werden konnte. Eine Eichung der Wägezelle erfolgte vor jedem Versuch mit geeichten Gewichten.
Als Messparameter zur Auswertung der pulmonalvaskulären Hämodynamik wurden der pulmonalarterielle Druck (PAP) sowie der pulmonalvenöse linksventrikuläre Druck (LVP) registriert. Zur Beurteilung der bronchialen Reaktion diente die Messung des Beatmungsdrucks (VP). Die kontinuierliche Aufnahme dieser Parameter ermöglichten im Schlauchsystem liegende Innenkatheter, die in einem definierten Abstand vor den Messpunkten plaziert wurden (Trachea, Pulmonalarterie, linker Vorhof) und an Druckaufnehmer angeschlossen waren. Der Nullpunkt der Druckaufnehmer für pulmonalarteriellen und linksventrikulären Druck war auf den Bezugspunkt in Lungenhilushöhe eingestellt. Der linksventrikuläre Druck wurde zu Versuchsbeginn durch Anheben des venösen Schenkels auf 1,5 mmHg eingestellt.
Die Druckaufnehmer (Combitrans Monitoring Set Med. II for arterial blood pressure measurement, Braun, Melsungen, Deutschland) wurden zusammen mit der elektronischen Wägezelle zur Online-Registrierung der Messparameter über einen Verstärker an einen Computer (AT Computer 486, 66 Mhz) angeschlossen.

2.2.2.1 Kapillärer Filtrationskoeffizient

Der kapilläre Filtrationskoeffizient (Kfc) ist das Produkt aus Wasserdurchlässigkeit und Filtrationsoberfläche eines kapillären Gefäßbetts und kann zur Beurteilung der mikrovaskulären Permeabilität des Gefäßendothels herangezogen werden. Er wird aus der Kurve der Gewichtszunahme eines isolierten Organs bestimmt, während das Gefäßbett einer plötzlichen hydrostatischen Druckerhöhung ausgesetzt ist. Die zu beobachtende initiale sprunghafte Gewichtszunahme der Lunge ist Ausdruck der

druckbedingten Füllung des Gefäßbetts und charakterisiert seine Compliance, während der anschließende kontinuierlich ansteigende Gewichtskurvenverlauf von der wiederum druckbedingten Steigerung der mikrovaskulären Filtration abhängig ist (Abb. 5). Zur Bestimmung des kapillären Filtrationskoeffizienten bildete eine 10-minütige hydrostatische Druckerhöhung (venous pressure elevation, VPE) von 7,5 mmHg auf den pulmonalvenösen Schenkel der Lungenstrombahn die Grundlage. Diese definierte Druckbelastung wurde dadurch erreicht, dass der venöse Abfluß des Perfusats wahlweise über jeweils eines von zwei Schlauchsystemen erfolgte, die in verschiedenen, bezüglich des Lungenhilus jeweils definierten Höhen fixiert waren. Die VPE wurde gemäß dem Versuchsprotokoll zu festgelegten Zeitpunkten durchgeführt (Abb. 5). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Bestimmung des Kfc über den Gewichtsanstieg im Verhältnis zur akuten Veränderung des hydrostatischen Kapillardrucks ist von verschiedenen Autoren beschrieben worden und stellt ein zuverlässiges Verfahren dar (98, 99).

Die Berechnung des Kfc erfolgte zunächst durch die Auswertung der graphischen Darstellung des Gewichtskurvenverlaufs. Der Gewichtsanstieg während der beiden ersten Minuten des hydrostatischen Druckmanövers wurde der Gefäßbettdilatation zugerechnet. In der anschließenden 8-minütigen Phase der Flüssigkeitseinlagerung (Gewichtszunahme) wurde die Steigung des Gewichtskurvenverlaufs zu den Zeitpunkten 3, 4, 5, 6, 7 und 8 Minuten durch das Anlegen einer Tangente ermittelt und zur Berechnung des Kfc herangezogen (100, 101). Bezogen auf das Feuchtgewicht der Rattenlunge erhält der Kfc folgende Dimension:

$$\frac{cm^3}{s \times mmHg \times g\ (Feuchtgewicht) \times 10^{-4}}$$

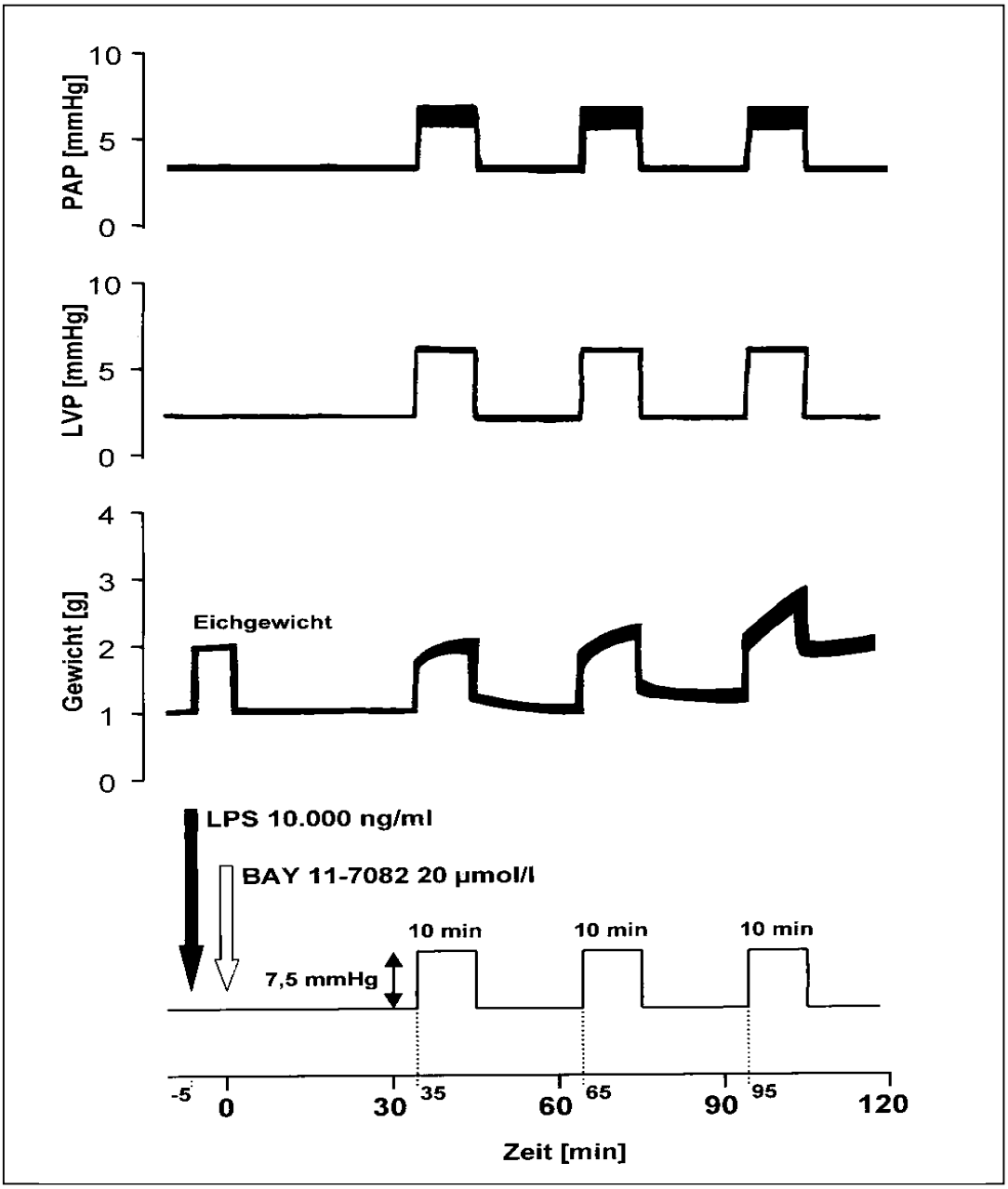


Abb. 5. Exemplarische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der VPE und die Reaktionen der verschiedenen Messparameter nach LPS-Stimulation und Zusatz des NF-κB-Inhibitors BAY 11-7082.

Schematische Darstellung des Verhaltens der Parameter pulmonalarterieller Druck (PAP), pulmonalvenöser Druck (LVP) und Lungengewicht während VPE. Zum Zeitpunkt 35, 65 und 95 Minuten wurden 10-minütige hydrostatische Druckerhöhungen um 7,5 mmHg durchgeführt. Der Gewichtskurvenverlauf während der VPE wurde zur Berechnung des kapillären Filtrationskoeffizienten (Kfc) herangezogen.

2.2.2.2 Bestimmung des Kapillardrucks durch Doppelokklusion

Mit Hilfe der arteriellen und venösen Doppelokklusionstechnik (Double Clamping) wurde der mikrovaskuläre Druck in den Kapillaren der pulmonalen Strombahn bestimmt (102, 103). Dafür waren zwei digital anzusteuernde elektrische Klemmen (Georg Fischer Anderson GmbH, Dortmund, Deutschland) am Perfusionsschlauchsystem kurz vor der A. pulmonalis und hinter den Venae pulmonales der Lunge angebracht. Die synchrone Okklusion dieser Quetschventile blockierte sowohl den pulmonalarteriellen als auch den linksventrikulären Katheter simultan für eine Zeitspanne von 10 s. Um die Perfusion des Gesamtsystems nicht unterbrechen zu müssen, wurde das Perfusat während der Okklusion über einen vorher geschlossenen Bypass an der Lunge vorbeigeleitet. Während des Manövers wurden der arterielle und der venöse Druck kontinuierlich registriert und aufgezeichnet. Der initial zu beobachtende schnelle arterielle Druckabfall entspricht der raschen Umverteilung des arteriellen Perfusatvolumens aus wenig elastischen Arterien mit niedriger Compliance in leichter dehnbare kleine Arterien und in das Kapillarbett mit seiner großen Compliance. Der anschließende annähernd horizontale Druckverlauf entspricht dem Druckausgleich in den kapazitiven Gefäßen des Kapillarbetts bis zum Druckausgleich in allen Kompartimenten.
Die zu Beginn der Doppelokklusion schnelle venöse Druckzunahme resultiert aus einem initialen volumenbedingten Druckanstieg in den großen venösen Kapazitätsgefäßen mit niedriger Compliance. Daran anschließend beobachtet man die langsame Phase des venösen Druckanstiegs bis zum arteriovenösen Druckausgleichsplateau, welches als der Druck des Kapillarbetts der Lunge (Pc) zu interpretieren ist. Die schnelle initiale Phase der Druckveränderungen kann nur bei einer sehr hohen Aufzeichnungsfrequenz analysiert werden, wie sie in der vorliegenden Arbeit nicht gewählt wurde, da bei der Doppelokklusion das erreichte Druckplateau mit geringerer Aufzeichnungsrate eindeutig bestimmbar war.

2.3 Versuchsablauf und Versuchsprotokoll

Insgesamt wurden 95 Versuche mit isoliert perfundierten Lungen, eingeschlossen der Kontrollversuche, durchgeführt. Vor jedem Versuch durchlief die Lunge eine 30-minütige „steady state“ Phase. Die eigentliche Versuchszeit begann danach zum Zeitpunkt 0 min für die Dauer von 130 Minuten, in der die Lunge isoliert ventiliert und perfundiert wurde.

In den Kontrollversuchen wurden die Lungen unter standardisierten Bedingungen für 120 Minuten perfundiert, ohne dass dem Perfusat Substanzen hinzugefügt wurden (n=5).

Sowohl die Versuchs- als auch die Kontrollgruppen wurden durch Primingversuche ergänzt, die eine zusätzliche LPS-Gabe in einer Konzentration von 10.000 ng/ml zum Zeitpunkt 0 min, also nach der „steady state“ Phase, verlangten (Abb. 6).

In allen Versuchs- und Kontrollgruppen wurde nach einem Perfusionszeitraum von zwei Stunden (Zeitpunkt 120 min) freie AA in das Perfusat in einer Konzentration von 10 µM dazugegeben (Abb. 6). Eine Versuchsreihe bestand aus jeweils 5 Versuchen (n=5).

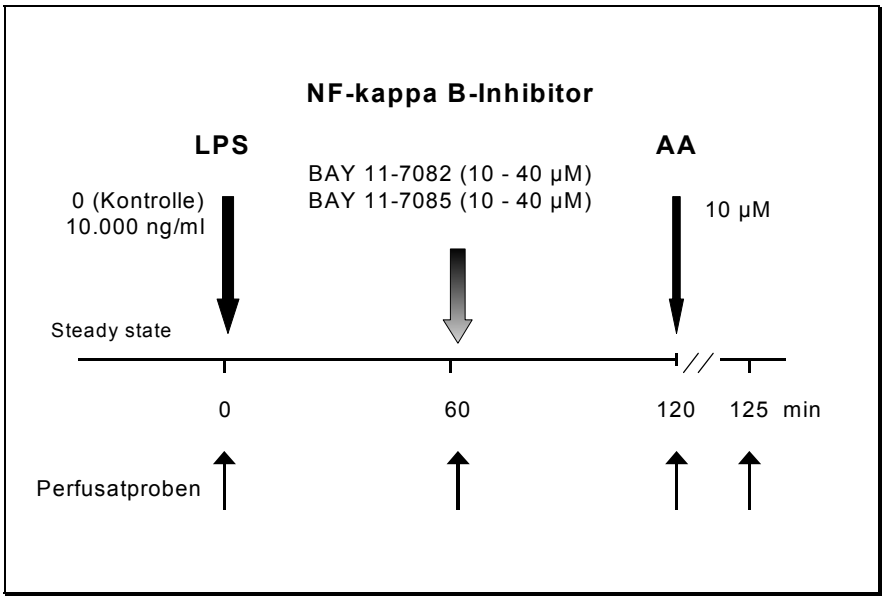


Abb. 6. Schematische Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs.
Berücksichtigt sind die Zeitpunkte der Substanzgaben (LPS, Inhibitoren und AA) und die Entnahmezeiten der Perfusatproben.

2.3.1 NF-κB-Inhibitoren

Die mit den Inhibitoren durchgeführten Experimente teilten sich in zwei große Versuchsgruppen, die entweder mit oder ohne Gabe von 10.000 ng/ml LPS zum Zeitpunkt 0 min begannen (Abb. 6). Innerhalb dieser beiden Gruppen wurden die Inhibitoren BAY 11-7082 und BAY 11-7085 in den Konzentrationen 10, 20 und 40 µM zum Zeitpunkt 60 min in das Perfusat zugegeben (n=5 für jede Konzentration der beiden Inhibitoren in jeder Gruppe). Die Versuchsreihen endeten 10 Minuten nach der Gabe von 10 µM AA nach 2 Stunden Perfusionszeit.

2.3.2 VPE und Clamping

Zusätzliche Experimente wurden mit Hilfe der bereits erwähnten VPE-Technik durchgeführt, für die der Druck auf den venösen Schenkel alle 30 Minuten um 7,5 mmHg für einen Zeitraum von 10 Minuten erhöht wurde. Der NF-κB-Inhibitor BAY 11-7082 wurde zu Beginn des Versuchablaufs zum Zeitpunkt 0 min in einer Konzentration von 20 µM verabreicht. Die Lungen wurden entweder mit oder ohne LPS in der Konzentration 10.000 ng/ml 5 Minuten vor Inhibitorgabe perfundiert, so dass inklusive der Kontrollen vier Gruppen mit jeweils n=5 entstanden (Abb.5). In diesen Versuchsreihen betrug die Perfusionsdauer zwei Stunden, in denen drei hydrostatische Druckerhöhungen alle dreißig Minuten nach Protokoll durchgeführt werden konnten (Abb.5).
Die Messung des pulmonalen Kapillardrucks (pulmonary capillary pressure, Pc) erfolgte zu festgelegten Zeitpunkten in 30-minütigen Abständen vor und nach Gabe des NF-κB-Inhibitors und in zusätzlichen Versuchsreihen während der VPE-Manöver. Die Aufzeichnung des Lungengewichts diente der späteren Berechnung der Flüssigkeitseinlagerung in das Lungengewebe im Zeitraum der VPE (ΔW während VPE berechnete sich aus der Differenz des Organgewichts vor der VPE und dem am Ende der 10-minütigen VPE).

2.3.3 Perfusatanalysen

Proben für Perfusatanalysen wurden zu Beginn der zweistündigen Perfusionsdauer (0 min), nach 1 h Perfusion (60 min), nach 2 h vor Gabe von AA (120 min), sowie 2 und 5 min nach AA-Gabe (122 min, 125 min) dem System am venösen Schenkel entnommen (Abb. 6).
Mit Hilfe des ELISA-Verfahrens konnten die verschiedenen Metabolite des Zyklooxygenase-abhängigen Arachidonsäurestoffwechsels nachgewiesen werden.

2.4 ELISA-Messungen

Die ELISA Kits zur Bestimmung der Konzentration von Thromboxan (TxA_2) in den Perfusatproben wurden bezogen von Cayman Chemical Company (Ann Arbor, Michigan, USA). Alle übrigen ELISA-Kits zur Messung der Konzentrationen von Prostazyklin (PGI_2), Prostaglandin F_{2alpha} (PGF_{2alpha}) und Prostaglandin E_2 (PGE_2) wurden von R&D Systems GmbH (Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) hergestellt.
Die TxA_2- und die PGI_2-Bestimmung erfolgte indirekt durch die Messung der stabilen Abbauprodukte TxB_2 bzw. 6-keto Prostaglandin F_{1alpha} (6-keto PGF_{1alpha}). Zusätzlich wurden PGE_2 und PGF_{2alpha} direkt bestimmt.

2.5 Statistik

Zu statistischen Analysen wurden die Varianzanalyse ANOVA (Analysis of variance) der Student´s T-Test für unpaare Stichproben und der Newman-Keuls-Test herangezogen. Verglichen wurden jeweils die Werte in den einzelnen Gruppen sowie die verschiedenen Gruppen gegeneinander. Werte mit $p<0,05$ wurden dabei als signifikant betrachtet.
Sämtliche Daten sind als Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Versuchsgruppen ohne Inhibitorzugabe

In den Kontrollversuchen (ohne Zusatz von LPS) konnte weder eine signifikante Gewichtszunahme (ΔW) noch eine Veränderung des pulmonalarteriellen Drucks (PAP) oder des Ventilationsdrucks (VP) über den gesamten Beobachtungszeitraum von zwei Stunden registriert werden.
Ohne vorherige LPS-Stimulation provozierte die Gabe von 10 µM freier AA 120 Minuten nach Versuchsbeginn einen schnellen Anstieg des PAP um 3-4 mmHg. Gleichzeitig konnte eine Gewichtszunahme des Organs von ca. 0,5 g notiert werden. Der VP zeigte keinen signifikanten Anstieg (Tab. 1, Tab. 2, Abb.1 A-C).

Nach der Applikation von 10.000 ng/ml LPS zu Versuchsbeginn zeigten PAP, VP und Lungengewicht über einen zweistündigen Perfusionszeitraum keine signifikanten Veränderungen. Die Reaktion der mit LPS stimulierten Lungen auf AA-Gabe nach 120 Minuten war deutlich gesteigert. Die pulmonalarterielle Druckreaktion war mit 9-10 mmHg auf das Doppelte des Wertes der Kontrollversuche erhöht. Gleichzeitig führte die AA-Gabe in den mit LPS stimulierten Lungen zu einem Anstieg des Ventilationsdrucks um ca. 2 mmHg und zu einer Gewichtszunahme von 4-5 g (Tab. 1, Tab. 2, Abb. 1 A-C).

3.2 Reaktion der Lunge nach NF-κB-Hemmung

Die Applikation der beiden NF-κB-Inhibitoren (BAY 11-7082, BAY 11-7085) erfolgte 60 Minuten nach Versuchsbeginn in unterschiedlichen Konzentrationen von 10, 20 und 40 µM. Der Zusatz eines NF-κB-Inhibitors hatte in den Konzentrationen 10 und 20 µM, im Vergleich zu den Kontrollen, mit Werten zwischen 3,2 und 4,7 mmHg

keine signifikanten Auswirkungen auf die pulmonalarterielle Druckreaktion nach AA-Gabe. Lediglich der Inhibitor BAY 11-7082 vermochte in einer Konzentration von 40 µM den PAP signifikant unter 1,0 mmHg zu vermindern (Tab.1, Abb. 2).
In den mit LPS stimulierten Lungen verminderten die ansteigenden Konzentrationen der Inhibitoren jeweils dosisabhängig den AA-abhängigen PAP-Anstieg von 9-10 mmHg in den Lungen ohne Inhibitorzusatz auf ca. 6 mmHg (20 µM Inhibitor) bzw. bis auf 1,3 mmHg (40 µM BAY 11-7082) (Tab. 2, Abb. 2).

Die unterschiedlichen Konzentrationen der beiden selektiven NF-κB-Inhibitoren hatten in den mit LPS stimulieten Lungen keine Auswirkung auf den Ventilationsdruck (VP), der genau wie in Lungen ohne Inhibitorzugabe, nach AA-Gabe um etwa 2,0 mmHg anstieg (Tab. 1, Abb. 3).

Im Perfusionszeitraum 60-120 Minuten, also zwischen dem Inhibitorenzusatz und der AA-Gabe, zeigten Lungen der Versuchsgruppen ohne LPS-Stimulation mit steigender Inhibitorkonzentration einen spontanen signifikanten Gewichtsanstieg (ΔW) von 0,3 g (10 µM BAY 11-7082) bis zu 1,5 g (40 µM BAY 11-7082), während bei den Kontrollversuchen kein Gewichtszuwachs registriert werden konnte (Tab. 2, Abb. 4).
In den mit LPS stimulierten Lungen fiel der Gewichtszuwachs in diesem Zeitraum dosisabhängig noch deutlicher aus. Nach Zusatz des Inhibitors BAY 11-7085 in Konzentrationen von 20 oder 40 µM in das Perfusat war innerhalb der folgenden Stunde ein Gewichtsanstieg von ca. 1,1 g zu beobachten. LPS-Stimulation und 40 µM des selektiven NF-κB-Inhibitors BAY 11-7082 führten zu Gewichtseinlagerungen von 3,5 g bis zur AA-Gabe (Abb. 4, Tab. 2).

Die Gabe von 10 µM AA zum Zeitpunkt 120 Minuten ergab bei den Kontrollen einen Gewichtszuwachs von ca. 0,5 g. Der Zusatz von 10 µM Inhibitor bewirkte einen vierfachen Gewichtsanstieg auf Mittelwerte zwischen 1,8 (BAY 11-7082) und 2,1 g

(BAY 11-7085). Eine Konzentration von 40 µM des Inhibitors BAY 11-7085 bewirkte eine Gewichtszunahme von etwa 6 g (Tab. 2, Abb. 5).
Noch deutlicher zeigte sich der dosisabhängige Gewichtszuwachs nach LPS-Stimulation. Bereits ab einer Konzentration von 20 µM konnte ΔW in den Versuchsgruppen beider selektiver NF-κB-Inhibitoren kaum noch sicher bewertet werden, da sich ein fulminantes Lungenödem mit einer intolerablen Gewichtszunahme von über 10 g entwickelte (Tab. 2, Abb. 5).

3.3 Metabolite des AA-Stoffwechsels im Perfusat

3.3.1 Versuchsgruppen ohne Inhibitorzusatz

Im Perfusat der Kontrollversuche waren keine Konzentrationsänderungen der Arachidonsäuremetabolite PGF_{2alpha}, TxB_2 und 6-keto PGF_{1alpha} während einer Perfusionsdauer von 120 Minuten zu beobachten (Abb. 6). Die Perfusatspiegel der Metabolite $PGF_{2\alpha}$ und TxB_2 blieben deutlich unter 100 pg/ml. PGE_2 konnte im Perfusat nicht nachgewiesen werden, die Konzentration von 6-keto PGF_{1alpha} war mit Mittelwerten zwischen 1500 und 1800 ng/ml im Vergleich zu den anderen Metaboliten vermehrt und ebenso konstant nachweisbar. Die mit LPS stimulierten Lungen zeigten bereits in den ersten 120 Perfusionsminuten einen Konzentrationsanstieg sämtlicher gemessener Metabolite (Abb. 6). Die Konzentrationen von TxB_2 und PGF_{2alpha} stiegen in diesem Zeitraum auf Mittelwerte zwischen 240 und 280 pg/ml an. PGE_2 erreichte einen Mittelwert von 91 pg/ml, die Ausschüttung von 6-keto PGF_{1alpha} war bis zu einem Mittelwert von 6750 pg/ml gesteigert.

Nach der Applikation von 10 µM AA zum Versuchsende kam es in den Kontrollgruppen innerhalb der nächsten 5 Minuten zu einer deutlichen Zunahme der Konzentration aller Metabolite im Perfusat (Abb. 6). Die Mittelwerte der Metabolite

TxB_2, PGE_2 und PGF_{2alpha} stiegen auf 1500 bis 3600 pg/ml, 6-keto PGF_{1alpha} erreichte einen Mittelwert von 38684 pg/ml. Bei den mit LPS stimulierten Lungen ließen sich signifikant höhere Konzentrationen der Metabolite TxB_2, PGE_2 und PGF_{2alpha} mit Werten zwischen 3850 und 6000 pg/ml messen. Nur 6-keto PGF_{1alpha} zeigte mit einem Mittelwert von ca. 40000 pg/ml im Vergleich zu den Kontrollen kein signifikantes zusätzliches Ansteigen der Konzentration (Abb. 6).

3.3.2 Inhibitorgruppen

3.3.2.1 TxB_2 im Perfusat

Die Konzentration von TxB_2 im Perfusat der Kontrollversuche 5 Minuten nach AA-Gabe betrug im Mittelwert 3175 pg/ml. Die Applikation des selektiven NF-κB-Inhibitors BAY 11-7085 eine Stunde vor Versuchsende bewirkte keine signifikanten Veränderungen bei der Prostanoidausschüttung (Abb. 7). Die Mittelwerte der Metabolitkonzentration nach Zugabe des Inhibitors BAY 11-7085 in den Konzentrationen 10, 20 und 40 µM lagen zwischen 3754 und 4427 pg/ml.
Die Stimulation mit 10.000 ng/ml LPS bewirkte ohne Zugabe eines NF-κB-Inhibitors im Vergleich zu den Kontrollen eine Erhöhung der TxB_2-Konzentration auf 5094 ng/ml nach AA-Gabe. Die Zugabe von 10, 20 und 40 µM BAY 11-7082 ergab Metabolitkonzentrationen zwischen 4265 und 5911 pg/ml (Abb. 7). Diese Werte zeigten keine signifikante Veränderung im Vergleich zu den mit LPS stimulierten Versuchsgruppen ohne Inhibitorzusatz.

3.3.2.2 PGE_2 im Perfusat

Die Messung der PGE_2-Konzentration im Perfusat der Kontrollgruppen nach AA-Gabe ergab einen Mittelwert von 1498 pg/ml. Unter dem Zusatz des Inhibitors BAY 11-7085 in den Konzentrationen 10, 20 und 40 µM waren keine signifikanten

Veränderungen des PGE_2-Konzentrationsspiegels zu beobachten. Die PGE_2-Konzentration im Perfusat lage zwischen 1260 pg/ml (10 µM BAY 11-7085) und 2139 pg/ml unter Hemmung des Transkriptionsfaktors mit 40 µM Inhibitor (Abb. 8).
Die Beifügung von 10.000 ng/ml LPS in das Perfusat zu Versuchsbeginn bewirkte eine Metabolitausschüttung mit Werten um 3858 pg/ml nach AA-Gabe. Die Applikation des NF-κB-Inhibitors BAY 11-7085 in steigender Konzentration bis 40 µM führte zu keiner Veränderung der erhöhten Metabolitkonzentration, die in allen Gruppen nach LPS-Stimulation zwischen 3055 und 4089 pg/ml lag (Abb. 8).

3.3.2.3 6-keto PGF_{1alpha} im Perfusat

Die Messungen bei den Kontrollgruppen ohne LPS ergaben nach AA-Applikation einen Mittelwert der 6-keto PGF_{1alpha}-Konzentration von 38684 pg/ml. Nach Zugabe von LPS zu Versuchsbeginn konnte nach AA-Gabe ein Mittelwert von 40639 pg/ml gemessen werden. Wurden den Lungen die beiden Inhibitoren BAY 11-7082 und BAY 11-7085 eine Stunde vor Versuchsende zugeführt, fiel die Perfusatkonzentration von 6-keto PGF_{1alpha} nach AA-Gabe signifikant höher aus (Abb. 9). In den Versuchsgruppen mit und ohne LPS-Stimulation war eine dosisabhängige Konzentrationszunahme von 6-keto-PGF_{1alpha} zu beobachten. In diesen Gruppen erreichte die Prostanoidkonzentration nach AA-Gabe einen Mittelwert um 92000 pg/ml nach Zugabe eines NF-κB-Inhibitors in einer Konzentration von 40 µM.

3.3.2.4 PGF_{2alpha} im Perfusat

Die Messungen der PGF_{2alpha}-Konzentration im Perfusat der Kontrollversuche nach Gabe von 10 µM AA zum Versuchsende ergaben einen Mittelwert von 2059 pg/ml. In den Gruppen mit Inhibitorzusatz konnte keine Veränderung der Prostanoidkonzentration nach AA-Gabe gemessen werden. Die Mittelwerte bewegten sich nach Gabe ansteigender Inhibitorkonzentrationen von 10 µM bis 40 µM zwischen 1526 ng/ml und 2535 pg/ml (Abb. 10).

In den Lungen, die mit 10.000 ng/ml LPS stimuliert wurden, war die Prostanoidkonzentration nach AA-Gabe mit einem Mittelwert von 7588 pg/ml deutlich höher als in den Kontrollen (Abb. 10).
Die Zugabe von 10 µM Inbibitor BAY 11-7085 verminderte die Ausschüttung von PGF_{2alpha} auf Werte um 3340 pg/ml. Steigende Inhibitorkonzentrationen bis 40 µM ergaben in den mit LPS stimulierten Lungen eine gleichbleibende PGF_{2alpha}-Ausschüttung mit Werten zwischen 3948 und 4119 pg/ml.

3.4 Kapillärer Druck (Pc) und Gewichtsveränderung (∆W) während hydrostatischer Druckerhöhung (VPE)

Die Messungen der kapillären Drücke erfolgte in 30-minütigen Abständen über einen Beobachtungszeitraum von zwei Stunden. In der Versuchsreihe mit LPS-Stimulation ohne den Zusatz eines Inhibitors lag der Mittelwert der kapillären Drücke im gesamten Versuchszeitraum über zwei Stunden zwischen 1,76 und 2,2 mmHg. Die Zugabe des Inhibitors BAY 11-7082 in den Konzentrationen 20 und 40 µM hatte keine Auswirkung auf den Pc, der sich bis zum Versuchsende in beiden Gruppen zwischen 1,82 und 2,25 mmHg bewegte (Abb. 11).
Die Messung des kapillären Druckes (Pc) mittels Doppelokklusionstechnik während der ersten und der zweiten VPE ergab bei den Kontrollversuchen Mittelwerte um 4,7 mmHg. Die kapillären Drücke nach Stimulation mit 10.000 ng/ml LPS lagen um 4.6 mmHg (Tab. 3, Abb. 12).
Der Zusatz des NF-κB-Inhibitors BAY 11-7082 in einer Konzentration von 20 µM zum Versuchsbeginn ergab während den beiden hydrostatischen Druckerhöhungen Mittelwerte des kapillären Drucks zwischen 3,8 und 4,3 mmHg. Nach LPS-Stimulation und Inhibitorgabe blieben die Messungen des Pc mit Werten um 4,2 mmHg innerhalb beider VPE-Manöver konstant (Tab. 3, Abb. 12).
Während der beiden venösen Druckerhöhungen wurde in den Kontrollen ohne Substanzgabe eine moderate Gewichtszunahme von jeweils etwa einem Gramm

gemessen (Abb.13). Priming mit 10.000 ng/ml LPS zu Versuchsbeginn ergab ein analoges Ergebnis (Abb. 13).
Lungen, die vor der ersten VPE mit einem NF-κB-Inhibitor in der Konzentration von 20 µM perfundiert wurden, zeigten einen signifikanten Anstieg des Lungengewichts. Während der ersten VPE lagerten die Lungen etwa 2,7 g, und während der zweiten durchgeführten VPE etwa 6,8 g an Gewicht ein (Abb. 13). Die Gewichtszunahmen waren nach vorheriger LPS-Stimulation mit Mittelwerten von 2,9 bzw. 7,3 g während der beiden venösen Druckerhöhungen geringfügig stärker. Bei allen Versuchsgruppen, die mit dem Inhibitor BAY 11-7082 in einer Konzentration von 20 µM versetzt wurden, lagerte die Lunge während der zweiten VPE so stark Perfusat im Sinne eines fulminanten Lungenödems ein, dass eine Weiterführung der Versuche dieser Versuchsreihe unmöglich wurde.

3.5 Kapillärer Filtrationskoeffizient (Kfc)

In den Gruppen, die keinen Kontakt zu einem NF-κB-Inhibitor hatten, blieben die Kfc-Werte bei allen venösen Druckerhöhungen konstant (Abb. 14). Die Mittelwerte bewegten sich von der ersten VPE nach 35 Minuten bis zur dritten VPE nach 95 Minuten zwischen 0,53 und 0,70 $cm^3 / s \times mmHg \times g \times 10^{-4}$. Die Zugabe von 10.000 ng/ml LPS zum Versuchsbeginn vor der ersten VPE bewirkte keine Veränderung der Kfc-Werte (Abb. 14). Analog zu den unstimulierten Kontrollen ergaben Kfc-Messungen von der ersten bis zur dritten VPE konstante Mittelwerte zwischen 0,39 und 0,77 $cm^3 / s \times mmHg \times g \times 10^{-4}$ (Abb. 14).

In den Versuchsgruppen, die mit dem Inhibitor BAY 11-7082 in einer Konzentration von 20 µM zu Versuchsbeginn versetzt wurden, waren in der ersten VPE Kfc-Werte um 1,19 $cm^3 / s \times mmHg \times g \times 10^{-4}$ zu messen (Abb. 14, Abb. 15). Zusätzliche Gabe von LPS führten mit einem Mittelwert von 1,12 $cm^3 / s \times mmHg \times g \times 10^{-4}$ zu ähnlich hohen Werten.

Die Gewichtskurvenverläufe während der zweiten VPE bei allen Versuchsgruppen mit Inhibitorzusatz ließen keine weiteren Kfc-Messungen zu. Der Gewichtszuwachs von über 10 g in den ersten Minuten der venösen Druckbelastung ließ die Lungen das Abbruchkriterium erfüllen.

4 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Beteiligung des Transkriptionsfaktors Nuklear faktor-kappa B (NF-κB) an der Zyklooxygenase-2/Thromboxan-vermittelten Reaktion der Lunge auf LPS-induziertes Priming untersucht.
Dafür wurden experimentelle Untersuchungen am Modell der isolierten Rattenlunge vorgenommen, die, für zwei Stunden blutfrei perfundiert und beatmet, verschiedenen Konzentrationen zweier selektiver NF-κB-Inhibitoren ausgesetzt wurde. Die Versuche wurden mit und ohne Zugabe von 10.000 ng/ml LPS in das Perfusat durchgeführt und endeten kurz nach der Gabe von 10 µM AA nach zweistündiger Laufzeit.
Über den gesamten Versuchsablauf erfolgte die kontinuierliche Messung und Aufzeichnung des pulmonalarteriellen Drucks (PAP), des Lungengewichts (W) und des Ventilationsdrucks (VP). Zu definierten Zeiten wurden dem Perfusat Proben entnommen und die Konzentrationen der Prostanoidmetabolite TxB_2 und 6-keto PGF_{1alpha} als stabile Abbauprodukte von TxA_2 und PGI_2, sowie PGE_2 und PGF_{2alpha} gemessen.
Zusätzliche Versuchsreihen dienten der Bestimmung des pulmonalkapillären Drucks (Pc) und des kapillären Filtrationskoeffizienten (Kfc) zur Beurteilung der mikrovaskulären Permeabilität.

Bei den durchgeführten Kontrollversuchen ohne Inhibitorzusatz war über den Beobachtungszeitraum von zwei Stunden keine Veränderung der gemessenen Parameter zu erkennen. Die Applikation von AA provozierte einen deutlichen pulmonalen Druckanstieg und eine geringe Gewichtszunahme, während keine signifikante Ventilationsdrucksteigerung notiert werden konnte. Das durch AA-Gabe ausgelöste Ansteigen des pulmonalarteriellen Drucks und des Lungengewichts wurde bereits unter physiologischen Bedingungen an isoliert perfundierten Rattenlungen nachgewiesen (43).

Die alleinige Zugabe von 10.000 ng/ml LPS in das Perfusat der isolierten Lungen zu Versuchsbeginn zeigte ebenfalls keine Auswirkungen auf die gemessenen Druckparameter über den zweistündigen Versuchsverlauf. Allerdings provozierte die Gabe von AA nach Vorbehandlung der Lungen mit LPS eine deutlich gesteigerte pulmonalarterielle Druckreaktion, die im Vergleich zu den Kontrollversuchen etwa doppelt so hoch ausfiel. Gleichzeitig war ein signifikanter Anstieg des VP und eine Gewichtseinlagerung im Sinne eines Lungenödems zu registrieren. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Ergebnissen aus vorangehenden Studien an isolierten Kaninchenlungen (22, 39, 104). Vergleichbare Daten existieren auch für isolierte, LPS-stimulierte Rattenlungen, die nach Gabe eines zweiten Stimulus wie AA, sowohl verstärkte vaskuläre, als auch bronchiale Reaktionen, in Form einer deutlichen Erhöhung des pulmonalarteriellen- und des Ventilationsdrucks, sowie einer Steigerung des Lungengewichts, zeigten (41).

In der vorliegenden Arbeit konnte durch Einsatz der beiden selektiven NF-κB-Inhibitoren BAY 11-7082 und BAY 11-7085 der LPS-induzierte pulmonalarterielle Druckanstieg nach AA-Gabe dosisabhängig signifikant gehemmt werden.
Für die pulmonalarterielle Drucksteigerung nach AA-Gabe in den mit LPS stimulierten Lungen ist vornehmlich Thromboxan A_2, als Metabolit des Zyklooxygenase-abhängigen Arachidonsäuremetabolismus, verantwortlich (16, 43, 105). Die LPS-bedingte gesteigerte zelluläre Expression von Cox-2 und der Thromboxan-Synthase in der pulmonalen glatten Gefässmuskulatur hat nach Zusatz des Substrats AA eine gesteigerte Bildung von Thromboxan A_2 zur Folge, die ein akutes Ansteigen des pulmonalarteriellen Drucks bewirkt (36, 41, 42).
Bestätigt werden diese Zusammenhänge durch immunhistochemische Untersuchungen an der für die Regulation des Gefäßtonus verantwortlichen glatten Muskulatur pulmonalarterieller Widerstandsgefäße von Rattenlungen, in denen nach Stimulation mit LPS deutlich erhöhte Mengen Cox-2-mRNA und TxA_2-Synthase gefunden wurden (35, 36, 42). Auch Studien an Zellkulturen belegen eine vermehrte Cox-2-Expression nach LPS-Stimulation (30, 31). Dabei ist Cox-2 in der glatten Gefäßmuskulatur der pulmonalen Widerstandsgefäße die entscheidene Isoform, die

über eine funktionelle Koppelung mit der TxA_2-Synthase für die Regulation des pulmonalen Gefäßtonus verantwortlich ist (35, 42, 43).

Die Unterdrückung des pulmonalarteriellen Druckanstiegs in den mit LPS stimulierten Lungen durch die gezielte Hemmung von NF-κB ist ein Hinweis darauf, dass NF-κB eine wichtige regulatorische Funktion innerhalb der intrazellulären Abläufe zwischen der LPS-vermittelten Signaltransduktionskaskade und der daraus resultierenden Cox-2-Hochregulation einnimmt.

Die pathophysiologischen intrazellulären Mechanismen, die zwischen transmembranöser zellulärer LPS-Stimulation und der Bildung von proinflammatorischen Mediatoren wie der Cox-2 ablaufen, sind bis heute noch unzureichend erklärt. Nach Aktivierung der Zelle durch Bindung von LPS an den CD14-Rezeptor (44, 47) in Interaktion mit Toll-like-Rezeptoren, kann das Signal die Zellmembran passieren (51, 52). Verschiedene intrazelluläre Kaskaden wie die mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) (106, 107) garantieren eine Fortleitung des durch LPS vermittelten Signals durch das Zytoplasma und resultieren in einer Aktivierung kerngängiger Transkriptionsfaktoren, die über Genexpression die Bildung von Akute-Phase-Proteinen, immunologischen Zellen und Mediatoren an der Regulation inflammatorischer Prozesse beteiligt sind.

Die Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF-κB an der Transkription von proinflammatorischen Mediatoren wie Cox-2, iNOS und verschiedenen Zytokinen wie TNFα, IL-1 und IL-6 wurde bereits in einer Vielzahl von Studien an Zellkulturen und Geweben untersucht (57, 108, 109, 110).

NF-κB liegt im Zytoplasma unstimulierter Zellen durch Bindung an das IκB-Protein inaktiviert vor. Erst eine Phosphorylierung des IκB-Proteins durch den IκB-Kinasenkomplex (IKK) bedingt eine Abspaltung des Transkriptionsfaktors vom inhibierenden Protein und ermöglicht somit seine Aktivierung und die Translokation in den Zellkern. Die im Rahmen dieser Arbeit benutzten NF-κB-Inhibitoren BAY 11-7082 und BAY 11-7085 hemmen jeweils selektiv die den Transkriptionsfaktor aktivierende Phosphorylierung des IκB-Proteins (68, 98).

Die Tatsache, dass es durch die gezielte NF-κB-Hemmung zu einem signifikant verminderten Ansteigen des PAP nach AA-Gabe kam, spricht dafür, dass der aktivierte Transkriptionsfaktor über die Regulation intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden an der durch LPS induzierten, Cox-2-abhängigen pulmonalarteriellen Druckantwort in isolierten Rattenlungen beteiligt ist.
Diese Vermutung wird durch eine erst kürzlich entdeckte Kinase IKK-i unterstützt, die über eine Phosphorylierung von IκBα den Transkriptionsfaktor NF-κB zu aktivieren vermag, und nachweislich durch LPS und andere inflammatorische Zytokine in verschiedenen Immunzellen induzierbar ist (85, 87).
Die erhöhte Aktivität des Transkriptionsfaktors und die verstärkte zelluläre Expression von Cox-2 und der Thromboxan-Synthase nach LPS-Stimulation in glatten Gefäßmuskelzellen spricht weiterhin für eine Beteiligung von NF-κB an der durch LPS induzierten gesteigerten pulmonalarteriellen Druckantwort nach AA-Gabe in isolierten Rattenlungen (36, 42).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode des „Primings“, also die Vorstimulation der Lunge mit LPS, die alleine zu keiner physiologisch messbaren Reaktion, sondern erst durch Gabe eines zweiten Stimulus zu einer pulmonalen Druckreaktion mit Ödembildung führt, kann durchaus auf die klinische Situation des septischen Krankheitsbildes übertragen werden. Patienten, die im Zuge einer Infektion mit gramnegativen Bakterien mit bakteriellen Endotoxinen in Kontakt kommen, d.h. ein Priming durchlaufen, sind durch eine weitere Infektion mit bakteriellen Toxinen erheblich gefährdeter, als durch alleinige Infektion mit Endo- oder Exotoxinen. Ebenso kann ein Keim beide Toxinarten besitzen, die synergistisch wirken oder es kommt zu Mischinfektionen, wenn Patienten mehreren Keimen ausgesetzt sind. Auch heute noch zählt die Endotoxinsepsis zu den häufigsten Todesursachen auf Intensivstationen. Klinische Symptome des septischen Lungenversagens (ARDS) sind ein pulmonaler Hypertonus, erhöhter Atemwegswiderstand und die Ausbildung eines Lungenödems. Die erhöhte Bereitschaft der isolierten Lunge auf den Primingeffekt verstärkt zu reagieren ist

maßgeblich auf eine verstärkte Expression der Cox-2 nach LPS-Stimulation zurückzuführen (41, 42). Auch die direkt schädigenden Effekte von Endotoxin auf die Lunge wurden sowohl in Ganztierversuchen als auch an isolierten Lungenzellen untersucht, in denen nachgewiesen werden konnte, dass sehr hohe Mengen Endotoxin durchaus Schädigungen des Bronchialgewebes und der Endothelzellen pulmonaler Gefäße bewirken können (10, 22, 112).

Der pulmonale Gefäßtonus wird entscheidend durch Enzyme und Metabolite des Zyklooxygenase-abhängigen Arachidonsäuremetabolismus reguliert. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Metabolite der AA haben zum Teil funktionell antagonistische Wirkungen auf vasomotorische Regulation und Sepsis-induzierte inflammatorische Vorgänge in der Lunge (21).
Eine Vorbehandlung der Lungen mit LPS führte bereits im zweistündigen Beobachtungszeitraum vor der AA-Gabe zu einem Ansteigen sowohl der vasokonstriktorisch wirkenden Metabolite PGE_2, PGF_{2alpha} und TxA_2, als auch des Vasodilatators PGI_2, ohne dass Veränderungen der biophysikalischen Parameter pulmonalarterieller Druck, Lungengewicht und Ventilationsdruck beobachtet werden konnten. Diese Beobachtung entspricht den Erkenntnissen aus bereits durchgeführten Studien an isolierten Lungen (22, 39, 104). Zu vermuten ist ein sich einstellendes Gleichgewicht der funktionellen Antagonisten der verschiedenen Arachidonsäuremetabolite, die unter einer Stimulation mit Endotoxin freigesetzt werden (41).
Die Applikation von AA zum Versuchsende bewirkte in den Kontrollgruppen parallel zum Ansteigen des pulmonalarteriellen Drucks einen signifikanten Anstieg der Metabolitkonzentrationen im Perfusat, der nach LPS-Stimulation noch deutlicher ausfiel. Es ist bekannt, dass dem pulmonalen Gefäßsystem zugeführte AA in eine Vielzahl von Prostanoiden metabolisiert wird, von denen einige vasoaktive Antagonisten sind (16, 21). Die Tatsache, dass durch Vorstimulation der Lunge mit LPS ein zusätzliches Ansteigen der Metabolitkonzentrationen nach AA-Gabe zu beobachten ist, kann der erhöhten Expression der Zyklooxygenaseenzyme,

besonders der Cox-2, im Sinne des „Primingeffektes“ zugeschrieben werden (41, 42).

Einzig PGF_{1alpha} zeigte in den mit LPS stimulierten Lungen im Vergleich zu den Kontrollen kein signifikantes zusätzliches Ansteigen der Konzentration nach Gabe von AA, was gegen eine vermehrte PGI_2-Biosynthese nach LPS-Stimulation spricht (40). Eine Erklärung dafür wäre, dass die Biosynthese von PGI_2 im Lungengewebe möglicherweise über die Cox-1 katalysiert wird (37). Diese Isoform der Zyklooxygenase unterliegt nicht dem Einfluss der LPS-vermittelten Hochregulation wie die Cox-2, sondern bleibt nach LPS-Stimulation der Zelle in seiner Expression unverändert (42). Mittlerweile geht man von einer funktionellen Koppelung zwischen der Cox-1 und der Prostazyklin-Synthase im pulmonalen Gefäßendothel aus, die im Zusammenspiel mit der Cox-2-abhängigen Thromboxan-Synthase in der glatten Gefäßmuskulatur den pulmonal-arteriellen Gefäßtonus reguliert (35, 37, 42).

Interessanterweise führten steigende Konzentrationen der beiden NF-κB-Inhibitoren in den mit LPS stimulierten Lungen, parallel zu der beschriebenen Hemmung der pulmonalarteriellen Druckerhöhung, zu einer dosisabhängigen signifikanten Erhöhung der Cox-1-abhängigen PGF_{1alpha}-Ausschüttung nach Gabe von AA. Die Hemmung des Transkriptionsfaktors vermindert also nicht die Freisetzung von PGI_2, was darauf hindeutet, dass der Transkriptionsfaktor auf Ebene der Signaltransduktion nicht an der Cox-1-abhängigen Bildung von PGI_2 beteiligt ist. Im Gegensatz zu PGF_{1alpha} als Abbauprodukt von PGI_2 fiel die Freisetzung des vasokonstriktiven, Cox-2-abhängigen Metaboliten 6-keto PGF_{2alpha} unter NF-κB-Hemmung in den mit LPS stimulierten Lungen deutlich erniedrigt aus. In unstimulierten Lungen dagegen blieb die Ausschüttung des Metaboliten PGF_{2alpha} nach AA-Gabe trotz steigender Inhibitorkonzentrationen konstant.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit umfassten weiterhin die Messung des vasokonstiktorisch wirkenden Zyklooxygenase-abhängigen Arachidonsäure-metaboliten TxB_2 als Abbauprodukt von Thromboxan A_2.

Trotz der dosisabhägigen Verminderung des PAP unter Anwendung der NF-κB-Inhibitoren blieb die TxB_2-Freisetzung in das Pufferperfusat auch bei ansteigenden Inhibitorkonzentrationen konstant. Studien belegen, dass Thromboxan A_2 als potenter Vasokonstriktor, nach Gabe von AA für die pulmonalarterielle Drucksteigerung verantwortlich ist (16, 104, 105). Untersuchungen an isolierten Rattenlungen führten die vermehrte Synthese von TxA_2, resultierend in einem deutlichen Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks nach Gabe von AA unter LPS-Stimulation, auf eine Hochregulation von Cox-2 und der Thromboxan-Synthase in der pulmonalen glatten Gefäßmuskulatur zurück (36, 42). Analog zu der unveränderten Bildung von TxB_2, zeigte die Hemmung des Transkriptionsfaktors keinerlei Auswirkung auf die Freisetzung des vasokonstriktiven Metaboliten PGE_2 in das Perfusat.

Die hier vorliegenden Ergebnisse aus der Untersuchung der Metabolite des pulmonalen Arachidonsäurestoffwechsels lassen darauf schließen, dass für die Suppression der AA-induzierten pulmonalen Gefäßdruckantwort durch selektive Hemmung von NF-κB, hauptsächlich die exzessive Erhöhung des Vasodilatators Prostazyklin verantwortlich zu sein scheint. Die Bildung von Prostazyklin, im pulmonalen Gefäßendothel über die Cox-1/Prostazyklin-Synthase katalysiert, konnte nicht durch eine Hemmung von NF-κB gehemmt werden. Eine Beteiligung des NF-κB-Signaltransduktionsweges an der im Gefäßendothel vorhandenen Cox-1-abhängigen Bildung von PGI_2 (35) konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden.
Die, analog zur Verminderung der pulmonalarteriellen Druckreaktion, deutlich reduzierte Biosynthese des Vasokonstriktors PGF_{2alpha} in den mit LPS stimulierten Lungen durch Hemmung des Transkriptionsfaktors könnte aus einer verminderten Cox-2/PGF-Synthase Aktivität in den Zellen der glatten Gefäßmuskulatur resultieren. Dies wiederum stützt die Vermutung, dass NF-κB auf Ebene der Signaltransduktion die LPS-vermittelte Expression der Cox-2 reguliert.

Trotz steigender Inhibitorkonzentrationen war keine weitere Reduzierung der PGF_{2alpha}–Konzentration zu erreichen, was dafür spricht, dass die Hemmung des Transkriptionsfaktors nur die LPS-bedingte Hochregulation der Cox-2 beeinflusst, die konstitutive Expression der Cox-2 in pulmonalen Zellen aber nicht der Regulation durch NF-κB unterliegt. Für diese These spricht weiterhin, dass die PGF_{2alpha}-Konzentration in Kontrollen und ungeprimten Lungen, also in Lungen ohne einen Kontakt zu LPS, unabhängig der steigenden Inhibitorkonzentration, nahezu konstant blieb.

Die kontinuierliche Biosynthese der beiden Metabolite TxB_2 und PGE_2, unabhängig vom Zusatz eines NF-κB-Inhibitors in steigender Dosierung sowohl in Kontrollversuchen, als auch in den mit LPS stimulierten Lungen, kann ebenfalls darauf zurückzuführen sein, dass die konstitutive Cox-2-Aktivität und somit der physiologische Metabolismus dieser beiden Metabolite durch Hemmung des Transkriptionsfaktors unbeeinträchtigt bleibt. Somit wäre eine von der LPS-induzierten Cox-2-Hochregulation unabhängige Biosynthese von TxA_2 und PGE_2 unter physiologischen Bedingungen gegeben, auf die der Transkriptionsfaktor NF-κB keinen Einfluss hat.

Weiterhin ist in den Lungenzellen, in denen beide Isoformen der Zyklooxygenase vorhanden sind, eine Verschiebung des Arachidonsäureabbaus in Richtung eines gesteigerten Metabolismus über die Cox-1 denkbar. In einer kürzlich durchgeführten immunhistochemischen Studie wurde gezeigt, dass sowohl Cox-1 als auch Cox-2 in verschiedenen pulmonalen Geweben und Zellen nebeneinander vorkommend nachweisbar sind (35). Mit steigender Konzentration eines NF-κB-Inhibitors, resultierend in einer supprimierten Cox-2-Hochregulation nach LPS-Stimulation, könnte zugegebene freie AA über die ebenfalls in der Zelle vorhandene Cox-1 metabolisiert werden. Die, parallel zu steigenden Inhibitorkonzentrationen, deutlich erhöhte Expression des Cox-1-abhängigen Vasodilatators PGF_{1alpha}, resultierend in der Suppression der AA-induzierten pulmonalen Gefäßduckantwort, wäre somit plausibel erklärbar.

Der nachweislich fehlende regulierende Einfluss des Transkriptionsfaktors auf die beiden Prostanoide TxB_2 und PGE_2 kann bedeuten, dass die zelluläre Expression ihrer spezifischen Synthasen über andere Transkriptionsfaktoren als NF-κB reguliert werden. In Studien wird dem Transkriptionsfaktor NF-E2 eine wichtige Funktion in der Signaltransduktionskaskade zur Regulierung der Thromboxan-Synthase zugeschrieben, während die Regulation der PGE_2-Synthase dem Transkriptionsfaktor Egr-1 zu unterliegen scheint (113, 114).

Die Applikation von AA bewirkte in den mit LPS stimulierten Lungen, neben einem Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks und der Gewichtszunahme, eine deutliche Erhöhung des Ventilationsdrucks, die in den Kontrollversuchen ohne LPS-Stimulation ausblieb. Es ist davon auszugehen, dass die reaktive Ventilationsdrucksteigerung durch eine Erhöhung des Atemwegswiderstandes und nicht durch eine Abnahme der Compliance bedingt ist, da diese Reaktion sehr schnell nach Gabe der AA eintrat. Sowohl Untersuchungen an Kulturen glatter Bronchialmuskelzellen, als auch Studien mittels immunhistochemischer Färbungen von Rattenlungenpräparaten bewiesen die Anwesenheit von Cox-1 und Cox-2 in Epithelzellen und glatten Muskelzellen des Bronchialtraktes (35) und zeigten, dass durch Stimulation mit LPS in diesen Zellen eine Hochregulation sowohl der Cox-2 als auch der Thromboxan-Synthase auszulösen ist (29, 36, 42). Daher ist anzunehmen, dass die LPS-induzierte Hochregulation von Cox-2, resultierend in einer verstärkten Biosynthese von Thromboxan, für die Bronchokonstriktion nach AA-Gabe verantwortlich ist (115).
Interessanterweise zeigte die Hemmung des Transkriptionsfaktors NF-κB durch selektive Inhibitoren keinen Einfluss auf den durch AA-Gabe ausgelösten Anstieg des Ventilationsdrucks in den mit LPS stimulierten Lungen. Vermutlich sind vorzugsweise andere Transkriptionsfaktoren als NF-κB für die Signaltransduktion der Cox-2-vermittelten Bronchotonus-Regulation nach Stimulation mit LPS relevant.
Erst vor kurzem veröffentlichte Ergebnisse aus Versuchsreihen mit selektiven Cox-2 und MAPK-Inhibitoren, ergänzt durch immunhistochemische Untersuchungen

ergaben, dass die LPS-induzierte Hochregulation von Cox-2, resultierend in einer Bronchokonstriktion durch verstärkte Tromboxanbildung, über die Signaltransduktionskaskade der p38 MAPK reguliert werden kann (36, 41, 42). Andere Studien berichten von diversen anderen Transkriptionsfaktoren wie AP-1, AP-2 und CRE Kernbindungsproteinen, die ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Hochregulation von Cox-2 spielen (106, 116, 117, 118).
Ebenso zeigen Studien an verschiedenen menschlichen Epihelzellreihen, dass eine Zytokin-induzierte Cox-2-Expression über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB vorwiegend in alveolären Epithelzellen und nicht in bronchialen glatten Muskelzellen der kleinen Bronchioli nachweisbar ist (57, 58), über die eine Bronchotonusregulation möglich wäre.

Analog zum Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks kam es nach Applikation der AA zu einer Gewichtszunahme der Lungen. Möglicherweise wird ein Teil dieses Effekts durch Leukotriene verursacht, die über das Enzym Lipoxygenase aus AA synthetisiert werden. Leukotriene sind in der Lage die Kapillarpermeabilität zu erhöhen und besitzen vasokonstriktorische Wirkung (17, 119, 120). Gegen diese Vermutung spricht die Tatsache, dass die durch Leukotriene verursachten Effekte durch einen langsamen Wirkungseintritt charakterisiert sind, während die in unseren Versuchen beobachtete Gewichtszunahme innerhalb weniger Minuten eintrat.
Eine plausible Erklärung für den schellen Gewichtsanstieg in den Lungen könnte der im Perfusat nach AA-Gabe in seiner Konzentration deutlich erhöhte potente Vasokonstriktor Thromboxan geben. Thromboxan, gebildet über die in den kleinen pulmonalkapillären Gefäßen immunhistochemisch nachweislich vorhandene Cox-2 (35, 41), fungiert als potenter Vasokonstriktor im prä- und deutlich stärker ausgeprägt im postkapillären Gefäßbett der Lunge (121, 122, 123). Dadurch wird eine Erhöhung des kapillären Filtrationsdrucks erzeugt, wodurch es zu einer vermehrten Flüssigkeitsfiltration durch das Kapillarbett kommt, resultierend in einer schnellen Gewichtseinlagerung. Die Annahme eines durch Thromboxan-verursachten Kapillardruckanstiegs deckt sich mit Ergebnissen aus Versuchen an isoliert

perfundierten, mit LPS stimulierten Rattenlungen, in denen selektive Cox-2-Inhibitoren dosisabhängig sowohl die TxB_2-Ausschüttung als auch die Gewichtszunahme nach AA-Gabe deutlich reduzierten (41, 43).

Die beiden NF-κB-Inhibitoren BAY 11-7082 und BAY 11-7085 waren nicht in der Lage die spontane Lungengewichtserhöhung nach AA-Substitution in den mit LPS stimulierten Lungen zu supprimieren. Vielmehr provozierte die Applikation der NF-κB-Inhibitoren einen Anstieg des Lungengewichts bereits im einstündigen Perfusionszeitraum nach der Inhibitor-Gabe bis zu dem Zusatz der Arachidonsäure.

LPS-Stimulation und Zugabe des selektiven NF-κB-Inhibitors BAY 11-7082 in einer Dosierung von 40 µM führten zu Gewichtseinlagerungen von über 3,5 g. Weder in den Kontrollgruppen, noch in den mit LPS stimulierten Lungen, die keinen Kontakt zu einem NF-κB-Inhibitor hatten, konnte in diesem Perfusionszeitraum ein ähnlicher Gewichtszuwachs registriert werden.

Nach Zusatz der AA wurde eine Bewertung des Gewichtszuwachses sogar unmöglich, da sich unter Hemmung des Transkriptionsfaktors ein fulminantes Lungenödem mit einer Gewichtszunahme von über 10 g entwickelte.

Für diesen überraschend starken Gewichtszuwachs nach AA-Gabe unter Verwendung eines NF-κB-Inhibitors ist die Thromboxan-vermittelte Vasokonstriktion der postkapillären Gefäße nicht verantwortlich zu machen. Nach Zugabe des NF-κB-Inhibitors BAY 11-7085 in unterschiedlichen Konzentrationen war in den Versuchsgruppen mit und ohne LPS-Stimulation keine erhöhte TxB_2-Ausschüttung zu beobachten. Als möglicher pathophysiologischer Mechanismus, sowohl für die Lungengewichtszunahme im Zeitraum vor der AA-Gabe nach Verwendung eines NF-κB-Inhibitors, als auch für den späteren spontanen Lungengewichtsanstieg, ausgelöst durch AA-Gabe, ist eine erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität mit massivem Austritt von Flüssigkeit aus den Lungenkapillaren in das Interstitium und den Alveolarraum, im Sinne eines Lungenödems, zu vermuten. Verantwortlich für die Entstehung des Lungenödems ist möglicherweise eine Störung der endothelialen Barrierefunktion oder eine Erhöhung des hydrostatischen kapillären Drucks.

Beiden möglichen Mechanismen wurde in der vorliegenden Arbeit am Modell der isolierte Lunge in ergänzenden Versuchsreihen genauer nachgegangen.

Die Methode der Doppelokklusion (Double Clamping) ermöglicht die Bestimmung des mikrovaskulären Drucks in den Kapillaren der pulmonalen Strombahn (101, 102). Dabei ergaben die Messungen der kapillären Drücke in den mit LPS stimulierten Lungen über einen Beobachtungszeitraum von zwei Stunden keine unterschiedlichen Werte zwischen den Gruppen, die mit oder ohne Zusatz eines NF-κB-Inhibitors perfundiert wurden. Auch bei Messungen der Kapillardrücke während gezielter Druckerhöhung auf das kapilläre Gefäßbett (venous pressure elevation, VPE) ergab der Zusatz eines NF-κB-Inhibitors keine Veränderung der gemessenen Drücke zwischen Kontrollgruppen und den mit LPS stimulierten Lungen. Die Entstehung des Lungenödems unter Hemmung des Transkriptionsfaktors resultiert somit nicht aus einer Erhöhung des kapillären Drucks durch Veränderung der prä- oder postkapillären Widerstände im pulmonalen Gefäßbett.

Weitere Versuche mittels VPE und die Bestimmung des kapillären Filtrationskoeffizienten (Kfc) ermöglichten eine Aussage über die Integrität bzw. die Permeabilität des Gefäßendothels in der kapillären Lungenstrombahn. Eine Hemmung des Transkriptionsfaktors führte zu deutlich erhöhten Kfc-Werten bereits in der ersten VPE, während die Kfc-Werte ohne Zusatz eines NF-κB-Inhibitors in allen aufeinanderfolgenden VPEs sich nahezu konstant niedrig verhielten. Während der zweiten hydrostatischen Druckerhöhung, unter der Hemmung des Transkriptionsfaktors, ließ die massive Flüssigkeitseinlagerung in das Lungengewebe technisch keine weitere Messung des kapillären Filtrationskoeffizienten zu.
Analog zu den niedrigen Kfc-Werten fielen die Gewichtszunahmen bei den Lungen ohne Inhibitorzusatz während der beiden VPEs mit jeweils etwa 1 g moderat aus. Im Zeitraum nach Abschluß der ersten VPE bis zum Beginn der zweiten VPE war tendentiell ein Gewichtsrückgang zum Ausgangslungengewicht im Sinne einer

intravasalen Rückresorption der eingelagerten Flüssigkeit zu beobachten. Eine Hemmung des Transkriptionsfaktors hatte bereits während der ersten VPE eine Gewichtszunahme von 2,6 bis 2,8 g zur Folge, von der sich die Lunge bis zur zweiten Druckerhöhung nicht erholen konnte. Ein fulminanter Gewichtszuwachs von über 10 g während der zweiten VPE machte bei diesen Lungen eine Fortführung der Versuche zunichte.

Die deutlichen Gewichtszunahmen und die stark erhöhten Kfc-Werte nach NF-κB-Hemmung, sowohl in den Kontrollgruppen, als auch in den mit LPS stimulierten Lungen, sowie die fehlende intravasale Flüssigkeitsresorption zwischen den venösen Druckerhöhungen sprechen für eine erhöhte pulmonal-kapilläre Permeabilität aufgrund einer Beeinträchtigung der endothelialen Barrierefunktion unter Hemmung des Transkriptionsfaktors NF-κB. Daraus läßt sich ableiten, dass die konstitutive Aktivierung des Transkriptionsfaktors sowohl unter physiologischen Bedingungen, als auch innerhalb inflammatorischer Prozesse für eine Aufrechterhaltung der natürlichen pulmonal-kapillären Endothelbarriereeigenschaften von außerordentlicher Bedeutung zu sein scheint.

In der Pathogenese des ARDS nehmen die Läsionen an der kapillär-endothelialen und der alveolo-epithelialen Schranke eine Schlüsselposition im Rahmen der pathologischen Veränderungen in der Lunge ein. Der Effekt ist eine protrahierte Schädigung permeabler Schranken mit einschneidender Permeabilitätserhöhung und Ausbildung eines sogenannten „capillary leak Syndroms“ (124).
Bereits in früheren Studien konnte, unter Verwendung des bakteriellen C_2-Exotoxins von Clostridium botulinum, durch selektive Hemmung des endothelialen mikrofilamentären Aktin-Netzwerks, eine mikrovaskuläre Schrankenstörung mit extremen Flüssigkeitsverschiebungen in das Interstitium an isolierten Kaninchenlungen provoziert werden (125). Das auf Aktin-basierende Mikrofilamentsystem als Bestandteil des Zytoskeletts biologischer Zellen, übt eine wichtige Funktion zur Stabilisierung der endothelialen Zellmembran und der

Aufrechterhaltung der Integrität der pulmonal-endothelialen Barriere aus (125, 126, 127, 128, 129). Als dichte Bündel direkt unter der Plasmamembran lokalisiert, ist das mikrofilamentäre Netzwerk der Endothelzelle in der Lage, den biomechanischen Scherkräften des Bluflusses durch Remodeling, d.h. über eine strukturelle Umgestaltung, protektiv entgegenzuwirken (130, 131, 132). Gezielte pharmakologische Beeinflussung des mikrofilamentären Zytoskeletts mit dem selektiv wirksamen Clostridium-Botulinum C_2-Toxin verhinderte die gegenregulatorischen Maßnahmen des Mikrofilament Systems auf veränderte Blutflußbedingungen und beeinträchtigte das Remodeling gegenüber hämodynamischen Kräften (133, 134).

Studien belegen, dass der Transkriptionsfaktor NF-κB im Zytoplasma mit Aktin-haltigen Strukturen interagiert (135), was die Vermutung nahelegt, dass NF-κB am Remodeling des mikrovaskulären endothelialen Mikrofilamentsystems beteiligt ist. Das Gefäßendothel reagiert auf große Scherkräfte während turbulenten Strömungsbedingungen mit einer deutlich gesteigerten Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, einschließlich NF-κB, im Vergleich zu Zellen, die konstant laminaren Strömungen, also minimalen Scherkräften, ausgesetzt sind (136). Diese auf die Zelle einwirkenden Scherkräfte des Blutflusses induzieren eine Expression von b-actin mRNA, resultierend in einer verstärkten Umgestaltung des Aktin-haltigen filamentären Netzwerks (132).

Vor diesem Hintergrund könnte eine Hemmung des Transkriptionsfaktors NF-κB über eine Beeinträchtigung des protektiven Remodeling des filamentären Aktin-Netzwerks zu den oben beschriebenen mikrovaskulären Störungen der endothelialen Barrierefunktion führen.

Die durch Verwendung der NF-κB-Inhibitoren beobachteten Anstiege der Kfc-Werte reflektieren eine mikrovaskuläre Schrankenstörung bereits vor Gabe der Arachidonsäure mit den beobachteten, zum Teil extremen Flüssigkeitsverschiebungen in das Interstitium. Durch eine kurzfristige hydrostatische Druckprovokation auf den pulmonalvenösen Schenkel, als Auslöser für erhöhte Scherkräfte, die von den Lungen der Kontrollgruppen, selbst nach Vorstimulation

durch LPS, folgenlos toleriert wurde, ließ sich nach NF-κB-Hemmung eine ausgeprägte Permeabilitätsstörung induzieren. Damit wird deutlich, dass das pulmonale Endothel nach einer Hemmung des Remodelings am filamentären Aktin nicht mehr in der Lage ist, den leichten Belastungssituationen in Form eines durchaus tolerierbar erhöhten Kapillardrucks, standzuhalten, was zum Verlust der Integrität des kapillären Gefäßendothels führt.

In der Vergangenheit wurde mit diversen therapeutischen Strategien versucht, die hohe Mortalität des ARDS zu senken. Bisher blieben die verschiedenen pharmakologischen Ansätze, mit dem Versuch auf bestimmte pathophysiologisch relevante Prozesse des inflammatorischen Geschehens einzugreifen, ohne durchschlagenden Erfolg.
Die Applikation vasodilatorischer Substanzen wie NO, PGE_1 oder PGI_2 konnte den pulmonalen Hypertonus senken und die Perfusion gut ventilierter Lungenareale verbessern, blieb allerdings ohne Auswirkung auf die Überlebenswahrscheinlichkeit (138, 139, 140). Mit der Surfactantersatztherapie war beim akuten septischen Lungenversagen des Erwachsenen eine Steigerung des Gasaustauschs und die Verbesserung der Oxygenierung zu erzielen (143, 144). Inhalative Verabreichung von Prostaglandin in Kombination mit der systemischen Anwendung von Phosphodiesterase-3/4-Inhibitoren verringerten im Tiermodell den pulmonalarteriellen Druck sowie die Ödembildung und beeinflussten den Shuntfluß positiv (145).
Andere therapeutische Ansätze zielen auf eine pharmakologische Intervention auf Ebene des Zyklooxygenase-abhängigen Arachidonsäurestoffwechsels ab. Antiinflammatorisch und immunsuppressiv wirkende Pharmaka wie die Glukokortikoide vermitteln ihre Wirkung über eine Verhinderung der Aktivität des Transkriptionsfaktors in den Zellkern zu translozieren und an die DNA zu binden. Andererseits induzieren sie die Synthese des inhibitorischen Faktors IκBa, der die Translokation von NF-κB in den Zellkern hemmt (60). Allerdings konnte auch die Anwendung von Glukokortikoiden sowie der Einsatz nicht-selektive Hemmstoffe der

Zyklooxygenase die Progression des ARDS bei Sepsispatienten nicht verhindern (141).

Die verschiedenen biologischen und biochemischen Inhibitoren von NF-κB die derzeit zu Verfügung stehen agieren über eine Blockade des Signaltransduktionswegs, der zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors führt, oder sie beeinflussen die Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA (65). Verschiedene Antioxidantien hemmen NF-κB über eine Blockierung der Signalwege, die zu der Phosphorylierung von IκB führen, oder sie verhindern die Degradierung von IκB (60, 93).

Die Regulation und Kontrolle der NF-κB-Aktivierung könnte eine wirkungsvolle therapeutische Strategie in der Reduzierung der Gewebsschädigung darstellen, die aus der Freisetzung inflammatorischer Mediatoren resultiert. Gegen eine komplette und persistierende Blockade der NF-κB-Aktivierung spricht die in dieser Studie nachgewiesene konstitutive Funktion des aktivierten Transkriptionsfaktors an der Aufrechterhaltung der natürlichen endothelialen Barrierefunktion pulmonaler Kapillargefäße. Weiterhin wird dem Transkriptionsfaktor seit seiner Entdeckung durch Sen und Baltimore (56) immer wieder eine Schlüsselrolle in der Entwicklung und der Funktion des Immunsystems zugeschrieben. Außerdem ist die Bedeutung von NF-κB in Prozessen der Apoptose noch völlig unklar, da unterschiedliche Studien dem Transkriptionsfaktor deutlich pro- und antiapoptotische Funktionen, abhängig vom Zelltyp und der Form der Stimulation, zuschreiben konnten (60, 61, 142). Eine Hemmung der Aktivität von NF-κB mit dem Ziel der Unterdrückung der Freisetzung inflammatorischer Mediatoren innerhalb septischer Prozesse könnte zu Störungen der pulmonalen Endothelbarriere führen, sowie Dysfunktionen des Immunsystems und die Apoptose gesunder Zellen nach sich ziehen. Um einen therapeutischen Einsatz von Inhibitoren des Transkriptionsfaktors zu ermöglichen, müssen zunächst Substanzen entwickelt werden, die auf spezifische Untereinheiten von NF-κB, sowie zellspezifisch wirken, um eine Hemmung des Transkriptionsfaktors einzig in bestimmten Zielzellen zu gewährleisten. Obwohl die immunhistochemische Lokalisierung der verschiedenen Untereinheiten des Transkriptionsfaktors bis zu

einem gewissen Grad zelltyp-spezifische Expressionen aufweisen, welche eventuell als pharmakologische Ziele in Betracht gezogen werden könnten, zeigen besonders endotheliale Zellen und glatte Gefäßmuskelzellen der intrapulmonalen Gefäße kein selektives Vorkommen von NF-κB-Untereinheiten.
Nach den pathophysiologischen Ergebnissen zu urteilen, die mit dem Modell der isolierten Lunge gewonnen wurden, stellt eine therapeutische Intervention auf Ebene der intrazellulären Signaltransduktion, über eine pharmakologische Modulation der Prozesse in denen der Transkriptionsfaktor involviert ist, derzeit keine erfolgreiche Strategie für die Entwicklung einer potenten Behandlung von inflammatorischen Lungenerkrankungen und dem akutem Lungenversagen dar.

Die vorliegende Arbeit stand unter der Zielsetzung, pathophysiologische Grundlagen zur erhöhten bronchialen und vaskulären Reaktivität der Lunge in einem Modell des septischen Lungenversagens unter Berücksichtigung des „Priming-Modells“ und den Auswirkungen der Hemmung des Transkriptionsfaktors NF-κB aufzuklären.
In dieser pharmakologisch-experimentellen Studie konnte an Rattenlungen nachgewiesen werden, dass NF-κB in die intrazelluläre Signaltransduktion zur Hochregulation sowohl der Cox-2 als auch der Thromboxan-Synthase in glatten Gefäßmuskelzellen nach LPS-Stimulation involviert ist. Der Transkriptionsfaktor ist dabei zentral an der Regulation des pulmonalen Vasotonus, insbesondere unter inflammatorischen Bedingungen, beteiligt.

Weiterhin wurde die Bedeutung von NF-κB an der Aufrechterhaltung der endothelialen Barrierefunktion an isolierten Rattenlungen aufgezeigt. Die fulminanten Gewichtszunahmen unter Hemmung des Transkriptionsfaktors, sowohl in Kontrollen als auch in den mit LPS stimulierten Lungen, resultieren nachweislich nicht aus Veränderungen prä- oder postkapillärer Gefäßwiderstände sondern aus einer erhöhten mikrovaskulären Permeabilität. Daraus läßt sich ableiten, dass die konstitutive Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB, sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch innerhalb inflammatorischer Prozesse einer

mikrovaskulären, hämodynamisch-bedingten Schrankenstörung entgegenwirkt und zur Aufrechterhaltung der pulmonal-kapillären Endothelbarriereeigenschaften notwendig ist.

Die detaillierte Aufklärung der Funktion und der intrazellulären Sequenzen des Transkriptionsfaktors im Rahmen inflammatorischer Prozesse, trägt zu neuen Erkenntnissen der pathophysiologischen Abläufe im septischen Lungenversagen bei. Es besteht die berechtigte Hoffnung, dass sich aus dem zunehmenden Wissen über die komplexen Abläufe, die zu diesem Krankheitsbild beitragen, zukünftig therapeutische Optionen eröffnen könnten.

5 Literaturverzeichnis

1. Ashbaugh D.G., D.B. Bigelow, und T.L. Petty. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* II: 319-323, 1967.
2. Wyncoll L.A.D., und T.W. Evans. Acute respiratory distress syndrome, *Lancet* 354: 497-501, 1999.
3. Bernard G.R., A. Artigas, K.L. Brigham, J. Carlet, K. Falde, L. Hudson, M. Lamy, J.R. Legall, A. Morris, und R. Spragg. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination*. Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 149: 818-824, 1994.
4. Atabai K., und M.A. Matthay. The pulmonary physician in critical care. 5: Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: definitions and epidemiology. *Thorax* 57: 452, 2002.
5. Hudson L.D., und K.P. Steinberg. Epidemiology of acute lung injury and ARDS. *Chest.* 116: 74-82S, 1999.
6. Hudson L.D., J.A. Milberg, D. Anardi, und R.J. Maunder. Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome*. Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 151: 293-301, 1995.
7. Villar J., und A.S. Slutsky. The incidence of the adult respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.* 140: 814-816, 1989.
8. Hyers, T.M., und A.A. Fowler. Adult respiratory distress syndrome: causes, morbidity and mortality. *Fed. Proc*. 45: 25-29, 1986.
9. Martin M.A., und H.J. Silverman. Gram-negative sepsis and the adult respiratory distress syndrome. *Clin. Infect. Dis*. 14: 1213-1228, 1992.
10. Brigham K.L., und B. Meyrick. Endotoxin and lung injury. *Am. Rev. Respir. Dis.* 133: 913-927, 1986.
11. Ulevitch R.J. Recognition of bacterial endotoxin in biologic systems. *Lab. Invest*. 65: 121-122, 1991.

12. Chan S., und V.N. Reinhold. Detailed structural characterization of Lipid A: Electrospray ionization coupled with tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem*. 218: 63-73, 1994.
13. Olson N.C., W.L. Salzer, und C.E. McCall. Biochemical, physiological, and clinical aspects of endotoxemia. *Mol. Aspects Med.* 1: 511, 1988.
14. Rietschel E.T., T. Kirikae, F.U. Schade, U. Mamat, G. Schmidt, H. Loppnow, A.J. Ulmer, U. Zahringer, U. Seydel, F. Padowa, M. Schreier, und H. Brade. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J*. 8: 217-225, 1994.
15. Andersen N.H., C.J. Hartzell, und B. De. Chemistry and structure of cyclooxygenase-derived eicosanoids: a historical perspective*. Advanc. Prostagl. Thrombox. Leukotr. Res*. 14, 1985.
16. Holtzman M.J. Arachidonic acid metabolism. Implication of biological chemistry for lung function and disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* 143: 188-203, 1991.
17. Seeger W., D. Walmrath, M. Menger, und H. Neuhof. Increased lung vascular permeability after arachidonic acid and hydrostatic challenge. *J. Appl. Physiol*. 61: 1781-1789, 1986.
18. Seeger W., M. Menger, D. Walmrath, G. Becker, F. Grimminger, und H. Neuhof. Arachidonic acid lipoxygenase pathways and increased vascular permeability in isolated rabbit lungs. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136: 964-972, 1987.
19. Chang S.-W., J.Y. Westcott, W.C. Picket, R.C. Murphy, und N.F. Voelkel. Endotoxin-induced lung injury in rats: role of eicosanoids. *J. Appl. Physiol*. 66: 2407-2418, 1989.
20. Seeger W., H. Walter, N. Suttorp, M. Muhly, und S. Bhakdi. Thromboxane-mediated hypertension and vascular leakage evoked by low doses of Escherichia coli hemolysin in rabbit lungs. *J. Clin. Invest.* 84: 220-7, 1989.
21. Malik A.B., M.B. Perlman, F.A. Cooper, T. Noonan, und R. Bizios. Pulmonary microvascular effects on arachidonic acid metabolites and their role in lung vascular injury. *Fed. Proc*. 44: 36-42, 1985.

22. Streudel W., H.-J. Krämer, D. Degner, S. Rosseau, H. Schütte, D. Walmrath, und W. Seeger. Endotoxin priming of thromboxane-related vasoconstrictor responses in perfused rabbit lungs. *J. Appl. Physiol.* 83: 18-24, 1997.

23. Nowak J., und G.A. FitzGerald. Redirection of prostaglandin endoperoxide metabolism at the platelet-vascular interface in man. *J. Clin. Invest*. 83: 380-5, 1989.

24. Seibert K., J.R. Sheller, und L.J. Roberts. (5Z,13E)-(15S)-9α,11β,15-trihydroxyprosta-5,13-dien-1-oic acid (9α,11β-prostaglandin F_2): formation and metabolism by human lung and contractile effects on human bronchial smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 84: 256-60, 1987.

25. Pentland A.P., und P. Needleman. Modulation of keratinocyte proliferation in vitro by endogenous prostaglandin synthesis. *J. Clin. Invest*. 77: 246.251, 1986.

26. DeWitt D.L. Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression. Bi*ochem. Biophys. Acta* 1083: 121-134, 1991.

27. Feng L., W. Sun, Y. Xia, W.W. Tang, P. Chanmugam, E. Soyoola, C.B. Wilson, und D. Hwang. Cloning two isoforms of rat cyclooxygenase: Differential regulation of their expression. *Arch. Biochem. Biophys*. 307: 361-368, 1993.

28. Goppelt-Struebe M. Regulation of prostaglandin endoperoxydase (cyclooxygenase) isoenzyme expression. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 52: 213-222, 1995.

29. Habib A., C. Créminon, Y. Frobert, J. Grassi, P. Pradelles, und J. Maclouf. Demonstration of an inducible cyclooxygenase in human endothelial cells using antibodies raised against the carboxyl-terminal region of the cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* 268: 23448-23454, 1993.

30. Hempel S.L., M.M. Monick, und G.W. Hunninghake. Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase-2 protein and mRNA in human alveolar macrophages and blood monocytes. *J. Clin. Invest*. 93: 391-396, 1994.

31. Lee S.H., P. Soyoola, S. Chanmugam, W. Hart, W. Sun, H. Zhong, S. Liou, D. Simmons, und D. Hwang. Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem*. 267: 25934-25938, 1992.

32. Morham S.G., R. Langenbach, C.D. Loftin, H.F. Tiano, N. Vouloumanos, J.C. Jennette, J.F. Mahler, K.D. Kluckman, A. Ledford, C.A. Lee, und O. Smithies. Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell* 83: 473-482, 1995.

33. Sorli C.H., H.-J. Zhang, M.B. Armstrong, R.V. Rajotte, J. Maclouf, und R.P. Robertson. Basal expression of cyclooxygenase-2 and nuclear factor-interleukin 6 are dominant and coordinately regulated by interleukin 1 in the pancreatic islet. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 95: 1788-1793, 1998.

34. Kaufmann W.E., P.F. Worley, J. Pegg, M. Bremer, und P. Isakson. Cox-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 93: 2317-2321, 1996.

35. Ermert L., M. Ermert, M. Goppelt-Struebe, D. Walmrath, F. Grimminger, W. Streudel, H.A. Ghofrani, C. Homberger, H.-R. Duncker, und W. Seeger. Cyclooxygenase isoenzyme localization and mRNA expression in rat lungs. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 18(4): 479, 1998.

36. Ermert L., M. Ermert, H.-R. Duncker, F. Grimminger, und W. Seeger. In situ localization and regulation of thromboxane A(2) synthase in normal and LPS-primed lungs. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol*. 278(4): L744-L753, 2000.

37. Ermert L., und M. Ermert. The role of prostanoids in lung physiology and pathology. *Recent Res. Devel. Physiol*. 2: 567-582, 2004.

38. Ermert M., D. Kuttner, N. Eisenhardt, Ch. Dierkes, W. Seeger, und L. Ermert. Cox-2 and thromboxane-dependent vascular and bronchial responses are regulated via p38 mitogen-activated protein kinase in control and endotoxin-primed rat lungs. *Lab. Invest.* 83: 333-347, 2002.

39. Walmrath D., H.A. Ghofrani, S. Rosseau, H. Schütte, A. Cramer, W. Kaddus, F. Grimminger, S. Bhakdi, und W. Seeger. Endotoxin „priming“ potentiates lung vascular abnormalities in response to Escherichia coli hemolysin: an example of synergism between endo- and exotoxin. *J. Exp. Med*. 180: 1437-1443, 1994.

40. Suttorp N., Ch. Galanos, und H. Neuhof. Endotoxin alters arachidonate metabolism in pulmonary endothelial cells. *Am. J. Physiol*. 253: C384-C390, 1987.

41. Ermert M., M. Merkle, R. Mootz, F. Grimminger, W Seeger, und L. Ermert. Endotoxin priming of the cyclooxygenase-2-thromboxane axis in isolated rat lungs. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol*. 278: L1195-L1203, 2000.

42. Ermert L., M. Ermert, M. Merkle, M. Goppelt-Struebe, H.-R. Duncker, F. Grimminger, und W. Seeger. Rat pulmonary cyclooxygenase-2 expression in response to endotoxin challenge. Differential regulation in the various types of cells in the lung. *Am. J. Pathol*. 156(4): 1275, 2000.

43. Ermert L., M. Ermert, A. Althoff,M. Merkle, F. Grimminger, und W. Seeger. Vasoregulatory prostanoid generation proceeds via cyclooxygenase-2 in noninflamed rat lungs. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 286: 1309-1314, 1998.

44. Pugin J., C.-C. Schürer-Maly, D. Leturcq, A. Moriarty, R.J. Ulevitch, und P.S. Tobias. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 90: 2744-2748, 1993.

45. Tobias P.S., K. Soldau, und R.J. Ulevitch. Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein. *J. Biol. Chem.* 264: 10867-10871, 1989.

46. Wright S.D., R.A. Ramos, P.S. Tobias, R.J. Ulevitch, und J.C.Mathison. CD 14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein. *Science*, 249: 1431-1433, 1990.

47. Frey E.A., D.S. Miller, T.G. Jahr, A. Sundan, V. Bazil, T. Espevik, B.B. Finlay, und S.D. Wright. Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. J. Exp. Med. 176: 1665-1671, 1992.

48. Yang R.B., M.R. Mark, A. Gray, A. Huang, M.H. Xie, M. Zhang, A. Goddard, W.I. Wood, A.L. Gurney, und P.J. Godowski. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signaling. *Nature* 395: 284-288, 1988.
49. Hirschfeld M., C.J. Kirschning, R. Schwandner, H. Wesche, J.H. Weis, R.M. Wooten, und J.J. Weis. Cutting edge: inflammatory signaling by borrelia burgdorferi lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. *J. Immunol*. 163: 2382-2386, 1999.
50. Takeuchi O., A. Kaufmann, K. Grote, T. Kawai, K. Hoshino, M. Morr, P.F. Muhlradt, und S. Akira. Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J. Immunol.* 164: 554-557, 2000.
51. Ulevitch R.J. Toll gates for pathogen selection. *Nature* 401: 755-756, 1999.
52. Takeuchi O., K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takata, T. Ogawa, K. Takeda, und S. Akira. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11: 443-451, 1999.
53. Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *J. Biochem.* 351: 289-305, 2000.
54. Ip Y.T., und R.J. Davis. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)-from inflammation to development. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10: 205-219, 1998.
55. Lewis T.S., P.S. Shapiro, und N.G. Ahn. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv. Cancer. Res.* 74: 49-139, 1998.
56. Sen R., und D. Baltimore. Multible nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46: 705-16, 1986.
57. Newton R., L.M.E. Kuitert, M. Bergmann, I.M. Adcock, und P.J. Barnes. Evidence for involvement of NF-κB in the transcriptional control of COX-2 gene expression by IL-1β. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 237: 28, 1997.

58. Chen C.-C., Y.-T. Sun, J-J Chen, und Y.-J.Chang. Tumor necrosis factor-α-induced cyclooxygenase-2 expression via sequential activation of ceramide-dependent mitogen-activated protein kinases, and IκB kinases 1/2 in human alveolar epithelial cells. *Mol. Pharmacol*. 59(3): 493, 2001.

59. Blackwell T.S., und J.W. Christman. The role of nuclear factor-κB in cytokine gene regulation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 17: 3, 1997.

60. Tak P.P., und G.S. Firestein. NF-κB: a key role in inflammatory diseases. *J. Clin. Invest.* 107: 7-11, 2001.

61. Barkett, M., und T.D. Gilmore. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 18: 6910-6924, 1999.

62. Baeuerle P.A., und D. Baltimore. Activation of DNA-binding acticity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor. *Cell* 53: 211-217, 1988.

63. Baeuerle P.A., und D. Baltimore. I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science* 242: 540-546, 1988.

64. Baldwin A.S. Jr. The NF-κB and IκB proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol*. 14: 649-683, 1996.

65. Chen F., V. Castranova, X. Shi, und L.M. Demers. New insights into the role of nuclear factor-κB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin. Chem*. 45: 7-17, 1999.

66. Phelps C.B., L.-L. Sengchanthalangsy, S. Malek, und G. Gosh. Mechanism of κB binding by Rel/NF-κB dimers. *J. Biol. Chem.* 275(32): 24392, 2000.

67. Christman J.W., R.T. Sadikot, und T.S. Blackwell. The role of nuclear factor-κB in pulmonary diseases. *Chest* 117: 1482, 2000.

68. Lawrence T., D.W. Gilroy, P.R. Colville-Nash, und D.A. Willoughby. Possible new role for NF-κB in the resolution of inflammation. *Nature* 7(12): 1291, 2001.

69. Beg A. A., und A.S. Baldwin Jr. The IκB proteins: multifunctional regulators of the Rel/NF-κB transcription factors. *Genes Dev*. 7: 2064-2070, 1993.

70. Gosh S., und D. Baltimore. Activation in vitro of NF-κB by phosphorylation of its inhibitor IκB. *Nature* 344: 678, 1990.

71. Karin M., und Y. Ben-Neriah. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-κB activity. *Ann. Rev. Immunol*. 18: 621-663, 2000.

72. Gosh S., M.J. May, und E.B. Kopp. NF-κB and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 19: 225-260, 1998.

73. Sun S.C., P.A. Ganchi, D.W. Ballard, und W.C. Green. NF-κB controls expression of inhibitor IκBα. Evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* 259: 1405-1418, 1993.

74. Suyang H., R. Phillips, I. Douglas, und S. Ghosh. Role of unphosphorylated, newly synthesized IκBβ in persistent activation of NF-κB. *Mol. Cell Biol*. 16: 5444-5449, 1996.

75. Phal HL. Activators and targets genes of Rel/NF-κB transcription factors. *Oncogene* 18: 6853-6866, 1999.

76. DiDonato J.A., M. Hayakawa, D.M. Rotwarf, E. Zandi, und M. Karin. A cytokine-responsive IκB kinase that activates the transcription factor NF-κB. *Nature* 388: 548-554, 1997.

77. Mercurio F., H. Zhu, B.W. Murray, A. Shevchenko, B.L. Bennet, J.W. Li, D.B. Young, M. Barbosa, M. Mann, A. Manning, und A. Roa. IKK-1 and IKK-2: cytokine activated IκB kinases essential for NF-κB activation. *Science* 278: 860-866, 1997.

78. Zandi E., D.M. Rotwarf, M. Delhase, und M. Karin. The IκB kinase komplex (IKK) contains two kinase subunits, IKKα and IKKβ, necessary for IκB phosphorylation and NF-κB activation. *Cell* 91: 243-252, 1997.

79. Rothwarf D.M., E. Zandi, G. Natoli, und M. Karin. IKKγ is an essential regulatory subunit of the IκB kinase complex. *Nature* 395: 297-300, 1998.

80. Yamoka S., G. Courtois, C. Bessia, S.T. Whiteside, R. Weil, F. Agou, H.E. Kirk, R.J. Jay, und A. Israel. Complementation cloning of NEMO, a component of the IκB kinase complex essential for NF-κB activation. *Cell* 93: 1231-1240, 1998.

81. Huynh Q.K., N. Kishore, S. Mathialagan, A.M. Donnelly, und C.S. Tripp. Kinetic mechanisms of IκB-related kinases (IKK) inducible IKK and TBK-1 differ from IKK1/IKK-2 heterodimer. *J. Biol. Chem*. 277(12): 12550-12558, 2002.

82. Li Z.W., W. Chu, Y. Hu, M. Delhase, T. Deerinck, M. Ellisman, R. Johnson, und M. Krin. The IKKβ subunit of IκB kinase (IKK) is essential for NF-κB activation and prevention of apoptosis. *J. Exp. Med.* 189: 1839-1845, 1999.

83. Tanaka M., M.E. Fuentes, K. Yamaguchi, M.H. Dumin, S.A. Dalrymple, K.L. Hardy, und D.V. Goeddel. Embryonic lethality, liver degeneration, and impaired NF-κB activation in IKKβ-deficient mice. *Immunity* 10: 421-429, 1999.

84. Mercurio F., und A.M. Manning. Multiple signals converging on NF-κB. *Curr. Opin. Cell Biol*. 11: 226-232, 1999.

85. Shimada T., T. Kawai, K. Takeda, M. Matsumoto, J.-I. Inoue, Y. Tatsumi, A. Kanamaru, und S. Akira. IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to IκB kinases. *Int. Immunol*. 8: 1357-1362, 1999.

86. Peters R.T., S.M. Liao, und T. Maniatis. IKKε is a part of a novel PMA-inducible IκB kinase complex. *Mol. Cell* 5: 513-522, 2000.

87. Aupperle K.R., Y. Yamanishi, B.L. Bennett, F. Mercurio, D.L. Boyle, und G.S. Firestein. Expression and regulation of inducible IκB kinase (IKK-i) in human fibroblast-like synoviocytes. *Cell Immunol*. 214: 54, 2001.

88. Delhase M., M. Hayakawa, Y. Chen, und M. Karin. Positive and negative regulation of IκB kinase activity through IKKβ subunit phosphorylation. *Science* 284: 309-313, 1999.

89. Tojima Y., A. Fujimoto, M. Delhase, Y. Chen, S. Hatakeyama, K. Nakayama, Y. Kaneko, Y. Nimura, N. Motoyama, K. Ikeda, M. Karin, und M. Nakanishi. NAK is an IκB kinase-activating kinase. *Nature* 404: 778-782, 2000.

90. Wang C., L. Deng, M. Hong, G.R. Akkaraju, J. Inoue, und Z.J. Chen. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412: 346-351, 2001.

91. Gosh S., M.J. May, und E.B. Kopp. NF-κB and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16: 225-260, 1998.

92. Chen F., V. Castranova, und X. Shi. New insights into the role of nuclear factor-κB in cell growth regulation. *Am. J. Pathol*. 159: 387-397, 2001.

93. Makarov S.S. NF-κB as a therapeutic target in chronic inflammation: recent advances. *Mol. Med. Today* 9: 441-448, 2000.

94. Fan J., R.D. Ye, und A.B. Malik. Transcriptional mechanisms of acute lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol*. 281: L1037-L1050, 2001.

95. Baeuerle P. A., und T. Henkel. Function and activation of NF-κB in the immune system. *Ann. Rev. Immunol*. 12: 141-179, 1994.

96. Barnes P. J., und M. Karin. Nuclear factor-κB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *New Engl. J. Med.* 336: 1066-1071, 1997.

97. Seeger W., D. Walmrath, F. Grimminger, S. Rosseau, H. Schütte, H.-J. Krämer, L. Ermert, und L. Kiss. Adult respiratory distress syndrome: model systems using isolated perfused rabbit lungs. *Methods Enzymol*. 233: 549-584, 1994.

98. Lunde P.K.M. und B.A. Waaler. Transvascular fluid balance in the lung*. J. Physiol.* 205: 1-18, 1969.

99. Wangensteen D., E. Lysaker, und P. Savaryn. Pulmonary capillary filtration and reflection coefficients in the adult rabbit. *Microvasc. Res*. 14: 81-97, 1977.

100. Drake R., K.A. Gaar, und A.E. Taylor. Estimation of the filtration coefficient of pulmonary exchange vessels. *Am. J. Physiol*. 234: 266-274, 1978.

101. Gaar K.A., A.E. Taylor, L.J. Owens, und A.C. Guyton. Pulmonary capillary pressure and filtration coefficient in the isolated perfused lung. *Am. J. Physiol*. 213: 910-914, 1967.

102. Hakim T.S., K. Sugimori, und L. Ferrario. Analysis of the double occlusion which provides four pressure gradients. *Eur. Respir. J*. 9: 2578, 1996.

103. Maarek J.-M.I., T.S. Hakim, und H.K. Chang. Analysis of pulmonary arterial pressure profile after occlusion of pulsatile blood flow. *J. Appl. Physiol*. 68(2): 761, 1990.

104. Schütte H., S. Rousseau, R. Czymek, L. Ermert, D. Walmrath, H.J. Krämer, W. Seeger, und F. Grimminger. Synergism between endotoxin priming and exotoxin challenge in provoking severe vascular leakage in rabbit lungs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 156: 812-824, 1997.

105. Moncada S., und J.R. Vane. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A_2, and prostacyclin. *Pharmacol. Rev.* 30: 293-331, 1979.

106. Chen B.-C., Y.-H. Chen, und W.-W. Lin. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 expression in J774 macrophages. *Immunology* 97: 124, 1999.

107. Hwang D., B.C. Jang, G. Yu, und M. Bourdreau. Expression of mitogen-inducible cyclooxygenase induced by lipopolysaccaride. Mediation through both mitogen-activated protein kinase and NF-κB signaling pathways in macrophages. *Biochem. Pharmacol*. 54: 87, 1997.

108. Porter D.W., J. Ye, J. Ma, M. Bargner, V.A. Robinson, D. Ramsey, J. McLaurin, A. Khan, D. Landsittel, A. Teass, und V. Castranova. Time course of pulmonary response of rats to inhalation of crystalline silica: NF-kappa B activation, inflammation, cytokine production and damage. *Inhal. Toxicol.* 14(4): 349, 2002.

109. Known S., R.L. Newcomb, und S.C. George. Mechanisms of synergistic cytokine-induced nitric oxide production in human alveolar epithelial cells. *Nitric Oxide* 5(6): 534, 2001.

110. Adams V., B. Nehrhoff, U. Spate, A. Linke, P.C. Schulze, A. Baur, S. Gielen, R. Hambrecht, und G. Schuler. Induction of iNOS expression in skeletal muscle by IL-1beta and NFkappaB activation: an in vitro and in vivo study. *Cardiovasc. Res.* 54(1): 95, 2002.

111. Pierce J.W., R. Schoenleber, G. Jesmok, J. Best, S.A. Moore, T. Collins, und M.E. Gerritsen. Novel inhibitors of cytokine-induced IkBα phosphorylation and

endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *J. Biol. Chem.* 272(34): 21096, 1997.

112. Bannermann D.D., und S.E. Goldblum. Direct effects of endotoxin on the endothelium: barrier function and injury. *Lab. Invest*. 79: 1181-1199, 1999
113. Deveaux S., S. Cohen-Kaminsky, R.A. Shivdasani, N.C. Andrews, A. Filipe, I. Kuzniak, S.H. Orkin, P.-H. Romeo, und V. Mignotte. p45 NF-E2 regulates expression of thromboxane synthase in megakaryocytes. *EMBO J*. 16(18): 5654, 1997.
114. Naraba H., C. Yokoyama, N. Tango, M. Murakami, I. Kudo, M. Fueki, S. Oh-ishi, und R. Tanabe. Transcriptional regulation of the membrane-associated prostaglandin E2 synthase gene. Essential role of the transcriptional factor Egr-1. *J. Biol. Chem*. 277(32): 28601, 2002.
115. Uhlig S., R. Nüsing, A. von Bethmann, R.L. Featherstone, T. Klein, F. Brasch, K.M. Müller, V. Ullrich, und A. Wendel. Cyclooxygenase-2-dependent bronchoconstriction in perfused rat lungs exposed to endotoxin. *Mol. Med*. 2: 373-383, 1996.
116. von Knethen A., D. Callsen, und B. Brüne. NF-κB and AP-1 activation by nitric oxide attenuated apoptotic cell death in RAW 264.7 macrophages. *Mol. Biol. Cell* 10: 361, 1999.
117. Kirtikara K., R. Raghow, S.J. Laulederkind, S. Goorha, T. Kanekura, und L.R. Ballou. Transcriptional regulation of cyclooxygenase-2 in the human microvascular endothelial cell line, HMEC-1: control by the combinatorial actions of AP2, NF-IL-6 and CRE elements. *Mol. Cell Biochem*. 203 (1-2): 41, 2000.
118. Miller C., M. Zhang, Y. He, J. Zhao, J.-P. Pelletier, J. Martel-Pelletier, und J.A. Di Battista. Transcriptional induction of cyclooxygenase-2 gene by okadaic acid inhibition of phosphatase activity in human chondrocytes: Co-stimulation of AP-1 and CRE nuclear binding proteins. *J. Cell Biochem*. 69(4): 392, 1998.
119. Grimminger F., H. Wahn, H.-J. Krämer, J. Stevens, K. Mayer, D. Walmrath, und W. Seeger. Impact of arachidonic versus eicosapentaenoic acid on

exotoxin-induced lung vascular leakage: relation to 4-series versus 5-series leukotriene generation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 155: 513-519, 1997.

120. Walmrath D., U. Schneider, B. Kreusler, F. Grimminger, M. Ennis, und W. Seeger. Intravascular anti-IgE challenge in perfused lungs: mediator release and vascular pressor response. *J. Appl. Physiol*. 71: 2499-2506, 1991.
121. Greenberg S., C McGowan, und T.M. Glenn. Pulmonary vascular smooth muscle function in porcine splanchnic occlusion shock. *Am. J. Physiol*. 241: H34-H44, 1981.
122. Townsley M.I., R.J. Korthuis, und A.E. Taylor. Effects of arachidonate on permeability and resistance distributation in canine lungs. *J. Appl. Physiol*. 58: 206-210, 1985.
123. Yoshimura K., M.L. Tod, K.G. Pier, und L.J. Rubin. Role of venoconstriction in thromboxane-induced pulmonary hypertension und edema in lambs. *J. Appl. Physiol.* 66: 929-935, 1989.
124. Anderson R.R., und R.L. Holliday. Documentation of pulmonary capillary permeability in the adult respiratory distress syndrome accompanying human sepsis. *Am. Rev. Resp. Dis*. 119: 869-877, 1979.
125. Ermert L., H.-R. Duncker, H. Brückner, F. Grimminger, T. Hansen, R. Rössig, K. Aktories, und W. Seeger. Ultrastructural changes of lung capillary endothelium in response to botulinum C2 toxin. *J. Appl. Physiol.* 82(2): 382, 1997.
126. Ermert L., H. Brückner, D. Walmrath, F. Grimminger, K. Aktories, N. Sutorp, H.-R. Duncker, und W. Seeger. Role of endothelium cytoskeleton in high-permeability edema due to botulinum C2 Toxin in perfusated rabbit lungs. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol*. 268 (12): L753-L761, 1995.
127. Suttorp N., T. Hessz, W. Seeger, A. Wilke, R. Koob, F. Lutz, und D. Drenckhahn. Adenosine diphosphate-ribosylation of G-actin by botulinum C2 toxin increases endothelial permeability. *J. Clin. Invest*. 87: 1575, 1991.
128. Franke R.P., M. Grafe, H. Schnittler, D. Seiffge, C. Mittermayer, und D. Drenckhahn. Induction of human vascular endothelial stress fibres by fluid shear stress. *Nature* 307(5952): 648, 1984.

129. Schnittler H.-J., A. Wilke, T. Gress, N. Suttorp, und D. Drenckhahn. Role of actin and myosin in the control of paracellular permeability in pig, rat and human vascular endothelium. *J. Physiol. Lond.* 431: 379, 1990.
130. Schnittler H.J., S.W. Schneider, H. Raifer, F. Luo, P. Dietrich, I. Just, und K. Aktories. Role of actin filaments in endothelial cell-cell adhesion and membrane stability under fluid shear stress. *Pflügers Arch.* 442: 675, 2001.
131. Seebach J., P. Dietrich, F. Luo, H. Schillers, D. Vestweber, H. Oberleithner, H.-J. Galla, und H.-J. Schnittler. Endothelial barrier function under laminar shear stress. *Lab. Invest*. 80(12): 1819, 2000.
132. Malek A., und S. Izumo. Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodeling in response to fluid shear stress. *J. Cell Sci*. 109: 713, 1996.
133. Aktories K., und A. Wegner. ADP ribosylation of actin by clostridial toxins. J. Cell Biol. 109: 1385, 1989.
134. Wegner A., und K. Aktories. ADP-ribosylated actin caps the barbed ends of actin filaments. *J. Biol. Chem*. 263: 13739, 1988.
135. Are A.F., V.E. Galkin, T.V. Pospelova, und G.P. Pinaev. The p65/RelA subunit of NF-κB interacts with actin-containing structures. *Exp. Cell Res*. 256: 533, 2000.
136. Nagel T., N. Resnick, C.F. Dewey, und M.A. Gimbrone. Vascular Endothelial cells respond to spatial gradients in fluid shear stress by enhanced activation of transcription factors. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol*. 19: 1825, 1999.
137. Anzueto A., R.P. Baughman, K.K. Guntupalli, J.G. Weg., H.P. Wiedemann, A.A. Raventos, F. Lemaire, W. Long, D.S. Zaccardelli, und E.N. Pattishall. Aerosolized surfactant in adults with sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. Exosurf Acute Respiratory Distress Syndrome Sepsis Study Group. *N. Engl. J. Med*. 334: 1417-1421, 1996.
138. Dellinger R.P., J.L. Zimmermann, R.W. Taylor, R.C. Straube, D.L. Hauser, G.J. Criner, K. Davis Jr., T.M. Hyers, und P. Papadakos. Effects of inhaled nitric oxide in patients with acute respiratory distress syndrome:results of a

randomised phase II trial. Inhaled Nitric Oxid in ARDS Study Group. *Crit. Care Med.* 26: 15-23. 1998.

139. Bone R.C., G. Slotman, R. Maunder, H. Silverman, T.M. Hyers, M.D. Kerstein, und J.J. Ursprung. Randomized double-blind, multicenter study of prostaglandin E1 in patients with adult respiratory distress syndrome. Prostaglandin E1 Study Group. *Chest* 96: 114-119, 1989.
140. Walmrath D., T. Schneider, R. Schermuly, H. Olschewski, F. Grimminger, und W. Seeger. Direct comparison of inhaled nitric oxide and aerosolized prostacyclin in acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153: 991-996, 1996.
141. Bone R.C., C.J. Fisher Jr., T.P. Clemmer, G.J. Slotman, C.A. Metz, und R.A. Balk. A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N. Engl. J. Med*. 317: 653-658, 1987.
142. Soler A.P., C.W. Marano, M. Bryans, R.D. Miller, L.A. Garulacan, S.K. Mauldin, T.D. Stamato, und J.M. Mullin. Activation of NF-kappaB is necessary for the restoration of the barrier function of an epithelium undergoing TNF-alpha-induced apoptosis. *Eur. J. Cell Biol*. 78: 56-66, 1999.
143. Walmrath D., F. Grimminger, D. Pappert, C. Knothe, U. Obertacke, A. Benzing, A. Gunther, T. Schmehl, H. Leuchte, und W. Seeger. Bronchoscopic administration of bovine natural surfactant in ARDS and septic shock: imact on gas exchange and haemodynamics. *Eur. Respir. J.* 19(5): 787-9, 2002.
144. Spragg R.G., J.F. Lewis, H.D. Walmrath, J. Johannigman, G. Bellingan, P.F. Laterre, M.C. Witte, G.A. Richards, G. Rippin, F. Rathgeb, D. Hafner, F.J. Taut, und W. Seeger. Effect of recombinant surfactant protein C-based surfactant on the acute respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.* 351(9): 853-5, 2004.
145. Schermuly R.T., H. Leuchte, H.A. Ghofrani, N. Weissmann, F. Rose, M. Kohstall, H. Olschewski, C. Schudt, F. Grimminger, W. Seeger, und D. Walmrath. Zardaverine and aerosolised iloprost in a model of acute respiratory failure. *Eur. Respir. J*. 22(2): 32-7, 2003.

6 Anhang

6.1 Tabellen und Diagramme

Tab. 1

Vergleichende Gruppen mit und ohne Zusatz von 10.000 ng/ml LPS

∆PAP und ∆VP nach Gabe von 10 µM AA nach 120 Minuten. Versuchsreihen ohne Inhibitorzusatz, mit 10, 20 und 40 µM Inhibitorzugabe.

Gruppen	∆PAP				∆VP			
	BAY 11-7082		BAY 11-7085		BAY 11-7082		BAY 11-7085	
	[mmHg]	SEM	[mmHg]	SEM	[mmHg]	SEM	[mmHg]	SEM
Kein LPS								
Ohne Inhibitor	3,68	0,16			0,16	0,03		
Inhibitor 10 µM	4,13	0,55	4,68	0,68	0,54	0,18	0,25	0,03
Inhibitor 20 µM	4,08	0,28	3,66	0,40	1,14	0,46	0,30	0,07
Inhibitor 40 µM	0,90 **	0,10	3,13	0,28	0,70	0,41	0,25	0,10
10.000 ng/ml LPS								
Ohne Inhibitor	9,84	0,78			2,06	0,23		
Inhibitor 10 µM	8,01 *	0,39	7,95 *	0,64	2,33	0,12	1,76	0,53
Inhibitor 20 µM	6,06 ***	0,16	6,18 **	0,26	2,03	0,14	2,18	0,20
Inhibitor 40 µM	1,33 ***	0,28	4,30 ***	0,55	2,06	0,12	2,20	0,20

Tab. 2

Vergleichende Gruppen mit und ohne Zusatz von 10.000 ng/ml LPS

∆W im einstündigen Zeitraum nach Inhibitor-Gabe (60-120 min) und nach AA-Gabe nach 120 Minuten (120-130 min). Versuchsreihen ohne Inhibitorzusatz, mit 10, 20 und 40 µM Inhibitorzugabe.

Gruppen	∆W [60-120 min]				∆W [120-130 min]			
	BAY 11-7082		BAY 11-7085		BAY 11-7082		BAY 11-7085	
	[g]	SEM	[g]	SEM	[g]	SEM	[g]	SEM
Kein LPS								
Ohne Inhibitor	0,04	0,02			0,55	0,12		
Inhibitor 10 µM	0,31	0,04	0,26 *	0,09	1,79	0,55	2,08	0,76
Inhibitor 20 µM	0,61	0,06	0,56 ***	0,12	4,96 *	1,57	3,33 *	1,18
Inhibitor 40 µM	1,58 ***	0,68	0,75 ***	0,10	4,93 *	2,23	6,10 **	1,45
10.000 ng/ml LPS								
Ohne Inhibitor	0,21	0,01			4,85	1,25		
Inhibitor 10 µM	1,04 **	0,07	0,53 *	0,12	8,34 **	1,06	5,44	1,27
Inhibitor 20 µM	1,24 ***	0,11	1,05 ***	0,22	9,14 **	0,51	9,47 *	0,34
Inhibitor 40 µM	3,43 ***	0,57	1,10 ***	0,32	10,0 *	#	8,75	1,25

Signifikanter Unterschied zu den Versuchen ohne Inhibitorzusatz: * p<0,5;
** p<0,01;*** p<0,001
# Gewichtszuwachs > 10 g, kein SEM

Tab. 3

Kapillärer Druck (Pc) während venöser Druckerhöhung (VPE)

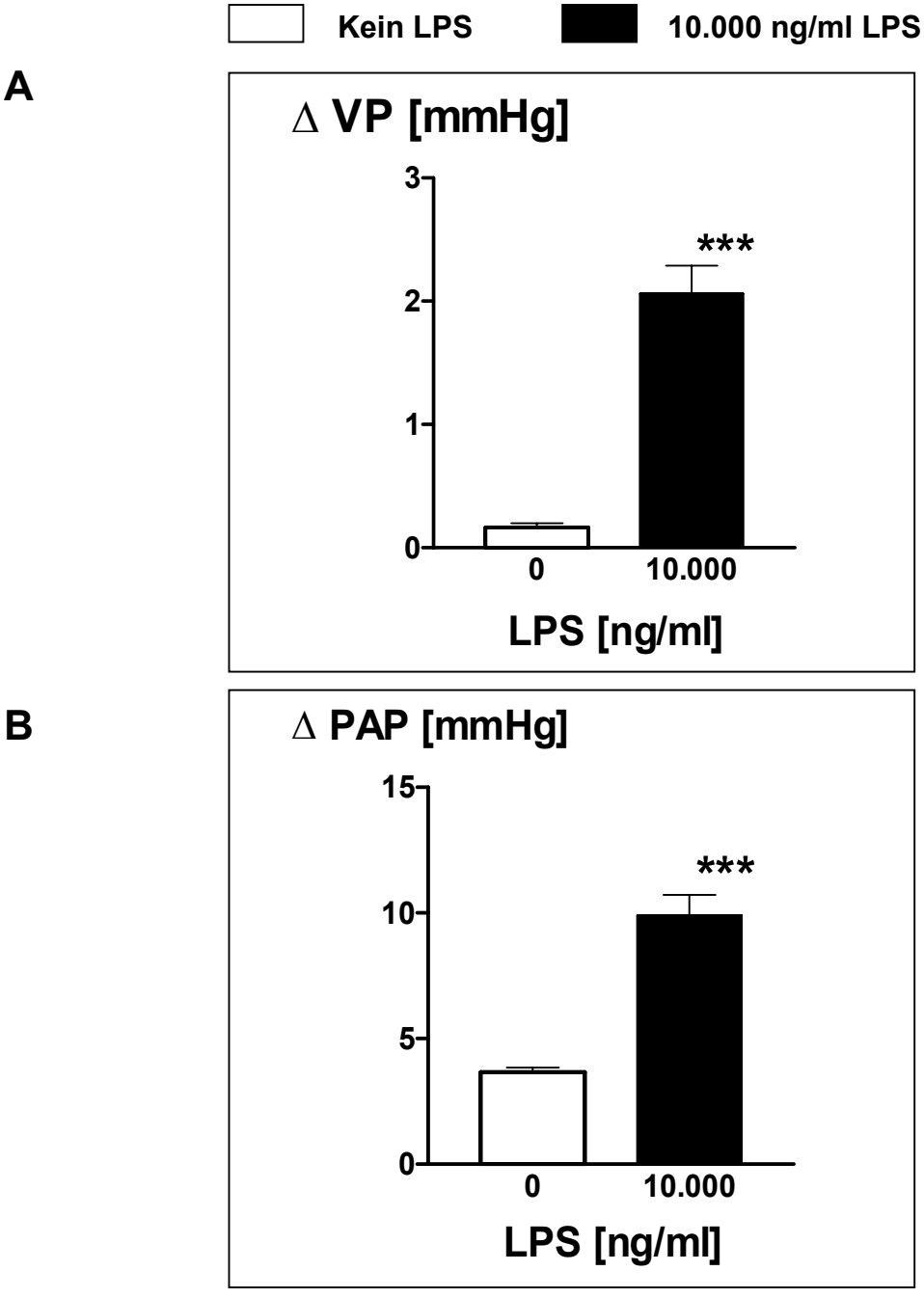
Vergleichende Gruppen mit und ohne Zusatz von 10.000 ng/ml LPS jeweils mit und ohne Zugabe des NF-κB-Inhibitors BAY 11-7082 in einer Konzentration von 20 µM.

Gruppen	Pc			
	1. VPE		2. VPE	
	[mmHg]	SEM	[mmHg]	SEM
Kein LPS				
Ohne Inhibitor	4,75	0,45	4,70	0,40
20 µM BAY 11-7082	4,32	0,20	3,80	0,07
10.000 ng/ml LPS				
Ohne Inhibitor	4,65	0,45	4,60	0,35
20 µM BAY 11-7082	4,00	0,27	4,20	0,42

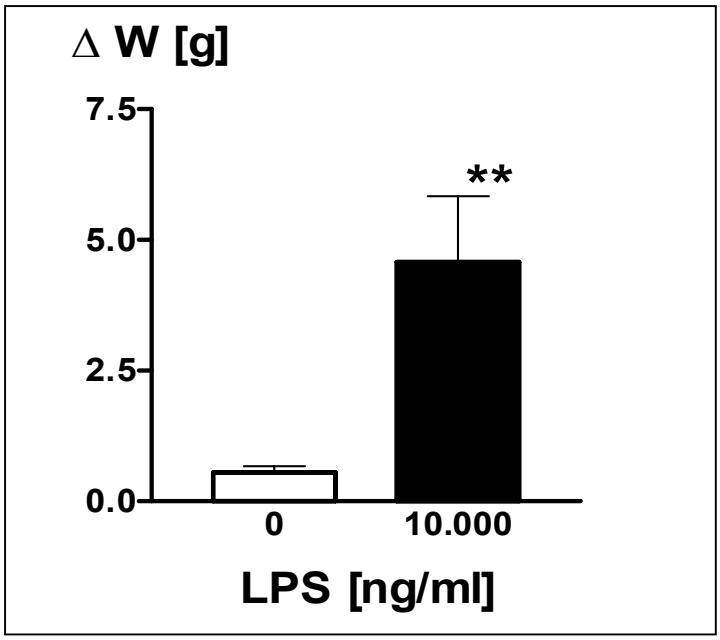
Abb. 1

∆PAP, ∆W und ∆VP unter LPS-Stimulation

∆PAP, ∆W und ∆VP nach Applikation von 10 µM AA. Kontrollversuche und Versuche stimuliert mit 10.000 ng/ml LPS.



C

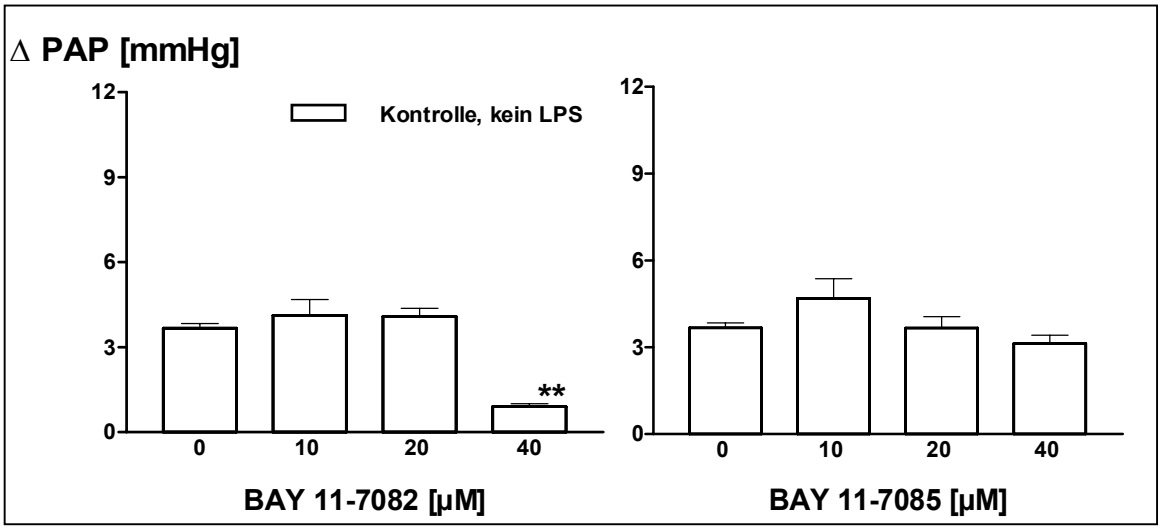


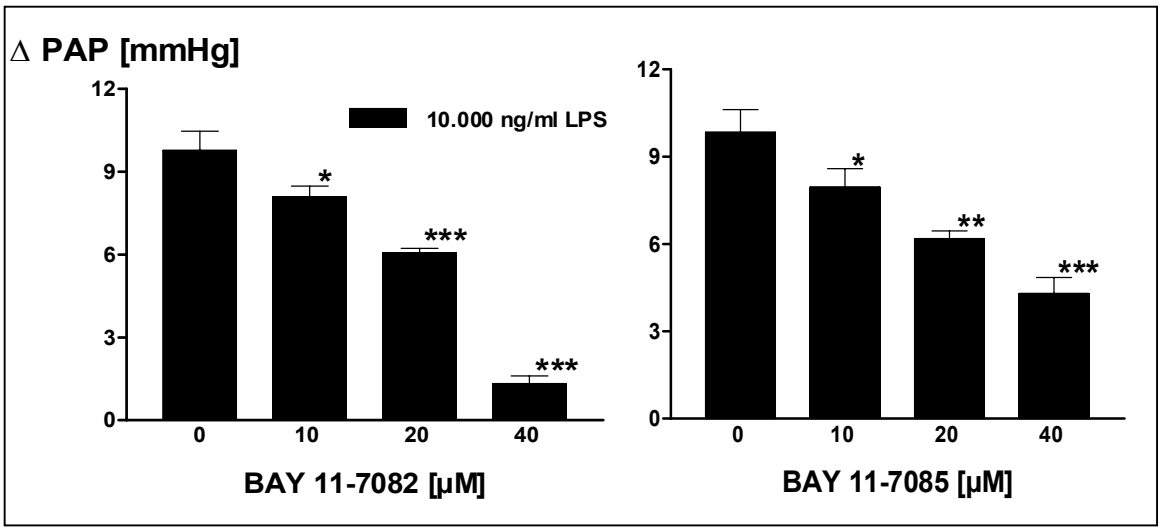
Signifikanter Unterschied zu den Kontrollversuchen ohne LPS: ** p<0,01;
*** p<0,001

Abb. 2

Inhibitor-Dosisabhängigkeit von ∆PAP

∆PAP 5 Minuten nach Applikation von 10 µM AA. Versuche ohne und mit Stimulation mit 10.000 ng/ml LPS unter Zusatz der NF-κB-Inhibitoren BAY 11-7082 und BAY 11-7085 in den Konzentrationen 10, 20 und 40 µM.





Signifikanter Unterschied zu den Versuchen ohne Inhibitorzusatz: * p<0,5;** p<0,01; *** p<0,001

Abb. 3

Inhibitor-Dosisabhängigkeit von ΔVP

ΔVP 5 Minuten nach Applikation von 10 µM AA. Versuche stimuliert mit 10.000 ng/ml LPS unter Zusatz der NF-κB-Inhibitoren BAY 11-7082 und BAY 11-7085 in den Konzentrationen 10, 20 und 40 µM.

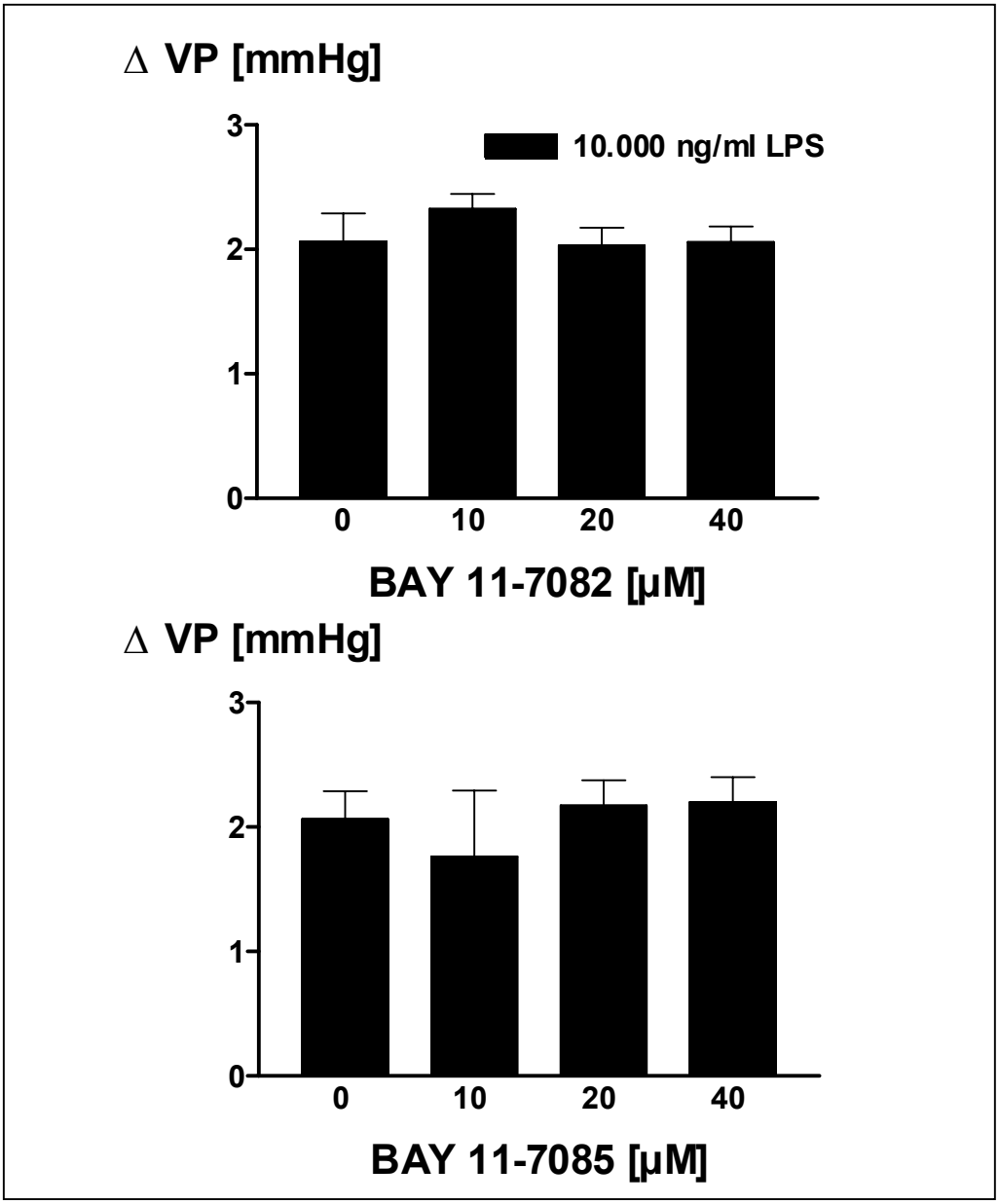
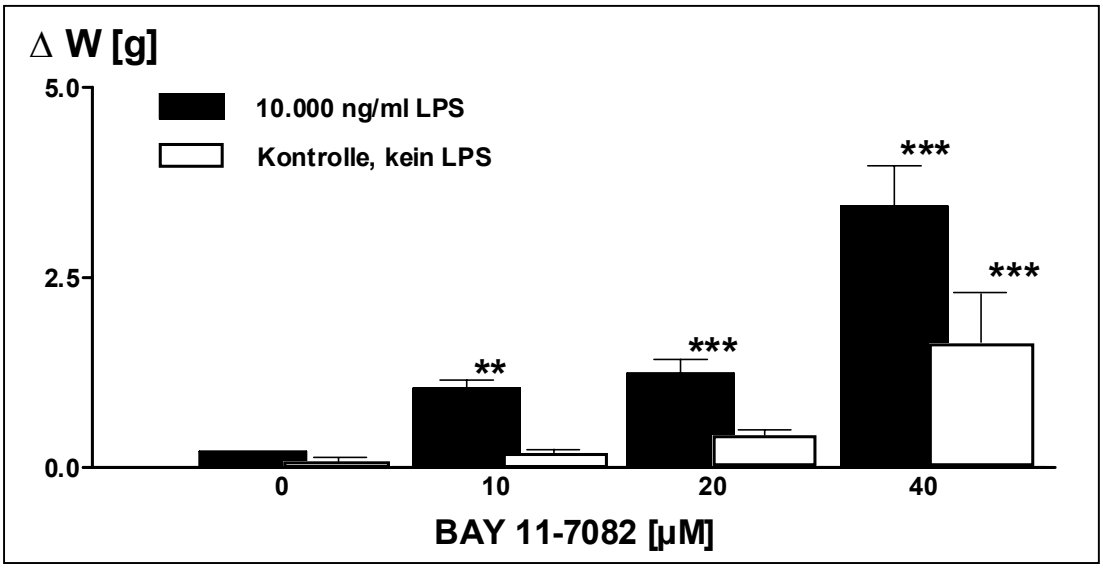


Abb. 4

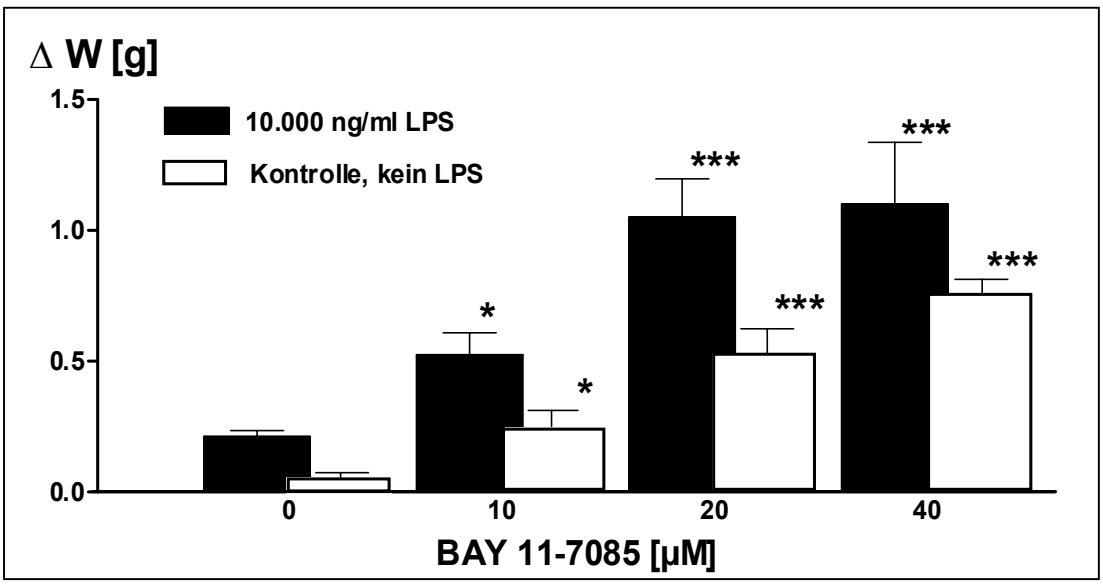
Dosisabhängiger Gewichtsanstieg nach NF-κB-Hemmung

Gewichtszuwachs (∆W) im einstündigen Perfusionszeitraum nach Zugabe der beiden NF-κB-Inhibitoren BAY 11-7085 und BAY 11-7082 in den Konzentrationen 10, 20 und 40 µM jeweils mit und ohne Stimulation mit 10.000 ng/ml LPS.

A



B

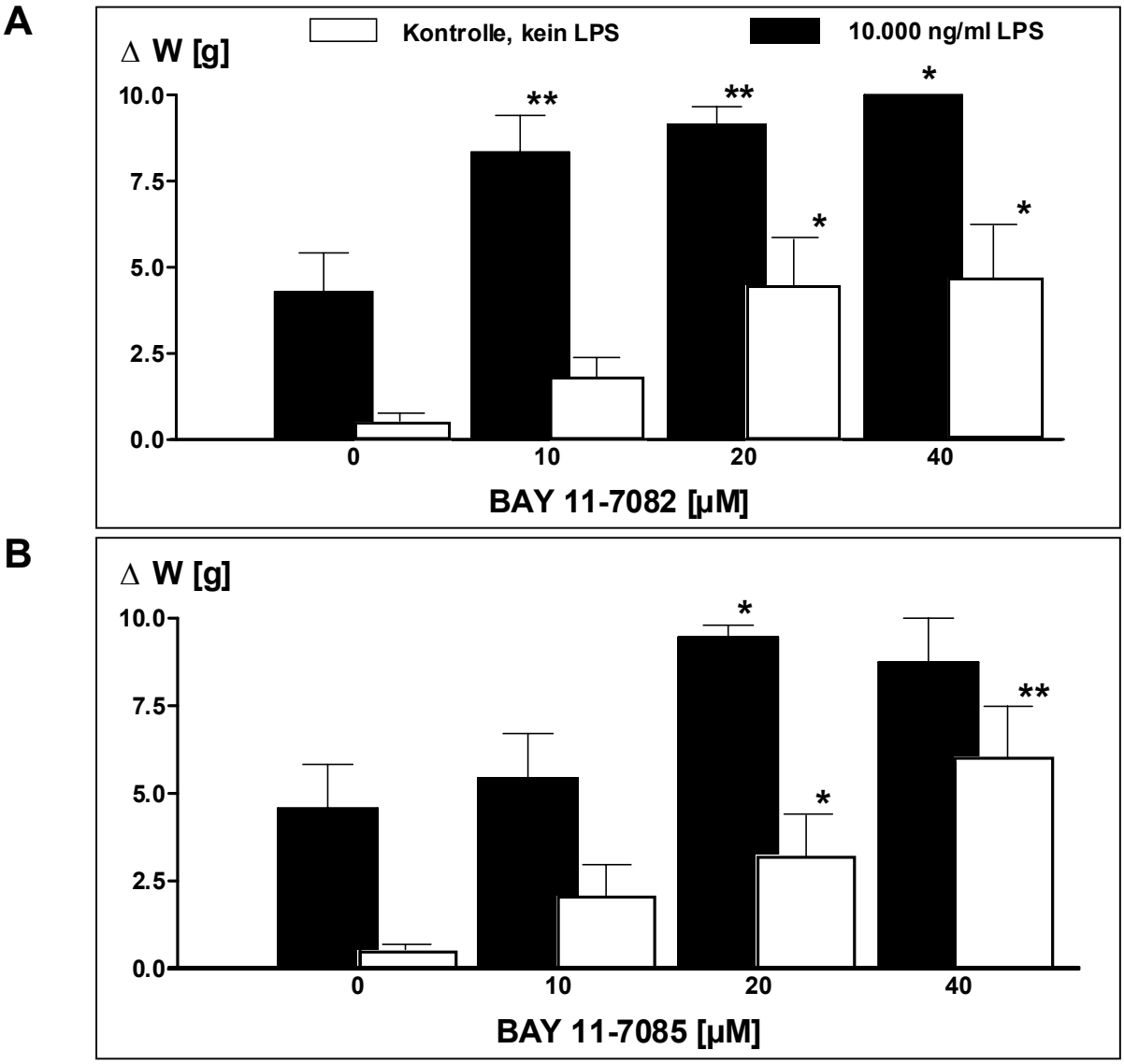


Signifikanter Unterschied zu den Versuchen ohne Inhibitorzusatz: * p<0,5; ** p<0,01; *** p<0,001

Abb. 5

Dosisabhängiger Gewichtsanstieg nach NF-κB-Hemmung

Gewichtszuwachs (∆W) 5 Minuten nach Applikation von 10 µM AA. Versuche ohne und mit Stimulation mit 10.000 ng/ml LPS unter Zusatz der NF-κB-Inhibitoren BAY 11-7082 und BAY 11-7085 in den Konzentrationen 10, 20 und 40 µM.

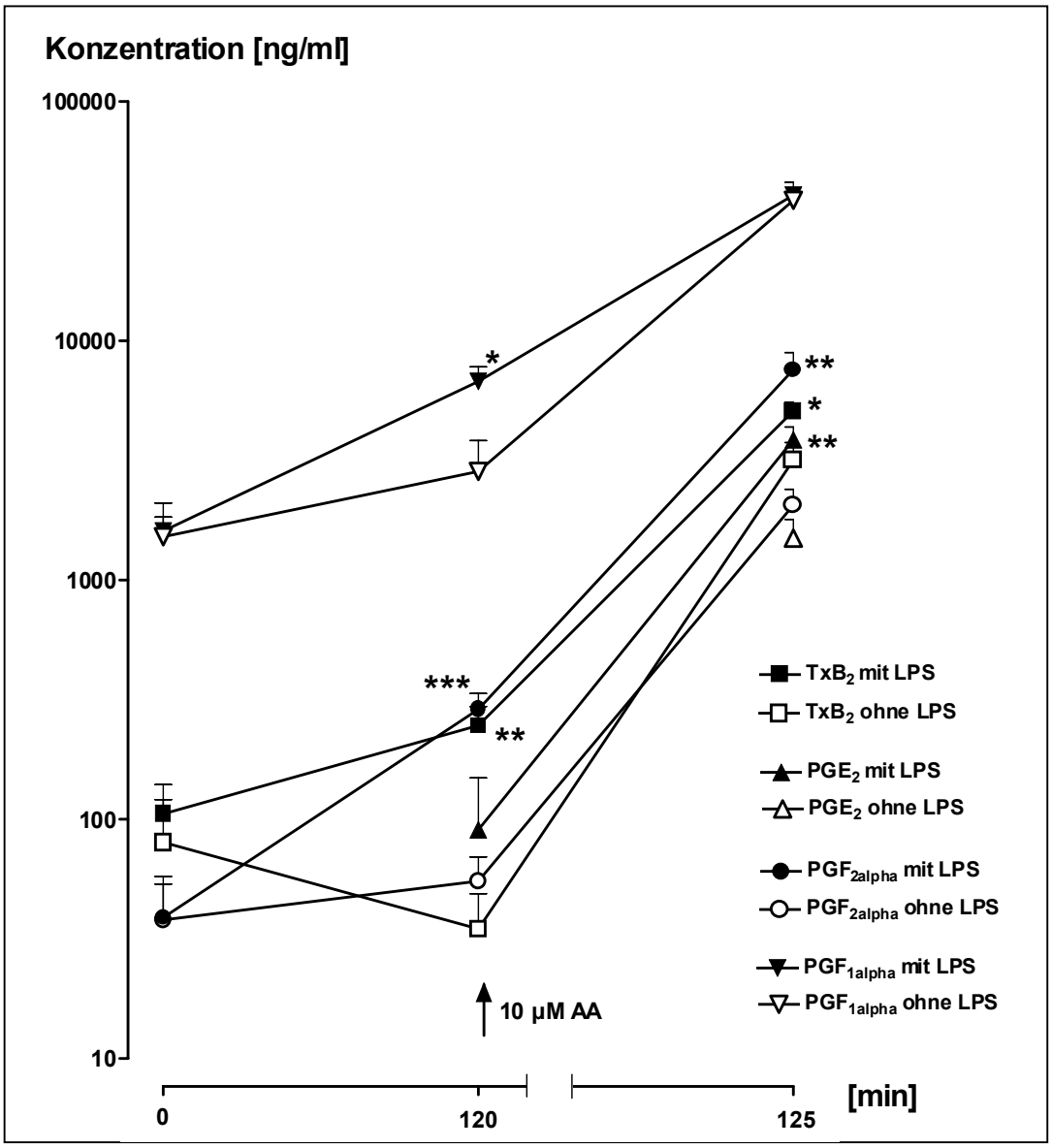


Signifikanter Unterschied zu den Versuchen ohne Inhibitorzusatz: * p<0,5;** p<0,01

Abb. 6

Wirkung der LPS-Stimulation auf die Prostanoidkonzentration

Perfusatkonzentrationen von TxB_2, 6-keto-PGF_{1alpha}, PGE_2 und PGF_{2alpha} zu Versuchsbeginnn, nach 120 Minuten Versuchslaufzeit, sowie 5 Minuten nach Applikation von 10 µM AA. Kontrollversuche und Versuche stimuliert mit 10.000 ng/ml LPS.



Signifikanter Unterschied zu den Kontrollversuchen ohne LPS: * p<0,5;** p<0,01; *** p<0,001

Abb. 7

Wirkung von NF-κB-Hemmung auf die TxB_2-Konzentration

Perfusatkonzentration von TxB_2 5 Minuten nach Applikation von AA. Versuche mit und ohne LPS-Stimulation unter Verabreichung verschiedener Konzentrationen des NF-κB-Inhibitors BAY 11-7082.

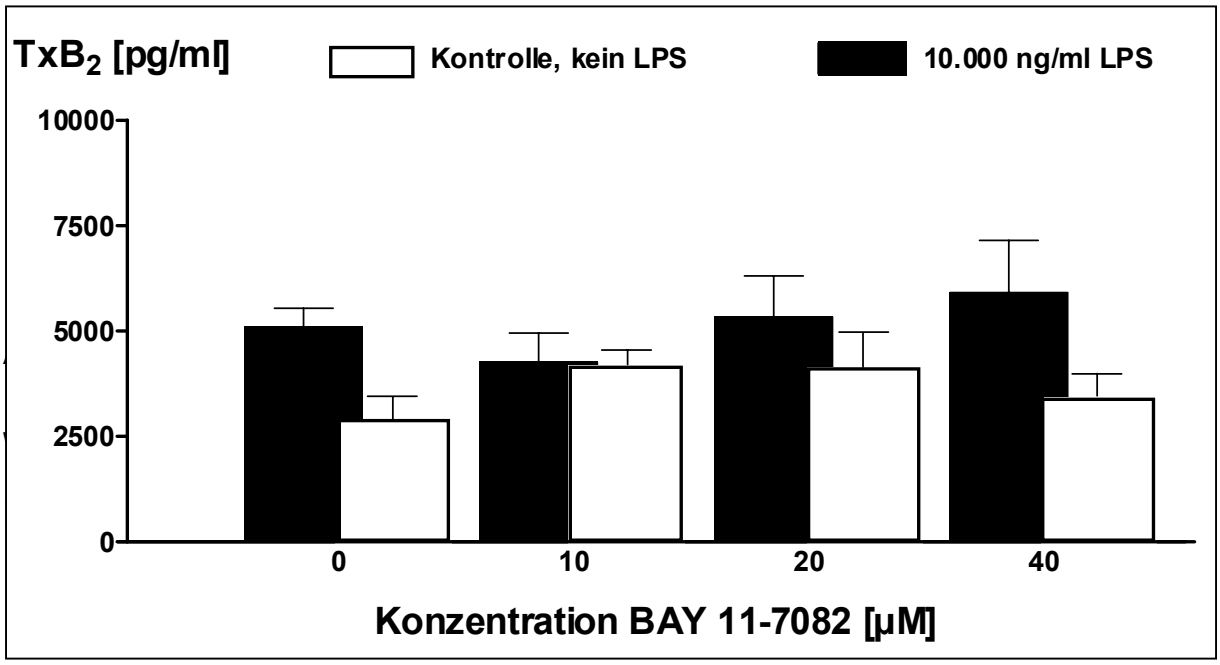


Abb. 8

Wirkung von NF-κB-Hemmung auf die PGE_2-Konzentration

Perfusatkonzentration von PGE_2 5 Minuten nach Applikation von 10 µM AA. Versuche mit und ohne LPS-Stimulation unter Verabreichung verschiedener Konzentrationen des NF-κB-Inhibitors BAY 11-7085.

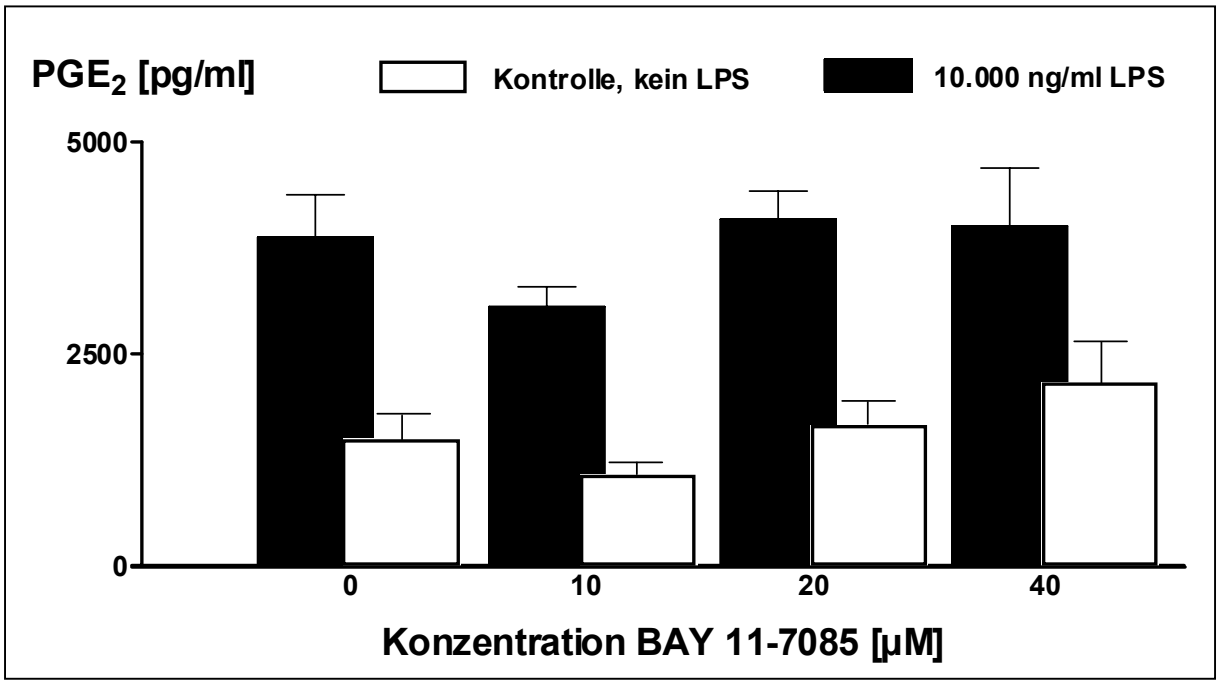
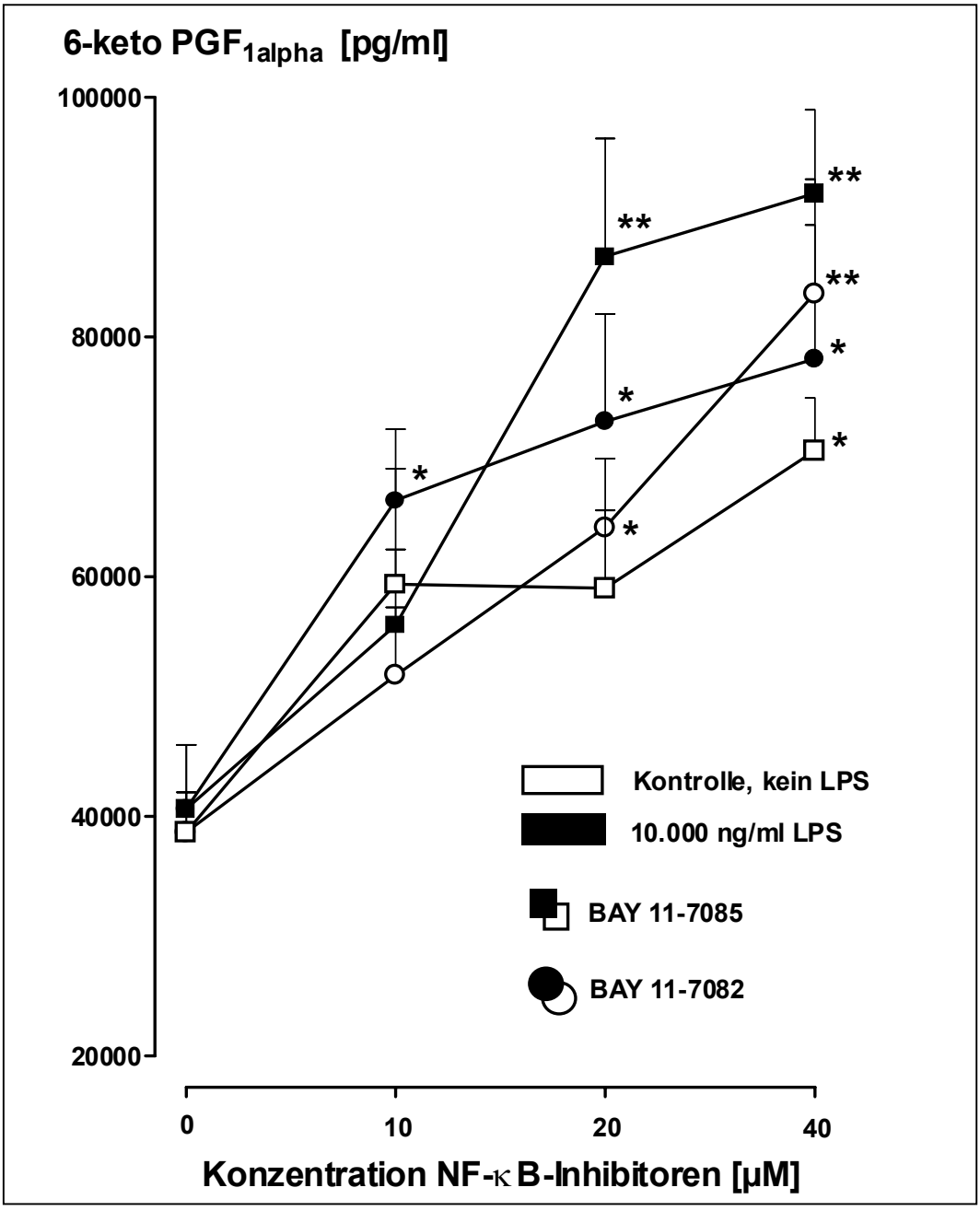


Abb. 9

Wirkung von NF-κB-Hemmung auf die 6-keto PGF_{1alpha}-Konzentration

Perfusatkonzentration von 6-keto PGF_{1alpha} 5 Minuten nach Applikation von AA. Versuche mit und ohne LPS-Stimulation unter Verabreichung verschiedener Konzentrationen der NF-κB-Inhibitoren BAY 11-7082 und BAY 11-7085.

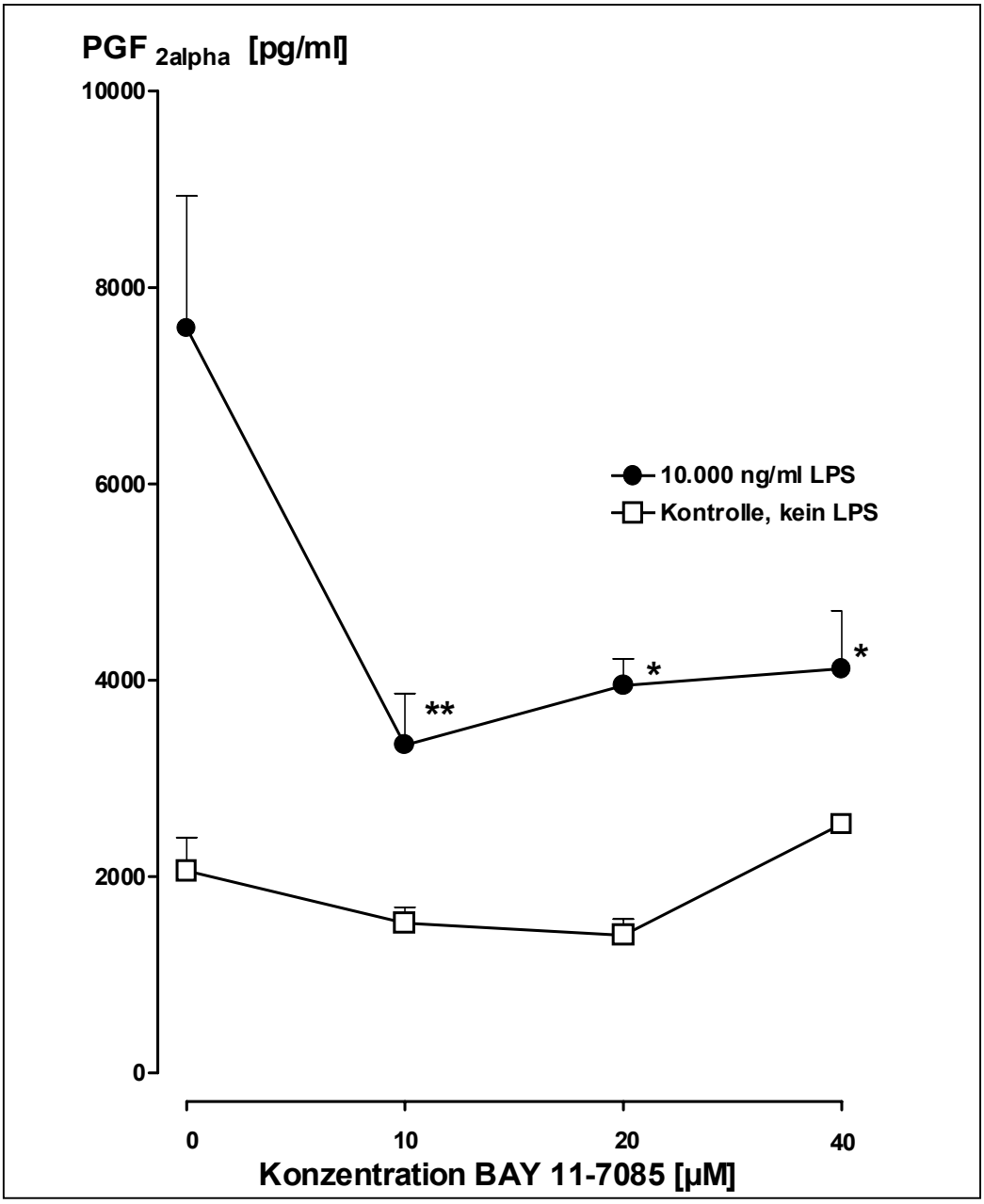


Signifikanter Unterschied zu den Versuchen ohne Inhibitorzusatz: * p<0,5;** p<0,01

Abb. 10

Wirkung von NF-κB-Hemmung auf die PGF_{2alpha}-Konzentration

Perfusatkonzentration von PGF_{2alpha} 5 Minuten nach Applikation von AA. Versuche mit und ohne LPS-Stimulation unter Verabreichung verschiedener Konzentrationen des NF-κB-Inhibitors BAY 11-7085 .



Signifikanter Unterschied zu den Versuchen ohne Inhibitorzusatz: * p<0,5;** p<0,01

Abb. 11

Wirkung des NF-κB-Inhibitors BAY 11-7082 auf den Pc

Pulmonalkapillärer Druck (Pc) während 120-minütiger Versuchslaufzeit. Versuche mit Stimulation mit 10.000 ng/ml LPS ohne und mit Zusatz des NF-κB-Inhibitors BAY 11-7082 in den Konzentrationen 20 und 40 µM.

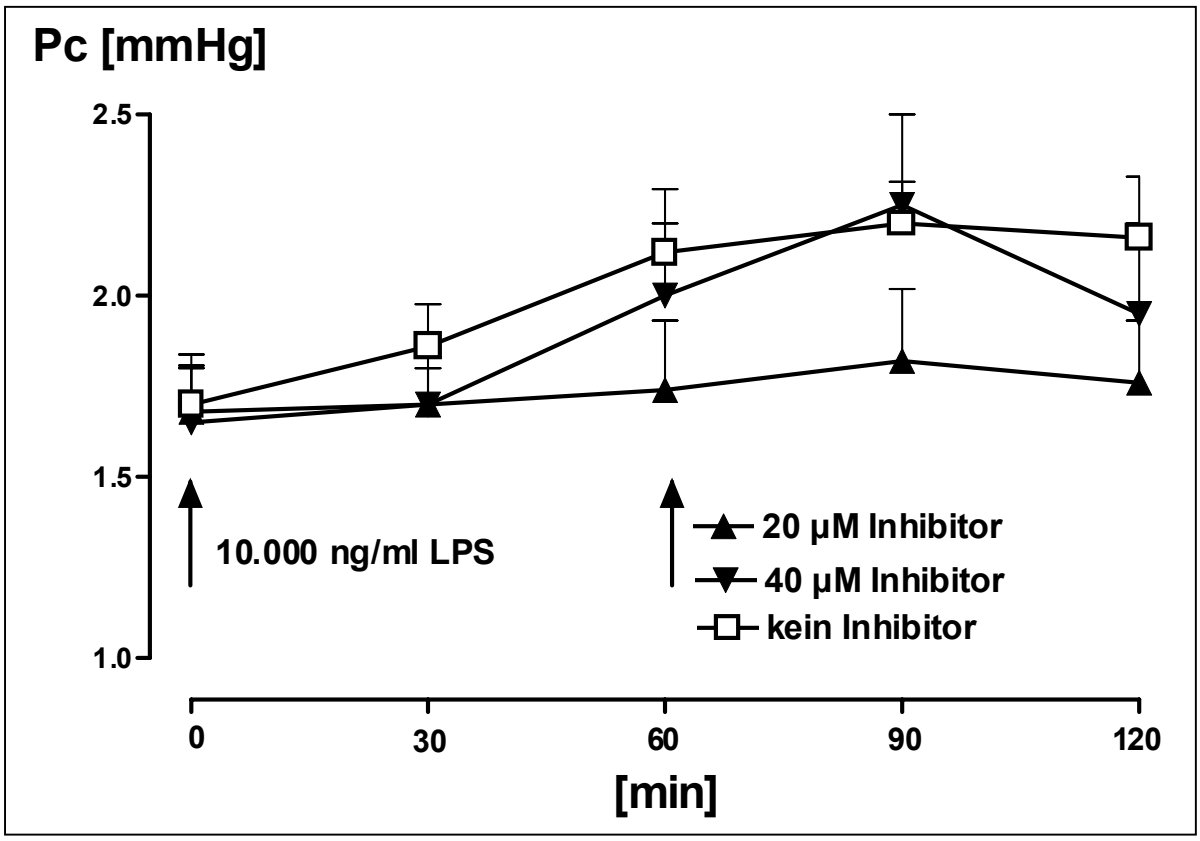


Abb. 12

Kapillärer Druck (Pc) während Venous Pressure Elevation (VPE)

Versuche mit und ohne Stimulation mit 10.000 ng/ml LPS jeweils ohne und mit Zusatz von 20 µM BAY 11-7082 zu Versuchsbeginn.

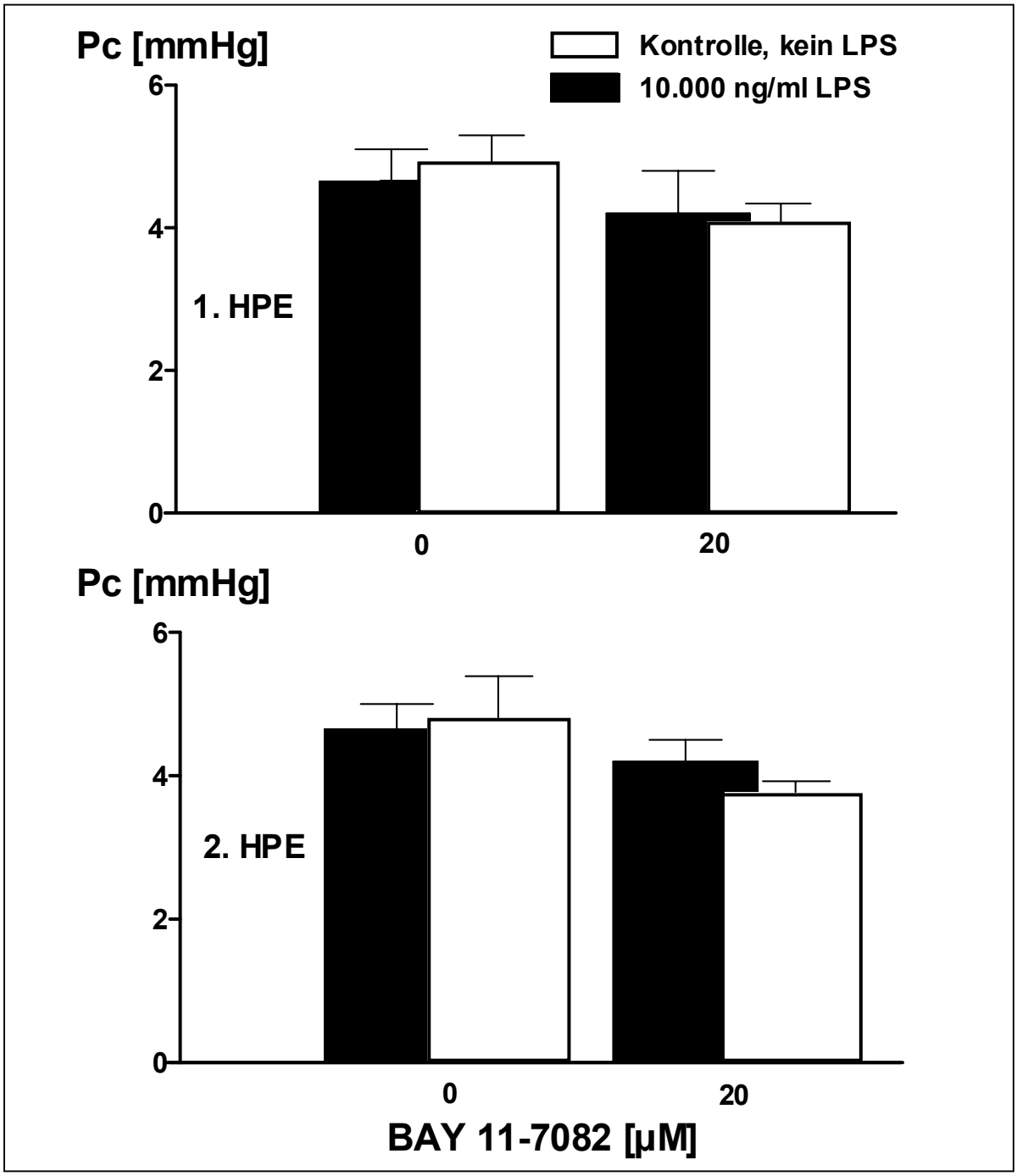
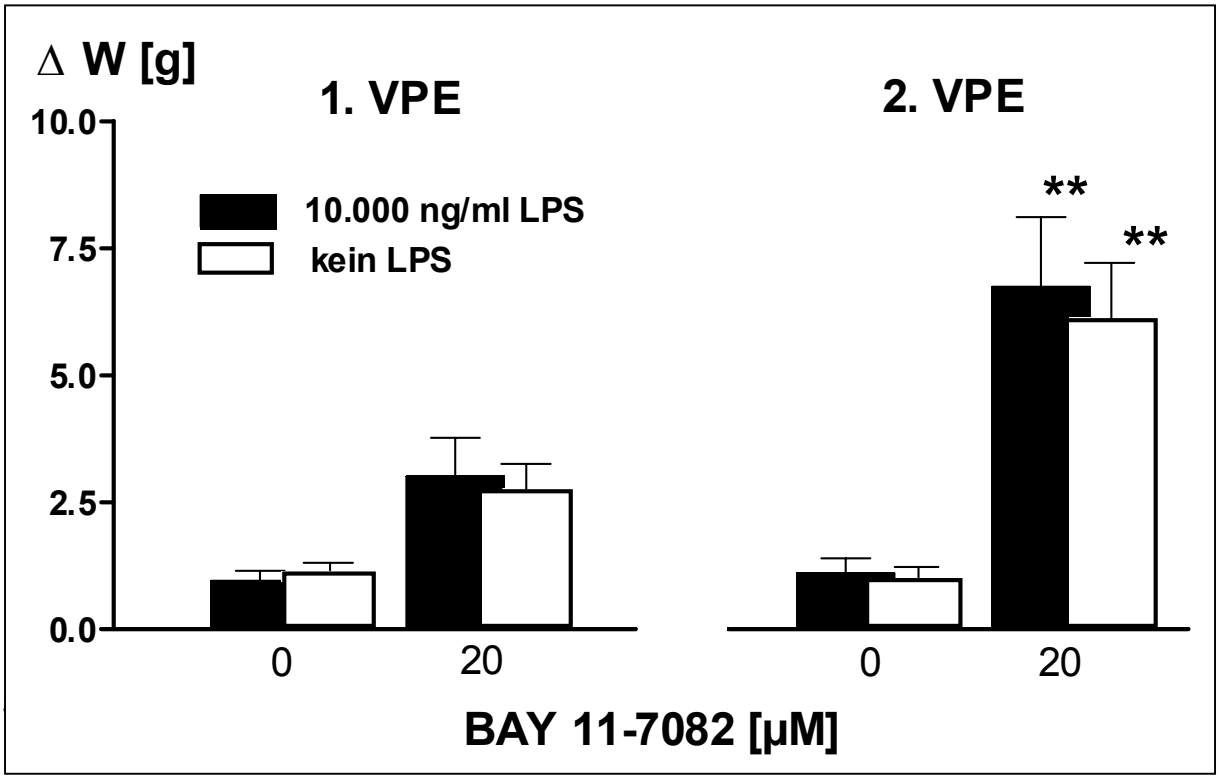


Abb. 13

Inhibitor-abhängiger Gewichtszuwachs (∆W) während VPE

Versuche mit und ohne Stimulation mit 10.000 ng/ml LPS jeweils mit und ohne Zusatz von 20 µM BAY 11-7082 zu Versuchsbeginn.

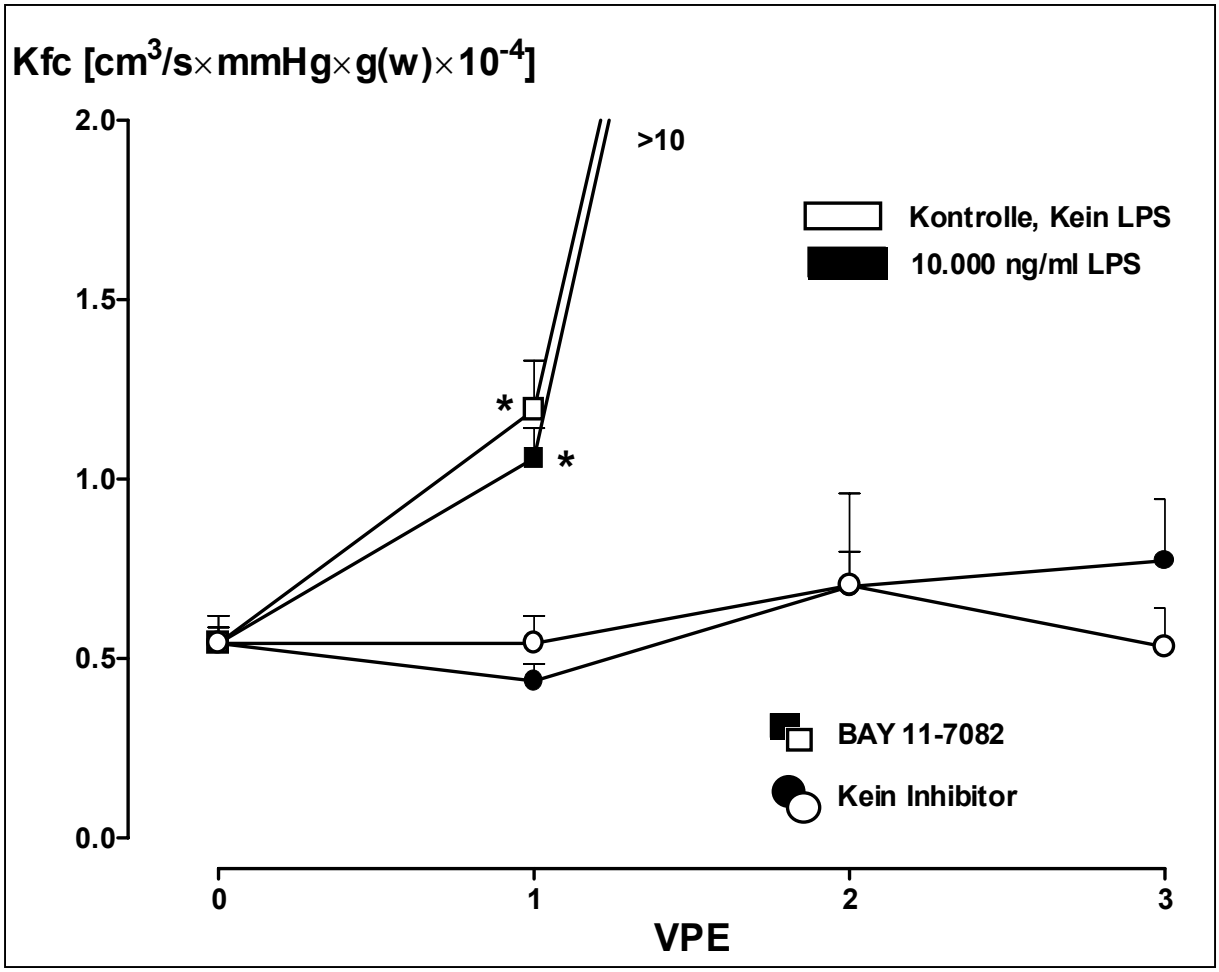


Signifikanter Unterschied zu den Versuchen ohne Inhibitorzusatz: ** $p<0,01$

Abb. 14

Kapillärer Filtrationskoeffizient (Kfc) während VPE

Versuche mit und ohne Stimulation mit 10.000 ng/ml LPS, jeweils ohne und mit Zusatz von 20 µM BAY 11-7082 zu Versuchsbeginn.

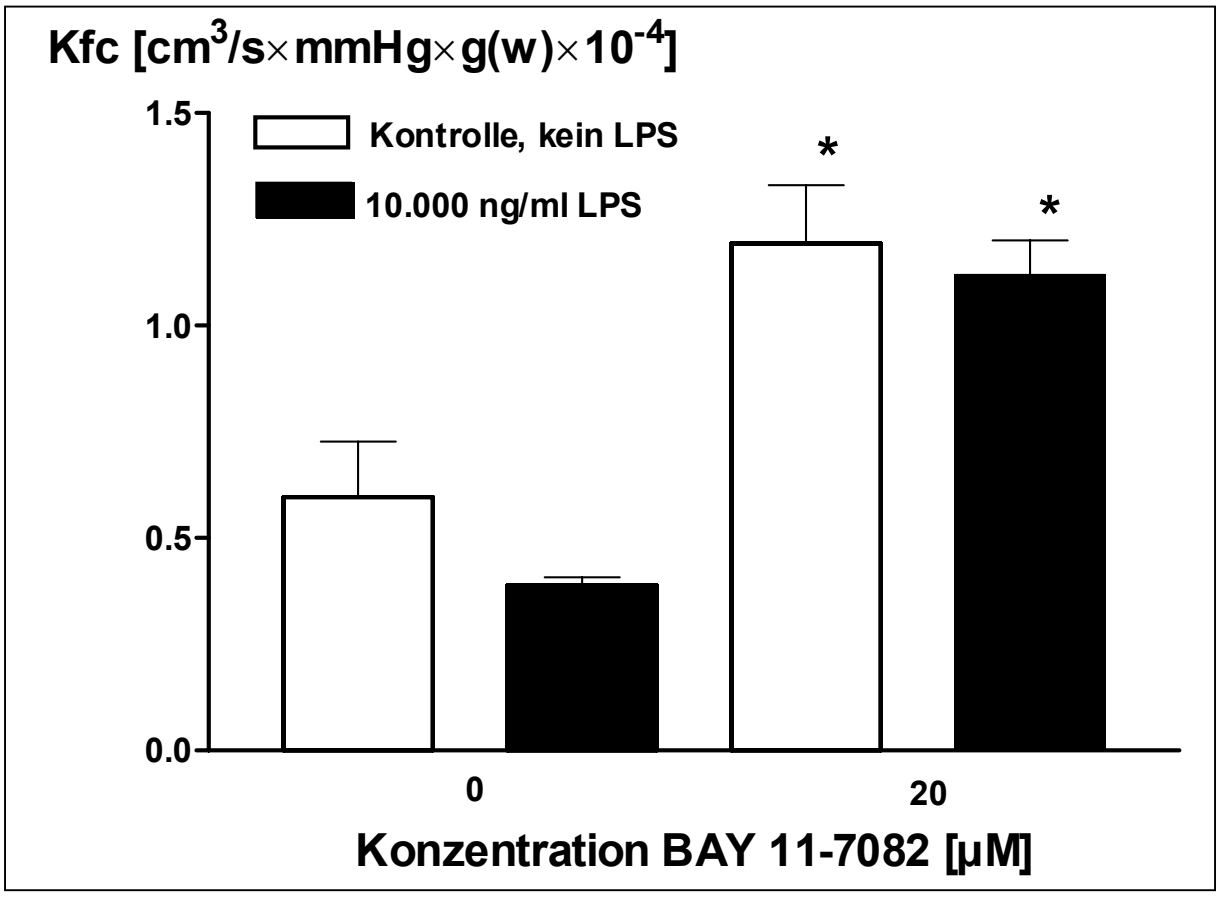


Signifikanter Unterschied zu den Versuchen ohne Inhibitorzusatz: * p<0,5

Abb. 15

Abhängigkeit des Kfc von der NF-κB-Hemmung

Kfc während der 1. VPE. Versuche mit und ohne Stimulation mit 10.000 ng/ml LPS jeweils ohne und mit Zusatz von 20 µM BAY 11-7082 zu Versuchsbeginn.



Signifikanter Unterschied zu den Versuchen ohne Inhibitorzusatz: * p<0,5

6.2 Substanzen

Lipopolysaccharid von Salmonella abortus equi (Sigma, D-Deisenhofen)

Arachidonsäure (Paesel u. Lorei, D-Hanau)

Dimethylsulfoxid (Merck, D-Darmstadt)

Elektrolytlösung I/3 (Serag-Wiessner, Naila)

Bicarbonat (Serag-Wiessner, Naila)

Aqua ad injectabilia (Pharmacia, D-Erlangen)

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

Xylocain 2% (Astra Chemical, D-Wendel)

Liquemin (Hoffman-La Roche, D-Grenzach-Wyhlen)

Nembutal (Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte, D-Hannover)

Braunodermlösung (Braun, D-Melsungen)

BAY 11-7082 (Biomol Feinchemikalien GmbH, D-Hamburg)

BAY 11-7085 (Biomol Feinchemikalien GmbH, D-Hamburg)

Elisa zur 6-keto Prostaglandin F1alpha Bestimmung (R&D Systems GmbH, D-Wiesbaden-Nordenstadt)

Elisa-Kit zur Prostaglandin F2alpha Bestimmung (R&D Systems GmbH, D-Wiesbaden-Nordenstadt)

Elisa-Kit zur Prostaglandin E2 Bestimmung (R&D Systems GmbH, D-Wiesbaden-Nordenstadt)

Elisa-Kit zur Thromboxan B2 Bestimmung (Caymann Chemical, USA-Ann Arbor)

6.3 Geräte

Schlauchpumpe Modell 7518-10 (Masterflex, Cole-Parmer, USA-Chicago)
Schlauchmaterial (Masterflex, Cole-Parmer, USA-Chicago)
Beatmungspumpe (Small animal ventilator KTR-4, Hugo-Sachs-Elektronik, D-March-Hugstetten)
Druckaufnehmer (Combitrans Monitoring Set, Braun, D-Melsungen)
Einkanalschreiber (Rikadenki)
AT-Computer 486, 66Mhz
Farbmonitor
Farbtintenstrahldrucker (Hewlett-Packard)
Wägezelle U1-G (Hottinger-Baldwin-Messtechnik, D-Darmstadt)
Wärmepumpe (Frigomix-Thermomix, Braun, D-Melsungen)
Trachealkanüle aus Metall (Hugo-Sachs-Elektronik, D-March-Hugstetten)
Katheter aus Metall für T. pulmonalis (Hugo-Sachs-Elektronik, D-March-Hugstetten)
Katheter aus Metall für linken Ventrikel (Hugo-Sachs-Elektronik, D-March-Hugstetten)
Okklusionsklemmen (Georg Fischer Anderson GmbH, D-Dortmund)

7 Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
ANOVA	Analysis of variance
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
C_2 Toxin	Clostridium botulinum C2 Toxin
CD14	Cluster of differentation 14
Cox	Zyklooxygenase
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
HPE	Hydrostatic pressure elevation
IKK	I-κB Kinase
IL	Interleukin
κ	Kappa
Kfc	Capillary filtration coefficient
LPB	Lipopolysaccharide-Binding-Protein
LPS	Lipopolysaccharid
LVP	Left ventriculary Pressure
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
NF-κB	Nuklear factor kappa B
NIK	NF-κB-induzierende Kinase
NO	Nitric oxide
PAF	Platelet activating factor
PAP	Pulmonary arterial pressure
Pc	Pulmonary capillary pressure
PEEP	Positive endexpiratory pressure
PGE_2	Prostaglandin E_2
6-keto PGF_{1alpha}	6-keto Prostaglandin F_{1alpha}
PGI_2	Prostazyklin

SEM	Standard error of the mean
TLR	Toll-like-receptor
TNF_{alpha}	Tumor necrosis factor alpha
Tx	Thromboxan
VP	Ventilation pressure
ΔW	Gewichtszunahme
W	Weight

8 Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor Nuklear Factor-kappa B (NF-κB) ist über die Aktivierung von Transkriptionsprozessen an der Bildung von proinflammatorischen Zytokinen und den mitogeninduzierten Enzymen Cox-2 und iNOS beteiligt, die in der Pathogenese des akuten septischen Lungenversagens (ARDS) eine wichtige Rolle spielen. Das ARDS, häufig ausgelöst durch bakterielles Endotoxin (LPS), stellt mit einer schweren Hypoxämie aufgrund pulmonaler Ventilations-Perfusions-Störungen, einer pulmonalen Hypertonie, Bronchokonstriktion und konsekutiver endo- und epithelialer Schrankenstörung ein häufig lethal endendes Krankheitsbild dar.
Durch selektive Hemmung des Transkriptionsfaktors NF-κB mittels der Inhibitoren BAY 11-7082 und BAY 11-7085 sollte die LPS-induzierte Gefäß- und Bronchialreaktivität sowie die Lungengewichtszunahme als Antwort auf die Zugabe von Arachidonsäure (AA) an isolierten Rattenlungen untersucht werden. Zusätzlich erfolgte die Messung der AA-Metabolite TxA_2, $PGF_{1\alpha}$, PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$ mittels ELISA-Technik sowie die Bestimmung des pulmonalkapillären Drucks (Pc) und des kapillären Filtrationskoeffizienten (Kfc) zur Beurteilung der mikrovaskulären Permeabilität.

Die Hemmung der NF-κB-Aktivität reduzierte die LPS-induzierte Cox-2-abhängige Erhöhung des pulmonalarteriellen Drucks nach AA-Applikation, was eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors an den intrazellulären Abläufen zwischen der LPS-vermittelten Signaltransduktionskaskade und der daraus resultierenden Cox-2-Hochregulation in glatten pulmonalen Gefäßmuskelzellen vermuten lässt. Eine Beteiligung des NF-κB-Signaltransduktionsweges an der im Gefäßendothel lokalisierten Cox-1-abhängigen Bildung von PGI_2 konnte nicht nachgewiesen werden. Eine konstitutive, von der LPS-vermittlelten Hochregulation unabhängige Cox-2-Aktivität, ist wahrscheinlich unabhängig vom Einfluss des Transkriptionsfaktors NF-κB möglich, da unter Zusatz der Inhibitoren die Cox-2-

abhängigen Prostanoide TxB_2 und PGE_2 in den mit LPS stimulierten Lungen nicht beeinflusst wurden.

NF-κB hatte nachweislich keinen Einfluss auf die Ventilationsdrucksteigerung nach LPS-Stimulation.

Die fulminanten Gewichtszunahmen nach Zugabe der NF-κB-Inhibitoren, sowohl in Kontrollen als auch in den mit LPS stimulierten Lungen, resultieren nachweislich nicht aus Veränderungen kapillärer Gefäßwiderstände sondern aus einer erhöhten mikrovaskulären Permeabilität. Daraus läßt sich ableiten, dass die konstitutive Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB zur Aufrechterhaltung der pulmonal-kapillären Endothelbarriereeigenschaften sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch innerhalb inflammatorischer Prozesse von Bedeutung ist.

Abstract

Nuclear factor-kappa B (NF-κB) is a transcription factor that plays an important role in the activation of a variety of genes including proinflammatory cytokines and the mitogen-inducible enzymes Cox-2 and iNOS, which are involved in the pathogenesis of the acute respiratory distress syndrome (ARDS). Bacterial endotoxin LPS initiates a complex response pattern in the lung, which contributes to the development of acute respiratory failure associated with ventilation-perfusion mismatch, pulmonary hypertension, bronchoconstriction and an increase in endo- and epithelial permeability with high mortality rates.

Selective inhibitors of NF-κB activation (BAY 11-7082, BAY 11-7085) were applied in endotoxin-primed isolated rat lungs to investigate LPS-priming induced elevation of vaso- and bronchoreactivity and lung weight gain in response to arachidonic acid (AA) application. Additionally AA-metabolites (TxA_2, $PGF_{1\alpha}$, PGE_2, $PGF_{2\alpha}$) were measured in the buffer perfusate via ELISA techniques. The pulmonary capillary pressure (Pc) and the capillary filtration koefficient (Kfc) were measured to evaluate the microvascular permeability.

Blocking of the LPS-mediated Cox-2-dependent pulmonary artery pressure elevation after AA-application by NF-κB inhibition indicates that NF-κB is an important transcription factor linking the LPS-induced intracellular signal to the enhanced Cox-2 expression in pulmonary vascular smooth muscle cells. Liberation of prostacyclin, which is mainly generated via a Cox-1/prostacyclin synthase-axis in endothelial cells, is not affected by NF-κB inhibition. NF-κB inhibition does only block upregulation of Cox-2, while baseline constitutive Cox-2 activity is not affected because Cox-2 dependent thromboxane and PGE_2 liberation into the buffer perfusate were not reduced by NF-κB inhibition in LPS-stimulated rat lungs.

NF-κB inhibition, however, did not influence LPS priming-related elevation of AA-induced ventilation pressure.

Application of NF-κB inhibitors caused a rapid increase of lung weight in both control and LPS-primed lungs not resulting from enhanced capillary pressure but from enhanced capillary permeability. Thus, constitutive activation of NF-κB seems to be necessary for maintaining pulmonary endothelial barrier functions under physiological conditions and inflammatory processes.

Wissenschaftliche Publikationen

Originalarbeiten:

Ermert M., D. Kuttner, **N. Eisenhardt**, Ch. Dierkes, W. Seeger, und L. Ermert. Cox-2 and thromboxane-dependent vascular and bronchial responses are regulated via p38 mitogen-activated protein kinase in control and endotoxin-primed rat lungs. *Lab. Invest.* 83: 333-347, 2002.

Abstracts:

ATS-Meeting in San Francisco:
Ermert L., D. Kuttner, **N. Eisenhardt**, W. Seeger, und M. Ermert. Selective inhibition of the MAP-Kinase p38 and ERK 1/2 in control and endotoxin-challenged isolated rat lungs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163: A275, 2001.

86. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, 3.-6. April 2002 in Wien:
Ermert M., **N. Eisenhardt**, I. Weber, C. Dierkes, W. Seeger, und L. Ermert. Selektive Hemmung und immunhistologischer Nachweis von NF-κB Untereinheiten in LPS stimulierten isolierten Rattenlungen. *Pathology Research and Practice* 198(3): 202, 2002.

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei den folgenden Personen bedanken, ohne deren Einsatz diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre: an erster Stelle gilt mein ganz besonderer Dank Herrn PD Dr. Leander Ermert sowohl für die interessante Aufgabenstellung als auch für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. W. Seeger danke ich für die Möglichkeit, im Lungenlabor an einem isolierten Lungenplatz eine experimentelle Doktorarbeit im Rahmen des SFB 546 erarbeiten zu können, sowie für die Benutzung der Laborräume und verschiedener Geräte.

Für die wertvolle fachliche und menschliche Unterstützung sowie für die Hilfe bei Detailfragen und Anregungen bedanke ich mich besonders bei Frau Dr. Monika Ermert, sowie bei allen Mitarbeitern der histologischen Arbeitsgruppe.

In diesem Zusammenhang sei auch allen Labormitarbeitern für ihre Mithilfe, die herzliche Aufnahme und die angenehme Atmosphäre gedankt, wobei insbesondere die stetige Hilfsbereitschaft von Karin Quanz diese Arbeit erst ermöglichte.
Bei Daniel Kuttner bedanke ich mich für meine Einarbeitung am „Modell der isolierten Lunge“.

Vielen Dank meinen Eltern und Großeltern für ihr Vertrauen und ihre Unterstützung!

Lebenslauf

Nils Alexander Eisenhardt
geboren am 02. Juni 1975 in Gießen
Sohn von Ulrich Eisenhardt (Rechtsanwalt und Notar)
und Claudia Eisenhardt geb. Wendl (staatl. gepr. Fernmeldebeamtin)

Schulbildung

1981-1985	Phillipp-Dieffenbach-Grundschule in Friedberg/Hessen
1985-1994	Augustinergymnasium in Friedberg/Hessen
	Abschluss: Abitur

Zivildienst

08/94-10/95	Zivildienst im Rettungsdienst der Johanniter-Unfall-Hilfe
02/95-04/95	Hauptamtliche Tätigkeit alsRettungssanitäter

Studium

Oktober 1996	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
	Ärztliche Vorprüfung: 02.09.98
	Erstes Staatsexamen: 31.08.99
	Zweites Staatsexamen: 02.04.02
	Drittes Staatsexamen: 22.05.03

Beruf

Oktober 2003	Beginn des AiP bei Herrn Professor Reineke in der Abteilung Anästhesie/Intensivmedizin am Karl-Olga-Krankenhaus Stuttgart
Oktober 2004	Assistenzarzt der Anästhesie
	Erhalt der Vollapprobation: 01.10.04