

**Einfluss des kleinmolekularen, oxidationsresistenten Proteasen-Inhibitors  
CE-1037 auf die durch intravasale Granulozytenstimulation ausgelöste  
pulmonale Permeabilitätsstörung  
am Modell der isolierten, ventilierten und perfundierten Kaninchenlunge**

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

vorgelegt von **Klaus Ulrich Brust**  
aus **Rheinhausen**

Gießen 2005

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

Gutachter: Prof. Dr. H. Neuhof

Gutachter: Prof. Dr. H. Morr

Tag der Disputation: Dienstag, den 16. Mai 2006

# Inhaltsverzeichnis

|   |              |
|---|--------------|
| <b>Abkürzungen</b>  | <b>S. 1</b>  |
| <b>1. Einleitung und Fragestellung</b>  | <b>S. 2</b>  |
| <b>2. Material und Methodik</b>   | <b>S. 10</b> |
| 2.1. Versuchstiere  | S. 10        |
| 2.2. Probanden  | S. 10        |
| 2.3. Präparation und Organentnahme  | S. 10        |
| 2.4. Modell der isolierten, ventilerten und perfundierten Kaninchenlunge                            | S. 12        |
| 2.4.1. Perfusionssystem   | S. 12        |
| 2.4.2. Monitoring von Lungengewicht, Perfusionsdrücken, pH und Gaspartialdrücken                    | S. 14        |
| 2.4.3. Perfusionsmodus  | S. 14        |
| 2.4.4. Beatmungsmodus   | S. 15        |
| 2.4.5. Perfusionslösung   | S. 15        |
| 2.4.6. Entnahme von Untersuchungsmaterial   | S. 17        |
| 2.5. Granulozyten   | S. 18        |
| 2.5.1. Isolierung von polymorphkernigen, neutrophilen Granulozyten (PMN)                            | S. 18        |
| 2.5.2. Materialien zur Isolierung von PMN   | S. 20        |
| 2.5.3. Granulozytenzählung  | S. 21        |
| 2.5.4. Stimulation von humanen polymorphkernigen Granulozyten durch hitzeaggregierte Immunglobuline | S. 22        |
| 2.6. Versuche   | S. 23        |
| 2.6.1. Verwendete Substanzen  | S. 23        |
| 2.6.1.1. Kaninchenplasma  | S. 23        |
| 2.6.1.2. Inhibitoren  | S. 23        |
| 2.6.2. Versuchsgruppen  | S. 24        |
| 2.6.3. Versuchsablauf   | S. 24        |
| 2.6.4. Bestimmung der Elastasekonzentration   | S. 26        |

|  |              |
|--|--------------|
| 2.6.4.1. Reagenzien des Enzymimmunoassay<br>zur PMN-Elastasebestimmung | S. 27        |
| 2.6.5. Bestimmung der Histaminkonzentration                            | S. 28        |
| 2.6.5.1. Reagenzien zur Histaminbestimmung                             | S. 29        |
| 2.7. Statistik   | S. 30        |
| <b>3. Ergebnisse</b>   | <b>S. 31</b> |
| 3.1. Einleitung  | S. 31        |
| 3.2. Vorversuche   | S. 32        |
| 3.2.1. Versuchsgruppen   | S. 32        |
| 3.2.2. Veränderung des Lungengewichtes                                 | S. 32        |
| 3.2.3. Veränderung des pulmonal-arteriellen Druckes                    | S. 34        |
| 3.3. Hauptversuche   | S. 37        |
| 3.3.1. Versuchsgruppen I   | S. 37        |
| 3.3.2. Veränderung des Lungengewichtes                                 | S. 38        |
| 3.3.3. Veränderung des pulmonal-arteriellen Druckes                    | S. 41        |
| 3.3.4. Elastasekonzentration   | S. 44        |
| 3.3.5. Histaminkonzentration   | S. 47        |
| 3.3.6. Versuchsgruppen II  | S. 50        |
| 3.3.7. Veränderung des Lungengewichtes                                 | S. 51        |
| 3.3.8. Veränderung des pulmonal-arteriellen Druckes                    | S. 54        |
| 3.3.9. Histaminkonzentration   | S. 57        |
| <b>4. Diskussion</b>   | <b>S. 60</b> |
| <b>5. Zusammenfassung</b>  | <b>S. 75</b> |
| <b>6. Summary</b>  | <b>S. 77</b> |
| <b>7. Literaturverzeichnis</b>   | <b>S. 79</b> |

## Abkürzungen

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| AA                              | Arachidonic acid (Arachidonsäure)   |
| AK                              | Antikörper  |
| AP                              | Alkalische Phosphatase  |
| ARDS                            | Adult Respiratory Distress Syndrome   |
| $\alpha$ -CH                    | $\alpha$ -Chymotrypsin  |
| $\alpha_1$ -PI                  | $\alpha_1$ -Proteasen-Inhibitor   |
| C <sub>1</sub> - C <sub>x</sub> | Complementfaktoren 1 – X  |
| CAT-G                           | Cathepsin G   |
| CE-1037                         | Bis(4-(2'-(carboxy-2'-methylpropylsulfonyl)phenyl)<br>2,2'(1,4-phenylene))diisobutyrate |
| EIA                             | Enzymimmunoassay  |
| ELAM-1                          | Adhärenzmolekül   |
| F <sub>c</sub>                  | Fragment cristallyzable   |
| FKS                             | Fetales Kälberserum   |
| HNE                             | Humane Neutrophile Elastase   |
| ICAM-1                          | Adhärenzmolekül   |
| IL-1                            | Interleukin 1   |
| KHHB                            | Krebs-Henseleit-Hydroxyethylstarch Buffer   |
| KGw                             | Körpergewicht   |
| LTB <sub>4</sub>                | Leukotrien B <sub>4</sub>   |
| MG                              | Molekulargewicht  |
| PAF                             | Plättchen aktivierender Faktor  |
| PAP                             | Pulmonal-arterieller Druck  |
| PBS                             | Phosphate Buffered Saline   |
| PGD <sub>2</sub>                | Prostaglandin D <sub>2</sub>  |
| PMN                             | Polymorphkernige neutrophile Granulozyten   |
| PPE                             | Porcine Pancreatic Elastase   |
| SRS-A                           | Slow Reacting Substance of Anaphylaxis  |
| TNF                             | Tumornekrosefaktor  |
| TXA <sub>2</sub>                | Thromboxan A <sub>2</sub>   |

# 1. Einleitung

Das akute Lungenversagen (ARDS – Adult Respiratory Distress Syndrome) stellt eine der bedrohlichsten Organkomplikationen der heutigen Intensivmedizin dar [Chughtai et al., 2004]. In der medizinischen Literatur wurde es erstmals 1967 durch Ashbaugh et al. als eigenständiges Krankheitsbild beschrieben. Es handelt sich hierbei um eine akute respiratorische Insuffizienz unterschiedlicher Genese bei zuvor lungengesunden Patienten. Statistischen Angaben zufolge liegt die Inzidenz in den USA bei ca. 165.000 Erkrankungen jährlich [Goss et al., 2003; Arroliga et al., 2002]. Die Prognose ist bei einer Mortalität von durchschnittlich 55 % sehr ernst [Lu et al., 2004; Moran et al., 2004] und verschlechtert sich mit zunehmender Dauer der Ateminsuffizienz [190].

Die Erkrankung zeichnet sich durch eine uniforme Reaktion von Seiten der Lunge aus [4, 28]. Auslösende Ursachen dieser unspezifischen Reaktion können primär extrapulmonaler Art sein: Sepsis [Martin et al., 2005; Seeger et al., 1987], Polytrauma [177], Schock [2], Verletzungen, Verbrennungen, Vergiftungen, extrakorporale Zirkulation [23], Massentransfusionen, Pankreatitis und Urämie. Primär pulmonale Ursachen des ARDS sind u. a. inhalative Noxen, z.B. NO<sub>2</sub>, Rauchgas [97], hyperbarer Sauerstoff und Aspiration (z.B. von Mageninhalt) [66]. Je nach dem ob es sich um eine hämatogen oder um eine inhalativ wirksame Noxe handelt, steht die Schädigung der alveolären Kapillaren oder der Alveolarepithelien am Anfang eines biphasischen Prozesses [Riede et al., 1989]. Gekennzeichnet durch einen spezifischen Krankheitsverlauf und begleitet von adäquaten pathologisch-anatomischen Veränderungen, beginnt in der exudativen Initialphase des ARDS die Beeinträchtigung des pulmonalen Gasaustausches [Rylander et al., 2005]. Diese Beeinträchtigung ist zunächst noch durch Beatmung mit positivem endexpiratorischen Druck (PEEP) und durch Erhöhung des O<sub>2</sub>-Angebots kompensierbar [63]. In diesem frühen Stadium bildet sich ein interstitielles Ödem [1, 178, 171] aufgrund primär reversibler funktioneller Umgestaltungen in der Mikrozirkulation und den Mikrogefäßen der Lunge aus [152, 160, 161]. Diese Initialphase dauert ungefähr eine Woche. Danach kommt es in der proliferativen Phase zu einer im

schlimmsten Fall nicht mehr beherrschbaren respiratorischen Insuffizienz, die zu einem hypoxischen Kreislaufversagen führt [Estenssoro et al., 2002]. Diese Spätphase ist gekennzeichnet durch die Ausbildung einer interstitiellen Lungenfibrose [4, 28].

Pathophysiologisch kommt es im Initialstadium innerhalb von Sekunden zu einer Erhöhung des kapillaren Filtrationsdrucks durch Änderung des Gefäßtonus im Sinne einer Vaso(Veno)konstriktion [160]. Darauf folgt die Lockerung der "inter-endothelialen-junctions" durch Alteration der Endothelzellen [94, 152, 160, 161].

Auslöser dieser Veränderungen sind Mediatoren der drei klassischen humoralen Kaskadensysteme: des Komplementsystems, des Koagulation-Fibrinolyse-Systems und des Kinin-Kallikrein-Systems [Belew et al., 1978; Yamamoto et Cochrane, 1981; Neuhof et Lasch, 1984].

Diese humoralen Kaskadensysteme können durch eine Vielzahl von endogenen und exogenen Stimuli aktiviert werden. Sie sind funktionell so miteinander verknüpft, dass die Aktivierung eines einzelnen Systems zu einer je nach triggernder Ursache unterschiedlich starken Aktivierung der anderen Systeme führt [153]. Neben ihren systemspezifischen Aufgaben sind sie im Stande, die Bildung von Arachidonsäuremetaboliten (AA-Metaboliten) in Lungengewebe und Kapillarendothelien zu bewirken [92, 158, 159, 196, 203] und bestimmte Zellen, wie z.B. Mastzellen, Fibroblasten, Granulozyten, Makrophagen und Thrombozyten, zu stimulieren [39, 112, 201, 217, 229, 230]. Dadurch kommt es zur Generation und Liberation von vasoaktiven Mediatoren, die wiederum den Gefäßtonus und die Permeabilität beeinflussen [Neuhof et al., 1987].

Durch diese enge funktionelle Verknüpfung wird verständlich, dass selbst bei einem kompletten Ausfall eines der Systeme durch z. B. iatrogene Blockade die nicht systemspezifischen Effekte auf die Zielzellen und den AA-Metabolismus über einen Bypass erfolgen können [153].

Darüber hinaus sind einige der Komponenten aus den drei klassischen humoralen Kaskadensystemen direkt in der Lage, die vaskuläre Permeabilität durch Stimulation oder Destruktion der Endothelzellen zu beeinflussen [230, 237, 241].

Die freigesetzten Mediatoren der drei klassischen humoralen Systeme werden häufig in unphysiologisch hohen Konzentrationen bei unterschiedlichen Erkrankungen, die zum ARDS führen, gefunden [75, 154, 186]. So sind zum Beispiel die aktivierten Faktoren des Komplementsystems C3a und C5a an der initialen hämodynamischen Reaktion durch Vasokonstriktion, Plättchenaggregation und Erhöhung der makromolekulären Leckage an den postkapillaren Venen beteiligt [14, 213]. Beide wirken stark aktivierend und chemotaktisch auf Granulozyten und mononukleare Zellen [38, 94] und induzieren außerdem eine Histaminausschüttung von Mastzellen und basophilen Granulozyten.

Des Weiteren ist C5a für die biphasische Aggregation von humanen Granulozyten verantwortlich, was zu einer Leukostase (Granulozytensticking) und zur Embolisation in den Alveolarkapillaren führt [39].

Daneben gibt es noch weitere Stimuli aus dem klassischen Kaskadensystem. Das Plasmakallikrein [Wachtvogel et al., 1983] zum Beispiel stimuliert Granulozyten zur Chemotaxis, Aggregation und Abgabe von neutralen Proteasen wie etwa Elastase und Chymase [70]. Ebenso wird der O<sub>2</sub>-Verbrauch in neutrophilen Granulozyten erhöht [229].

Auch der Hagemann Faktor XIIa [Wachtvogel et al., 1986] und das Fibrinogenspaltprodukt D [Manwaring et Curreri, 1982] können die Granulozyten und den Arachidonsäuremetabolismus aktivieren.

Des Weiteren haben auch porenbildende Bakterientoxine (Staphylokokken-Alpha-Toxin) [Suttorp et al., 1987], Endotoxine und Lipid A [Suttorp et Neuhof, 1987], Zytokine (Interleukin-1) [Goldblum et Cohen, 1987] und TNF-alpha [Shalaby et al., 1987] diese Wirkung.

Schließlich führen Immunglobulin G und M, Fibrin-Monomere, Elastin und Fibrinogen speziell in den Lungenalveolen zu einer starken Dysregulation der Surfactant-Funktion und damit zu Mikroatelektasen [200].

Polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) kommt bei der Entstehung des ARDS eine besondere Rolle zu.

Unter physiologischen Bedingungen steht ein marginierender Leukozytenpool in der Lungenstrombahn im ständigen Austausch mit zirkulierenden Leukozyten [26, 37]. Schon relativ früh im Erkrankungsverlauf des ARDS tritt eine



Leukostase in den Alveolarkapillaren auf [28, 40]. Im Gegensatz zu den in den frühen Stadien des ARDS meist reversiblen Störungen der vaskulären Permeabilität kommt es nun aufgrund einer irreversiblen Schädigung der kapillären und alveolären Schrankenfunktion durch die Aktivität der Granulozyten und Makrophagen zu einer druckunabhängigen Filtration in die Lunge [26, 153, 223]. Dies geschieht, indem die am Endothel der Mikrogefäße haftenden, stimulierten PMN [188] toxische Sauerstoffmetaboliten [203] und je nach Stimulus Proteasen (Elastase, Kathepsin, Chymase) ausschütten, die unter anderem Fibronectin spalten und somit die Basalmembran zerstören [57, 70].

Einfluss auf die Adhärenz der PMN haben offensichtlich der Blutfluss [191], Komplementfaktoren [86], pro-adhäsive Faktoren des Endothels [169], Lipoxygenaseprodukte [167], divalente Kationen [9, 86], Adhäsionsmoleküle [Gando et al., 2004] und c-AMP aus dem Endothel [19]. Dagegen zeigt Prostacyclin in vitro einen reduzierenden Effekt auf die Adhärenz der PMN [20, 81].

Schließlich synthetisieren PMN Leukotriene und andere Lipoxygenaseprodukte mit permeabilitätssteigerndem Effekt [24, 153].

Je nach auslösender Ursache können die am Endothel haftenden PMN auch toxische Sauerstoffmetabolite wie Hydrogenperoxid, Hydroxylradikale oder Superoxidanionen ( $H_2O_2$ ,  $OH^\cdot$ ,  $O_2^\cdot^-$ ) bilden [66, 104, 146, 206]. Die Bildung dieser Sauerstoffspezies erfolgt entweder direkt während des "metabolic burst" oder mediiert über liberierte Myeloperoxidase und Lactoferrin [104, 222, 227]. In der Kontaktzone bewirken die toxischen Sauerstoffprodukte die Peroxidation von zellulären Lipidmembranen und die oxidative Inaktivierung des endogenen  $\alpha_1$ -Proteasen-Inhibitors ( $\alpha_1$ -PI) [36], so dass die liberierten Proteasen uneingeschränkt Strukturelemente der Gefäßwand lysieren können [151]. Beim ARDS sind die gleichen Prozesse innerhalb der Alveolen zu beobachten [36, 155].

Eine gesteigerte Konzentration an Elastase, Myeloperoxidase und Lactoferrin im Blutplasma dient als Marker der Granulozytenaktivität bei Sepsis und Polytrauma [Dittmer et al., 1986; Jochum et al., 1986].

Bei der Entstehung des ARDS spielen auch die Mastzellen und basophilen Granulozyten eine zentrale Rolle. Mastzellen wurden Ende des 19. Jahrhunderts von Paul Ehrlich entdeckt. Nach adäquatem Stimulus, wie zum Beispiel C3a und C5a, Bradykinin, Substanz P, Somatostatin, endogenen Morphinen [9, 14, 213] sowie Anti-IgE mediiert [Chand et al., 1985; Dahinden et al., 1989; Igarashi et al., 1996], sezernieren sie unter anderem Histamin [43, 110, 143], Serotonin [132], Prostaglandine [Khiav et al., 1998], Leukotriene (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>) [43], Chymase [93, 109, 110, 128], Tryptase [Hogan et al., 1997; Kido et al., 1985] und Endothelin. Dabei haben Leukotriene [24, 153], Histamin [6, 22, 118], Serotonin [91, 132, 180], Prostaglandine und Endothelin, wie bereits beschrieben, dosisabhängig einen Effekt auf den Gefäßtonus und die Permeabilität und können dadurch auf die Ödembildung in der Lunge Einfluss nehmen.

Die neutralen Serinproteasen Chymase und Tryptase [72, 76, 89] machen allein 20% der Gesamtmenge aller gespeicherten Mastzellproteasen aus [149]. Aufgrund der Fähigkeit, andere Zellen zu stimulieren, Polypeptid-Hormone zu spalten und Pro-Enzyme zu aktivieren, wird der Tryptase eine bedeutende Funktion bei Entzündungs- und Tissue-Remodeling-Vorgängen zugeschrieben [Ludolph-Hauser et al., 1999]. Chymase induziert eine mikrovaskuläre Permeabilitätsstörung an menschlichem Hautgewebe [He et al., 1998] und beiden wird eine besondere Rolle bei der IgE- und mediatorgetriggerten Histaminausschüttung zugesprochen [71, 107, 109, 110]. So konnte durch Chymase-Inhibitoren die Histaminfreisetzung aus Lungenmastzellen [89] und Hautmastzellen [He et al., 1999] um 70% ± 10%, sowie durch Tryptase-Inhibitoren die Histaminfreisetzung aus Peritonealmastzellen [Kobayashi et al., 1998] um 21% ± 5% vermindert werden.

Eine Vielzahl von Studien haben die Histamineffekte auf die vaskuläre Resistenz und Compliance in der pulmonalen Strombahn untersucht [4, 5, 10] und seit langem ist Histamin als potenter Bronchokonstriktor bekannt [6]. Neben der Bronchokonstriktion tragen ein histamininduziertes Schleimhautödem und eine histamininduzierte Sekretzunahme wesentlich zur Atemwegsverengung bei [219]. Seine Wirkung auf den pulmonalen kapillaren Druck entfaltet Histamin, H<sub>1</sub>-Rezeptor-moduliert, durch Erhöhung des postkapillaren Widerstandes [6].

Stimulation der H<sub>2</sub>-Rezeptoren führt hingegen zur pulmonalen Vasodilatation [6, 226] und Erhöhung der Gefäßpermeabilität [22, 118, 133]. Histamin wird in den cytoplasmatischen Vesikeln [49] von Mastzellen und basophilen Granulozyten gespeichert. Nach adäquatem Stimulus erfolgt die Freisetzung cAMP-moduliert über einen Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Mechanismus [210]. Elektronenmikroskopische Untersuchungen deuten auf einen vesikulären Transport zwischen sekretorischen Granula und der Plasmamembran der Mastzellen bzw. basophilen Granulozyten hin. Dieser Transport wird auch „Piecemeal-Degranulation“ genannt [Dvorak, 1998].

Als zelluläres Mediatorsystem sind ebenfalls die Makrophagen von entscheidender Bedeutung für das akute Lungenversagen. In den Alveolen, den Gefäßen und im umliegenden Bindegewebe vorkommend, gehören sie zu den potenten Bildungsstätten von AA-Metaboliten, toxischen O<sub>2</sub>-Produkten und Proteasen [150]. Von den Granulozyten unterscheiden sie sich durch retardierende Freisetzung mit einer Latenz von 2-3 Stunden und kontinuierliche Resynthesierung der gebildeten Mediatoren, so dass es zu einer prolongierten Wirkung kommt [153, 161]. Außerdem produzieren Makrophagen Komplement-Faktoren und Zytokine, wie z.B. Interleukin I (IL-1) und Tumornekrosefaktor (TNF) [123]. IL-1 und TNF wirken wiederum aktivierend auf Fibroblasten und fördern die Bindung von PMN an Endothelzellen durch Up-Regulation und Expression von Adhärenzmolekülen ELAM-1 und ICAM-1 [13, 59, 174] sowie die Freisetzung weiterer Mediatoren, wie z.B. PAF [53, 146]. In Kooperation mit anderen Stimuli, z.B. Fibrin(ogen)spaltprodukten, werden sie verdächtigt, an der bindegewebigen Transformation der Lunge in der proliferativen Phase des ARDS beteiligt zu sein [Neuhof, 1991]. Die gesteigerte Aktivität der Makrophagen lässt sich durch erhöhte Spiegel an D-Erythro-Neopterin im Plasma nachweisen [216].

Aufgrund klinischer Beobachtung und experimenteller Befunde scheint den Proteasen für die genannten destruktiven Veränderungen der Gefäß- und Alveolarwände eine dominierende Rolle in der Pathogenese des ARDS zuzukommen [155, 160]. Eine wesentliche Proteasenquelle stellen die polymorphkernigen Granulozyten dar, mit Abstand gefolgt von Alveolarmakrophagen, Eosinophilen, Mastzellen und Fibroblasten [219].

Die wichtigste granulozytäre Protease ist die Elastase [160]. Sie ist mit einer Gruppe anderer „neutraler Proteasen“, wie z. B. Kathepsin G und Kollagenase [46, 234], in vollaktiver Form in den azurophilen Granula der PMN gespeichert [61, 74, 102] und wird bei verschiedenen entzündlichen Stimuli sezerniert [139]. Erstmals 1968 beschrieben, erhielt die humane neutrophile Elastase (HNE) ihren Namen von der Fähigkeit, als einzige Protease unlösliches Elastin im Gefäßgewebe abzubauen [98]. Sie ist eine Serinprotease [234] und hat ihre physiologische Funktion in der Abwehr von Mikroorganismen und in der Digestion von Phagozytoseprodukten [16, 146]. Die Elastase nimmt durch die große Breite ihrer Substratspezifität eine Sonderstellung unter den Proteasen ein [Chughtai et al., 2004]. Zu ihren Substraten zählen zahlreiche Strukturelemente aus dem Lungengewebe, wie z. B. Fibronectin [29, 74, 77, 100], Surfactant, Proteoglykan und Kollagen I – IV [70, 74, 131], wobei sie bevorzugt hinter den Aminosäuren Valin, Methionin und Alanin spaltet [70, 101]. Durch unspezifische Proteolyse inaktiviert die Elastase auch Antithrombin III [103],  $\alpha_2$ -Plasmininhibitor [27, 114] und C<sub>1</sub>-Inaktivator [27], die zu den Proteasen-Inhibitoren gezählt werden. Angegriffen werden ferner auch zahlreiche Faktoren des Kinin-Kallikrein-Systems [141], des Komplement-Systems [106] und des Koagulation-Fibrinolyse-Systems [191] sowie Immunglobuline [55]. Neben der direkten Elastasewirkung auf die Lunge kommt es auf diesem Weg auch zu einer indirekten Wirkung über die drei klassischen Kaskadensysteme [99, 131].

HNE ist quantitativ das dominierende Enzym unter den lysosomalen Proteasen [101]. Neutrophile Granulozyten enthalten ungefähr 3 – 7  $\mu\text{g}$  Elastase pro  $10^6$  Zellen [70, 101]. Der Serumspiegel gesunder Menschen liegt bei 60 - 120 ng/ml [101], wobei eine intrazelluläre Konzentration von 36 – 58  $\mu\text{M}$  gemessen wurde [224]. Das Molekulargewicht von HNE beträgt 33000 Dalton, der isoelektrische Punkt liegt bei 10,8 und ihr Wirkungsoptimum bei einem pH von 7,5 – 9,0 [70]. Elastase weist drei Isoenzyme auf [61, 234], die sich in Alveolarmakrophagen [82], Thrombozyten [124] und im Pankreas finden [95]. Die Freisetzung und extrazelluläre proteolytische Aktivität dieses Enzyms wird unter normalen Bedingungen durch seine physiologischen Inhibitoren, das  $\alpha_2$ -Makroglobulin (MG 725000 D) [35], das  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin (MG 69000 D) und

den  $\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitor (MG 55000) [70, 101], kontrolliert. Die höchste Affinität zur HNE [58, 165, 166] besitzt der auch mengenmäßig mit einer Plasmakonzentration von 54  $\mu\text{mol/l}$  ( $290 \pm 45 \text{ mg/100 ml}$ ) überwiegende  $\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitor [225]. Er bindet 90% der Elastase, normalerweise extrem rasch und irreversibel, mit einer HWZ der Komplexe im zirkulierenden Blut von 60 Minuten [84, 165, 166]. Die Hemmaktivität des  $\alpha_1$ -Protease-Inhibitors ( $\alpha_1$ -PI) kann durch toxische Sauerstoffmetabolite, wie Hydrogenperoxid, Hydroxylradikale oder Superoxidanionen ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{O}_2^\cdot$ ), über Oxidation des  $\text{Met}^{358}$  im aktiven Zentrum [219] vermindert werden [152, 155, 242]. Die Affinität von  $\alpha_1$ -PI nimmt nach dieser Oxidation um den Faktor 2000 gegenüber Elastase ab [219]. In diesem Zusammenhang kommt den reaktiven Sauerstoffprodukten, die entweder direkt während des „metabolic burst“ gebildet werden oder mediiert über liberierte Myeloperoxidasen und Lactoferrin, eine besondere Beachtung zu [104, 152, 155]. Insgesamt stellt das Bewahren der Proteasen-Antiproteasen-Balance einen entscheidenden Faktor für die Integrität des Lungenparenchyms dar [219]. Ein Ungleichgewicht zwischen den Proteasen, speziell der Elastase, und den Proteasen-Inhibitoren, vor allem  $\alpha_1$ -PI, spielt nicht nur in der Pathogenese des ARDS eine entscheidende Rolle [152, 228], sondern ebenso bei der Polyarthritits [29, 70, 239], beim obstruktiven Lungenemphysem [58, 70, 95, 137, 228], bei Bronchiektasen [219] und bei der zystische Fibrose [228].

Zusammenfassend wird deutlich, welche therapeutischen Möglichkeiten sich eröffnen, könnte man einen Proteasen-Inhibitor entwickeln, der unter Berücksichtigung der Zusammenhänge eine Regulation der genannten Pathomechanismen ermöglicht.

### **Fragestellung:**

In der vorliegenden Arbeit sollte am Modell der isolierten, ventilierten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge der Einfluss des kleinmolekularen, oxidationsresistenten Proteasen-Inhibitors CE-1037 auf die durch intravasale Granulozytenstimulation ausgelöste pulmonale Permeabilitätsstörung untersucht werden. Weiterhin sollte ein Beitrag zur Klärung der Frage geleistet werden, inwieweit CE-1037 Einfluss auf die Histaminfreisetzung hat.

## **2. Material und Methodik**

### **2.1. Versuchstiere**

Es wurden 54 Bastard-Kaninchen beiderlei Geschlechtes mit einem Körpergewicht von  $2,85 \text{ kg} \pm 0,45 \text{ kg}$  zur Organentnahme verwendet.

Die Tiere wurden ausnahmslos von den Behring-Werken in Marburg geliefert und mit einer Altromin<sup>®</sup>-Standarddiät und Wasser ad libitum ernährt. Die Kaninchen waren nicht medikamentös vorbehandelt.

### **2.2. Probanden**

Für die Separation von humanen, polymorphkernigen Granulozyten standen als Spender gesunde Angehörige medizinischer Berufe zur Verfügung. Den Probanden wurde vor Beginn der Versuche 100 ml Blut abgenommen, das mit Heparin (Liquemin<sup>®</sup>, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) als Antikoagulanzen versetzt wurde.

### **2.3. Präparation und Organentnahme**

Eine in die Vena auricularis eingeführte Verweilkanüle (Butterfly 25 G, Abbott Ireland Ltd., Sligo, Rep. Of Ireland) ermöglichte die Verabreichung von Heparin-Natrium (Liquemin<sup>®</sup>, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) zur Antikoagulation. Hierbei erwiesen sich 1000 I.E. pro kg Körpergewicht (KGw) als ausreichend.

Anschließend wurde über den gleichen Zugang die Narkose mit Pentobarbital-Natrium (Nembutal<sup>®</sup>, Sanofi Ceva, Hannover, Deutschland), 1:1 verdünnt mit isotoner Natriumchloridlösung, eingeleitet. Es wurden im Mittel  $65,55 \pm 1,05 \text{ mg/KGw}$  Pentobarbital-Natrium verabreicht. Nach ausreichender Relaxation wurde das Tier in Rückenlage fixiert. Unter Lokalanästhesie mittels  $90,0 \pm 10,0 \text{ mg}$  Lidocain (Xylocain<sup>®</sup> 2%, Astra Chemicals GmbH, Wedel/ Holstein,

Deutschland) erfolgte nun die Freipräparation der Trachea durch die Dermis und das subkutane Fettgewebe.

Nach Tracheotomie und Einbindung eines ca. 5 cm langen Trachealtubus aus PVC wurde das Tier über eine Starling-Pumpe (Fa. B. Braun AG, Melsungen, Deutschland) mit Raumluft bei 45 Atemzüge pro Minute (Min.), einem Atemzugvolumen von 25 ml und einem positiven endexpiratorischen Druck (PEEP) von 1,5 cm H<sub>2</sub>O-Säule kontinuierlich beatmet.

Nachfolgend wurden das Abdomen durch einen Rippenbogenrandschnitt und der Thorax über eine mediane Sternotomie eröffnet. Nach Resektion des Thymus und Eröffnung des Perikards wurden die Aorta und die Arteria pulmonalis an ihren Ventrikelabgängen dargestellt. Der Truncus pulmonalis wurde stumpf freipräpariert und mit einer losen Ligatur umschlungen.

Unter Beachtung der Gefahr einer Luftembolie wurde ein PVC-Katheter orthograd in die zuvor inzidierte Arteria pulmonalis eingeführt und vorsichtig eingebunden. Bis auf den Pars intrapericardialis trunci pulmonalis und das Ostium der Vena pulmonalis dextra und sinistra wurde das Herz weitgehend reseziert. Bei kontinuierlicher Beatmung wurde das Lungenpräparat nach Exzision von Ösophagus, Trachea, Vena cava inferior und der bindegewebigen Verwachsungen aus dem Thorax entnommen. Anschließend wurde das Präparat über die Trachealkanüle an einer elektronischen Wägezelle (Typ U1; Messbereich 0 – 500 g, Messgenauigkeit  $\pm 0,1$  g) mit Messverstärker (KWS 3073, Hottinger-Baldwin Messtechnik, Gießen, Deutschland) freihängend befestigt.

Eine ausreichende Luftfeuchtigkeit und eine Temperatur von  $38,5 \pm 0,5$  °C wurde durch ein temperiertes und befeuchtetes Glasbehältnis gewährleistet.

## **2.4. Modell der isolierten, ventilierten und perfundierten Kaninchenlunge**

### **2.4.1. Perfusionssystem**

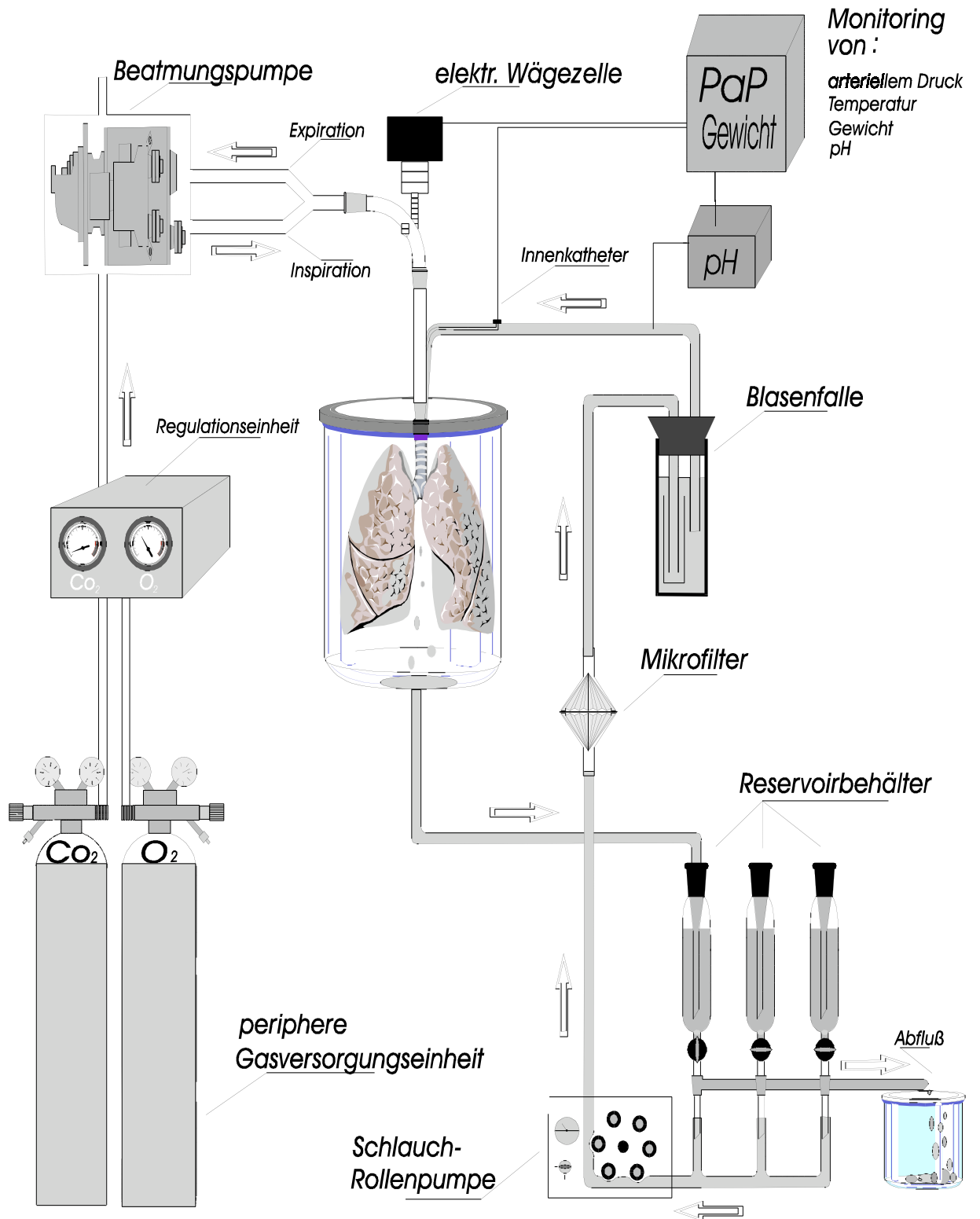
Lungenmodell und Perfusionssysteme wurden von NEUHOF, NOAK und HOFFMANN (1985) entwickelt (Abb. 1).

Das Perfusionssystem setzte sich aus dem Hauptreservoir und drei zusätzlichen, frei anwählbaren Reservoirbehältern von je 200 ml Fassungsvermögen zusammen. Diese waren so hintereinander geschaltet, dass je nach Stellung der Drei-Wege-Hähne an deren Auslass der Inhalt eines jeden entweder in den zuführenden Schenkel des Systems geleitet oder über ein Ablaufrohr verworfen werden konnte. Von dem Hauptreservoir ausgehend gelangte das Perfusionsmedium mittels einer Rollenpumpe (Master Flex<sup>®</sup>, Cole & Palmer Instruments Co., Chicago, USA) mit regulierbarer Förderleistung (Pulsed Logic Flow Meter, Biotronics Laboratories, Zumikon, Schweiz) über einen Mikrofilter (Porengröße 40µm, Pall-Ultipor Mikrofilter, Pall Biomedica, Portsmouth, Großbritannien) in eine Blasenfalle.

Anschließend erreichte das Perfusat über den pulmonal-arteriellen Katheter die Lunge und gelangte in der Folge durch das kapillare Endstromgebiet in die Vena pulmonalis. Von dort floss es in das eröffnete linke Atrium, wurde von der Wärmekammer aufgefangen und den Reservoirbehältern wieder zugeführt.

Die doppelglaswandige Struktur der Reservoirbehälter und der Wärmekammer wurde von destilliertem Wasser durchströmt und mit Hilfe eines Thermostaten (Thermomix UB, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) konstant auf  $38,5 \pm 0,5$  °C gehalten.





**Abb. 1**  
Modell der isolierten, ventilierten und perfundierten Kaninchenlunge.

#### **2.4.2. Monitoring von Lungengewicht, Perfusionsdrücken, pH und Gaspartialdrücken**

Das Lungengewicht wurde mittels einer elektronischen Wägezelle mit Messverstärker (KWS 3073, Hottinger-Baldwin Messtechnik, Gießen, Deutschland) bestimmt.

Der zur Pulmonalarterie führende Perfusionskatheter hatte in seinem ganzen Verlauf einen innenseitig liegenden Katheter von 500 µm Innendurchmesser. Ein Ende dieses Innenkatheters war in der Übergangsebene zwischen Perfusionskanüle und Vena pulmonalis platziert, das andere Ende war fest mit einem elektromechanischen Druckwandler (Combitrans Monitoring Set, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) verbunden. Druckmesskammer und Messkatheter waren mit physiologischer NaCl-Lösung gefüllt.

Zur Messung des pH wurde ein Teil des Perfusats über einen Bypass einer Messkammer mit Temperatur- und pH-Elektrode (pH-Meter, Typ pH 537, WTW, Weilheim, Deutschland) zugeführt und anschließend wieder in das System zurückgegeben. Zusätzlich wurden pH sowie pO<sub>2</sub> und pCO<sub>2</sub> durch Probeentnahmen zu festgesetzten Zeitpunkten an einem Blutgasanalysator (ABL 330 Acid Base Laboratory, Fa. Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) gemessen. Perfusionsdrücke, Lungengewicht und pH wurden mit Hilfe eines Multipenrekorders (Rikadenki Kogyo Co., Ltd., Tokyo, Japan) aufgezeichnet.

#### **2.4.3. Perfusionsmodus**

Direkt nach Platzierung der Perfusionskanüle in die Vena pulmonalis wurde mit einem minimalen Flow von 20 ml pro Minute mit der Perfusion der Lunge begonnen. Nach Fixierung der Lunge an die Wägezelle wurde in Intervallen von 5 Minuten der Perfusatflow um jeweils 40 ml pro Minute bis zum Erreichen des endgültigen Flows von 200 ml pro Minute angehoben. In dieser Phase wurde die Lunge mit 1000 ml Krebs-Henseleit-Puffer-Lösung im offenen System gespült, wobei das rezirkulierende Perfusat in einem gesonderten Auffangbehälter entsorgt wurde. Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten sowie Mediatoren aus

verschiedenen Kaskadensystemen sollten durch diesen Vorgang aus der Lunge gespült werden.

Im anschließenden Verlauf wurden im Perfusat durch Veränderung des Atemminutenvolumens, durch Zugabe von CO<sub>2</sub> in den Inspirationsschenkel und bei Bedarf durch Zugabe von NaHCO<sub>3</sub> zum Perfusat physiologische pH und Gaspartialdrücke eingestellt (pH = 7,39; pO<sub>2</sub> = 80 - 90 mmHg; pCO<sub>2</sub> = 32 - 37 mmHg).

#### **2.4.4. Beatmungsmodus**

Für die maschinell kontrollierte Ventilation wurde eine volumenkonstant arbeitende Kolbenpumpe (Starlingpumpe Typ 874072, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) verwendet. Zur Gasversorgung diente Raumluft, der nach Bedarf CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> aus Gasvorratsflaschen (Messer-Griesheim Sondergase, Duisburg, Deutschland) nach Reduktion des Flaschendruckes über Vorventile mit Hilfe von Nadelventilen und Flowmetern (Rotameter® MFG. Co. LTD, Großbritannien) feindosiert beigemischt wurde. Die Atemfrequenz betrug 45 Hübe pro Minute, das Atemzugvolumen 25 ml pro Hub und das resultierende Atemminutenvolumen 1125 ml pro Minute. Das Inspirations- / Expirationsverhältnis betrug 1:1. Bei einem positiven endexpiratorischen Druck (PEEP) von 1,5 cm H<sub>2</sub>O-Säule wurde die Lunge unter den oben aufgeführten Atemparametern bis zu 300 Minuten ventiliert.

#### **2.4.5. Perfusionslösung**

Die isolierten und ventilierten Kaninchenlungen wurden mit einer Krebs-Henseleit-HAES-Pufferlösung (KHHB), die mit einem Zusatz von 20 ml 20% Humanalbumin (Immuno GmbH, Reg. Nr. H212, CH.-B 0102559403, Heidelberg, Deutschland) versetzt war, perfundiert.

Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-HAES-Pufferlösung (KHHB) je 100

Volumenanteile:

|      |                |                         |  |
|------|----------------|-------------------------|--|
| 65,0 | Volumenanteile | HAES-Steril 10%         | (MW 200.000, Fresenius AG, Bad Homburg, Deutschland) |
| 20,0 | Volumenanteile | Elektrolytlösung A      |  |
| 12,5 | Volumenanteile | NaHCO <sub>3</sub> 0,9% |  |
| 2,50 | Volumenanteile | Glucose-Lösung 10%      | (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)       |

Zusammensetzung der Elektrolytlösung A:

|  |                          |
|--|--------------------------|
| NaCl                                   | 122,5 mmol/l = 7,156 g/l |
| CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O   | 15,76 mmol/l = 1,750 g/l |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>        | 5,511 mmol/l = 0,750 g/l |
| MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O | 14,18 mmol/l = 1,350 g/l |
| KCl                                    | 16,93 mmol/l = 1,262 g/l |
| Aqua destillata                        | 1l                       |

Zusammensetzung des Humanalbumin 20% (100 ml isotonische Lsg.)

|              |         |
|--------------|---------|
| Albumin      | 190 g/l |
| α/β Globulin | 10 g/l  |

Errechnete Elektrolytkonzentration im KHHB:

|                               |              |
|-------------------------------|--------------|
| Na <sup>+</sup>               | 138,0 mmol/l |
| Cl <sup>-</sup>               | 110,8 mmol/l |
| K <sup>+</sup>                | 4,50 mmol/l  |
| Ca <sup>2+</sup>              | 2,38 mmol/l  |
| Mg <sup>2+</sup>              | 1,33 mmol/l  |
| PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> | 1,10 mmol/l  |

Die Osmolarität betrug ca. 300 mmol/l (Mikro-Osmometer, Roebling Messtechnik, Berlin, Deutschland). Der kolloidosmotische Druck (KOD) wurde mit Hilfe eines

Onkometers (Onkometer BMT 921, Thomae, BMT Messtechnik GmbH, Berlin, Deutschland) kontrolliert und mit destilliertem Wasser auf Werten von  $24,0 \pm 1,0$  mmHg konstant gehalten.

#### **2.4.6. Entnahme von Untersuchungsmaterial**

Je eine Probe der Perfusatlösung wurde unmittelbar nach dem ersten Perfusatwechsel entnommen und mit einem Blutgasanalysator gemessen. Im weiteren Verlauf der Versuche wurden Perfusatproben von jeweils 5 ml Volumen regelmäßig erst alle 5 Minuten, später alle 30 Minuten gesammelt. Die Proben wurden mit 1900 g über 15 Minuten bei 20 °C zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand in Eppendorf-Hütchen abgefüllt und bei -25 °C tiefgefroren.

## **2.5. Granulozyten**

### **2.5.1. Isolierung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN)**

Die Dichtegradientenzentrifugation mit polyvinylpyrrolidon-beschichteten Silikonpartikeln (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Schweden) stellt eine gebräuchliche und schonungsvolle Methode zur Separation von humanen polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten dar [62]. Mit ihr erfolgt die Isolierung der Granulozyten mit 55%iger Ausbeute in 97%iger Reinheit [62].

Die im Folgenden beschriebene Methode wurde von Hjorth et al. (1981) entwickelt: Als Blutspender standen 73 Probanden zur Verfügung, denen jeweils 100 ml Vollblut für die Versuche abgenommen wurde.

Zur Antikoagulation waren die Aspirationsspritzen, in denen jeweils 20 ml Frischblut aufbewahrt wurden, mit je 2 ml einer Heparin-Natrium Verdünnung (200 µl Liquemin<sup>®</sup> auf 10 ml isotoner NaCl-Lsg.) vorgefüllt. In zwanzig Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nr. 55468, Nümbrecht, Deutschland) mit einem Fassungsvermögen von 13 ml wurden zuerst 4 ml der 55% Percoll<sup>®</sup>-Lösung (D = 1,077 g/ml) gefüllt. Nachfolgend wurden 4 ml 67% Percoll<sup>®</sup>-Lösung (D = 1,095 g/ml) mit Hilfe einer Kunststoff-Auslaufpipette vorsichtig unterschichtet. Anschließend wurden 4 ml des heparinisierten Vollbluts auf die Lösung geschichtet und die erste Zentrifugation (Rotixa/RP, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland) für 20 Minuten bei 25 °C, 1400 U/min und 60 s Anlaufzeit durchgeführt. Plasmaphase und oberes Drittel der überstehenden Percoll<sup>®</sup>-Lösung wurden im Anschluss daran mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Mit einer Pasteur-Pipette wurde die Granulozytenbande abgehoben und auf acht Kunststoffröhrchen mit einem Fassungsvermögen von 30 ml (Fa. Greiner, Nürnberg, Deutschland) verteilt. Die Zellen wurden mit HBSS resuspendiert. Die Suspension wurde ebenfalls zentrifugiert (5 Minuten bei 25 °C, 1720 U/min, keine Brems- und keine Anlaufzeit), ihr Überstand abgesaugt und das Sediment auf zwei HBSS-haltige Plastikröhrchen verteilt. Nach der folgenden dritten Zentrifugation (5 Minuten bei 25 °C, 1720 U/min, keine Brems- und keine Anlaufzeit) wurde wiederum der nichtverwertbare Teil verworfen, die Granulozyten wurden in ihrer

verbleibenden Lösung aufgeschüttelt und mit einem Nährmedium versetzt. Es folgte die Inkubation der Zellen in einem beheizten Wasserbad (Köttermann, Hänigsen, Deutschland) für 90 Minuten bei 37 °C in einer Gasatmosphäre aus 4,56 Vol.% CO<sub>2</sub>, 14,53 Vol.% O<sub>2</sub> und 80,91 Vol.% N<sub>2</sub> (Messer Griesheim, Griesheim, Deutschland) bei einem Gasdurchfluss von 1 l/min. Anschließend wurde erneut zentrifugiert (5 Minuten bei 25 °C, 1720 U/min, keine Brems- und keine Anlaufzeit), dann wurde die gesamte PMN-Lösung in einem Plastikröhrchen gesammelt und mit HBSS aufgefüllt.

Nach der abschließenden Zentrifugation (5 Minuten bei 25 °C, 1720 U/min, keine Brems- und keine Anlaufzeit) wurden die Zellen in eine mit Perfusatlösung (KHHB) gefüllte 10 ml Spritze aufgezogen.

## 2.5.2. Materialien zur Isolierung von PMN

Percoll® (Polyvinylpyrrolidonbeschichtete Silikon-Partikel, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Schweden):

55 % (D = 1,007 g/ml): 55 ml Percoll®, 10 ml 1,5 m NaCl, 35 ml Aqua destillata  
67 % (D = 1,095 g/ml): 67 ml Percoll®, 10 ml 1,5 m NaCl, 23 ml Aqua destillata  
1,5 m NaCl: 87,66 g NaCl auf 1 l Aqua destillata

Hanks Hepes Puffer (HBSS):

900 ml Aqua destillata  
6 g Hepes Cell Culture® (C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)  
100 ml Hanks BSS® (Buffered Saline Solution) 10% ohne Calcium, Magnesium und Phenolrot (Gibco BRL, Life Technologies Ltd., Paisley, Schottland) titriert auf pH 7,4

Nährmedium:

5 ml FKS (fetales Kälberserum, Böhringer, Mannheim, Deutschland)  
200 µl Penicillin-Streptomycin (Böhringer, Mannheim, Deutschland)  
100 ml RPMI mit NaHCO<sub>3</sub> und ohne Glutamin (Medium RPMI 1640, Böhringer, Mannheim, Deutschland)

Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-HAES-Pufferlösung (KHHB) je 100

Volumenanteile:

65,0 Volumenanteile HAES-Steril 10% (MW 200.000, Fresenius AG, Bad Homburg, Deutschland)  
20,0 Volumenanteile Elektrolytlösung A  
12,5 Volumenanteile NaHCO<sub>3</sub> 0,9%  
2,50 Volumenanteile Glucose-Lösung 10% (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)



### 2.5.3. Granulozytenzählung

Die in der Perfusatlösung resuspendierten Granulozyten wurden in einer Mischpipette bis zur Marke 1,0 aufgezogen und anschließend 1:10 mit Türkis-Lösung (Essigsäure-Gentianaviolett-Lösung, Merck Diagnostica, Darmstadt, Deutschland) aufgefüllt.

Nach dreiminütigem Durchmischen wurde eine Neubauer Zählkammer mit der Lösung gefüllt und die Leukozyten in den vier großen Randquadranten unter dem Mikroskop ausgezählt. Für jede Zählkammer wurde der Mittelwert der vier gezählten Quadrate gebildet. Die Granulozytenzahl pro  $\mu\text{l}$  berechnete sich aus dem Mittelwert der gezählten Zellen, der Verdünnung und dem Volumen in den Eckquadranten:

$$\text{PMN}/\mu\text{l} = \frac{\text{Mittelwert der Zellen} \times \text{Verdünnung}}{\text{Volumen der Eckquadranten}}$$

Das Volumen der Eckquadranten betrug  $0,4 \mu\text{l}$ . Aus  $100 \text{ ml}$  Vollblut wurden im Mittel  $182,5 \pm 22,5 \times 10^5/\text{l}$  humane PMN isoliert, von denen in Stichproben  $95,5\% \pm 1,5\%$  nach dem Trypanblautest vital waren.

#### **2.5.4. Stimulation von humanen polymorphkernigen Granulozyten durch hitzeaggregierte Immunglobuline**

In einem serumfreien Milieu stellen hitzeaggregierte Immunglobuline (Ig) einen adäquaten Phagozytosereiz für PMN dar [60]. Auf diesen Reiz reagieren PMN mit der Bildung von reaktiven O<sub>2</sub>-Metaboliten und Lipoxygenaseprodukten des Arachidonsäuremetabolismus sowie mit der Freisetzung lysosomaler Enzyme [58]. Zur Herstellung der hitzeaggregierten Ig wurden menschliche Immunglobuline der Klasse G (Beriglobulin<sup>®</sup>, Behringwerke AG, Marburg, Deutschland) mit PBS (Phosphated Buffered Saline, 0,15 M NaCl in Phosphatpuffer, pH = 7,0) auf eine Endkonzentration von 5 mg/ml verdünnt. Anschließend wurden sie für 40 ± 30 min unter ständigem Schütteln bis zum Auftreten einer deutlichen Aggregatbildung im Wasserbad bei 63 °C inkubiert. Der Ansatz wurde in einer Kühlzentrifuge (Rotixa/RP, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland) bei 15000 g über einen Zeitraum von 30 Minuten zentrifugiert, der Niederschlag mit Puffer (KHHB) resuspendiert und portioniert eingefroren. Zur Stimulation der PMN wurden jeweils 100 mg hitzeaggregierte IgG eingesetzt, die Proben wurden zeitnah in einem Wärmebad (Köttermann, Hänigsen, Deutschland) innerhalb von 30 min bei 37°C aufgetaut.

## **2.6. Versuche**

### **2.6.1. Verwendete Substanzen**

#### **2.6.1.1. Kaninchenplasma**

Vor der Platzierung der Perfusionskanüle in die Vena pulmonalis wurden dem Spenderkaninchen 25 ml Vollblut aus der Vena jugularis externa entnommen. Anschließend wurde das Blut bei 25 °C, 1400 U/min und 60 s Anlaufzeit für 20 Minuten zentrifugiert (Rotixa/RP, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland). Die Plasmaphase wurde mit einer Kunststoff-Auslaufpipette abpipettiert. Mit diesem Verfahren konnten im Mittel  $12 \pm 2$  ml Kaninchenplasma separiert werden.

#### **2.6.1.2. Inhibitoren**

Zu 200 ml Perfusionslösung wurden folgende Substanzen als Inhibitor-Cocktail hinzugefügt:

|                     |  |
|---------------------|--|
| 2 ml (1 mg/ml)      | Diclofenac-Natrium (Voltaren <sup>®</sup> , Geigy, Wehr, Deutschland)                        |
| 2 ml (4,6 mg/ml)    | WEB 2086 (Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Deutschland)                                      |
| 2 ml (5000 I.E./ml) | Heparin-Natrium (Liquemin <sup>®</sup> , Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) |
| 20 ml               | 20% Humanalbumin (Immuno GmbH, Reg. Nr. H212, CH.-B 0102559403, Heidelberg, Deutschland)     |

Zusätzlich wurden zugesetzt:

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| 100 mg                         | hitzeaggregiertes Immunglobulin (95% IgG);<br>(Beriglobulin <sup>®</sup> , Behringwerke AG, Marburg,<br>Deutschland) |
| $182,5 \pm 22,5 \times 10^5/l$ | humane PMN   |
| 20 mg                          | CE-1037 (Cortech, Denver, USA)   |
| 10 ml                          | Kaninchenplasma  |

## 2.6.2. Versuchsgruppen

1. Gruppe (n = 8): Kontrollgruppe, keine Zugabe von Substanzen
2. Gruppe (n = 4): Inhibitor-Cocktail
3. Gruppe (n = 8): PMN, IgG, Inhibitor-Cocktail
4. Gruppe (n = 8): PMN, IgG, Inhibitor-Cocktail, CE-1037
5. Gruppe (n = 8): PMN, IgG, Inhibitor-Cocktail, Kaninchenplasma
6. Gruppe (n = 8): PMN, IgG, Inhibitor-Cocktail, CE-1037, Kaninchenplasma

## 2.6.3. Versuchsablauf

Für die Versuche wurden nur solche Lungen verwendet, die makroskopisch eine unauffällige Morphologie aufwiesen und bei denen in einer Steady-State Phase die Perfusionsdrücke, das Lungengewicht und die Beatmungsparameter über 20 Minuten konstant geblieben waren.

### *Ad. 1. Gruppe:*

Dem Krebs-Henseleit-HAES-Puffer (KHHB) wurde keine weitere Substanz zugesetzt. Die Erfassung der physiologischen Messgrößen erfolgte insgesamt über 240 Minuten.

### *Ad. 2. Gruppe:*

Dem KHHB wurde zum Zeitpunkt  $T_{-20'}$  der Inhibitor-Cocktail zugesetzt.

### *Ad. 3. Gruppe:*

Dem KHHB wurde zum Zeitpunkt  $T_{-20'}$  der Inhibitor-Cocktail zugesetzt. Zum Zeitpunkt  $T_{-10'}$  wurden im Mittel  $182,5 \pm 22,5 \cdot 10^5/l$  humane PMN zugegeben, zum Zeitpunkt  $T_0$  100 mg hitzeaggregiertes Immunglobulin (95% IgG).

### *Ad. 4. Gruppe:*

In dieser Gruppe wurde analog zur Gruppe 3 verfahren. Zusätzlich wurde der Elastase-Inhibitor CE-1037 verabreicht. Als Gebrauchslösung wurden 20 mg CE-1037 in 20 ml KHHB gelöst. 4 ml dieser Gebrauchslösung wurden zum Zeitpunkt

T<sub>-15'</sub> langsam als Bolus appliziert, die restlichen 16 ml wurden dem System kontinuierlich über einen Perfusor mit 3,3 ml/h zugeführt.

*Ad. 5. Gruppe:*

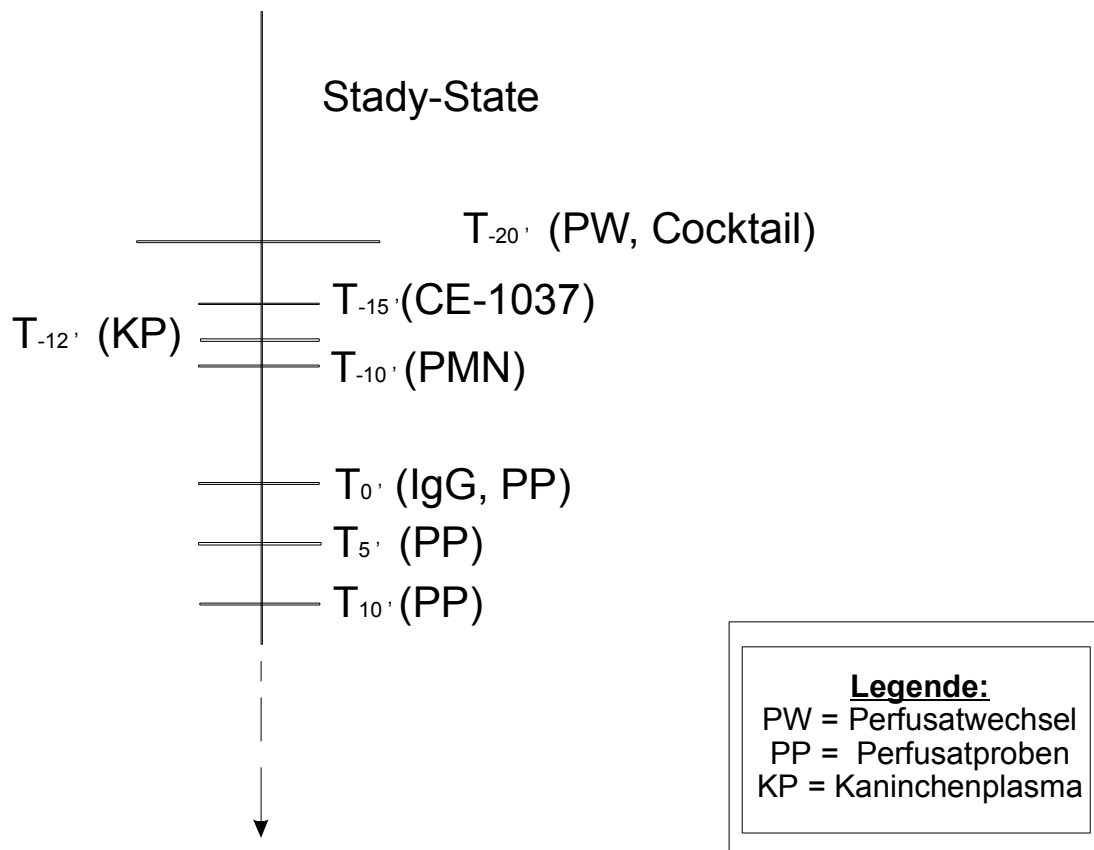
In dieser Gruppe wurde analog zur Gruppe 3 verfahren. Bei T<sub>-12'</sub> wurden dem zirkulierenden KHHB zusätzlich 10 ml Kaninchenplasma zugesetzt.

*Ad. 6. Gruppe:*

In dieser Gruppe wurde analog zur Gruppe 3 verfahren. Wie in Gruppe 5 wurden bei T<sub>-12'</sub> dem zirkulierenden KHHB 10 ml Kaninchenplasma zugesetzt. Wie in Gruppe 4 wurde der Elastase-Inhibitor CE-1037 verabreicht. Als Gebrauchslösung wurden 20 mg CE-1037 in 20 ml KHHB gelöst. 4 ml dieser Gebrauchslösung wurden zum Zeitpunkt T<sub>-15'</sub> langsam als Bolus appliziert, die restlichen 16 ml wurden dem System kontinuierlich über einen Perfusor mit 3,3 ml/h zugeführt.

Für die spätere Ermittlung der Konzentrationen von Histamin und Elastase sowie für die Messung am Blutgasanalysator wurden jeweils zu den Zeitpunkten T<sub>(0,2,5,5,10,15,30,60,90,120,150,180,210,240)</sub> Perfusatproben entnommen.

Für die Versuchsgruppen galt folgendes Schema:



#### 2.6.4. Bestimmung der Elastasekonzentration

Zur Bestimmung der Elastasekonzentration wurden die Perfusatproben für zehn Minuten (20 °C, 3000 U/min, keine Anlauf- und keine Bremszeit) zentrifugiert und der leukozytenfreie Überstand in Eppendorf-Hütchen pipettiert.

Die weitere Bestimmung erfolgte mit dem von Neuman et al. (1984) entwickelten heterogenen Enzymimmunoassay (EIA) (12589 PMN Elastase<sup>®</sup>, Merck, Darmstadt, Deutschland).

Im ersten Schritt wurden die Proben mit einem im Überschuss vorhandenen  $\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor (12,5 mg  $\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor/ml) über 60 Minuten bei  $22,5 \pm 2,5$  °C inkubiert. Durch diesen Vorgang bildeten sich Komplexe aus PMN Elastase und  $\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor. In mit Antikörpern gegen PMN Elastase-Epitop beschichteten Röhrchen wurden die Komplexe gebunden. Anschließend

wurden sie mit durch alkalische Phosphatase (AP) markierten Antikörpern inkubiert, die mit dem  $\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor-Epitop des Komplexes reagierten.

Nach Auswaschen der überschüssigen AP-markierten Antikörper (Ak) wurde die enzymatische Aktivität der über Immunkomplexe gebundene AP photometrisch bestimmt. Die Menge an gebildetem Farbstoff war der Konzentration an PMN Elastase- $\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor direkt proportional.

Zu jeder Analyseserie wurden die Proben als Doppelbestimmung angesetzt und jeweils der Mittelwert der Extinktion gebildet. Zur Kontrolle wurde ein Reagenzienansatz mitbestimmt, der weniger als 30% der Extinktion des Kalibratoransatzes erreichen durfte.

Zur Auswertung wurden die Konzentrationen der Kontrollen und der Proben aus der Kalibrationskurve abgelesen und mit dem Verdünnungsfaktor 51 multipliziert. Das Ergebnis wurde in  $\mu\text{g}$  PMN Elastase pro l erhalten.

#### **2.6.4.1. Reagenzien des Enzymimmunoassay zur PMN-Elastasenbestimmung**

|                           |  |
|---------------------------|--|
| $\alpha_1$ -PI-Lösung:    | 50 $\mu\text{l}$ (12,5 mg/ml)  |
| Ak-beschichtete Röhrchen: | Anti-PMN-Elastase-(human)-Antikörper vom Schaf (Aluminiumbeutel mit 24 Polystyrolröhrchen)   |
| Ak-Enzym-Konjugat:        | Anti- $\alpha_1$ -PI-(human)-Antikörper vom Kaninchen gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase, Konservierungsmittel (1 x 3,7 ml)         |
| Ak-Enzym-Konjugat-Puffer  | TRIS pH 7,5 0,25 mmol, $\text{MgCl}_2$ 0,05 mmol, Stabilisatoren (2 x 25 ml)   |
| AP-Substrat:              | 20 $\mu\text{mol}$ 4-Nitrophenylphosphat, Füllstoffe pro Tablette (10 Tabletten)   |
| AP-Puffer:                | Diethanolamin 1 mol/l, pH = 9,8<br>$\text{MgCl}_2$ , 0,5 mmol/l (1 x 100 ml)   |
| Kalibratoren:             | Gelantinehaltiger TRIS-Puffer 20 $\mu\text{mol}$ , PMN Elastase- $\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor-Komplex, Stabilisatoren (je 2 x 5 ml) |
| Kontrollplasma:           | Humanplasma für die Bestimmung des PMN Elastase- $\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor-Komplexes (1 x 500 $\mu\text{l}$ )                    |

|                          |   |
|--------------------------|---|
| Probenverdünnungsmedium: | Phosphatpuffer 20 mmol/l, pH = 7,5<br>Stabilisatoren, Konservierungsmittel (1 x 100 ml) |
| Stopplösung:             | NaOH 2 mol/l (1 x 50 ml)  |
| Waschlösung:             | Wasser, Detergenz, Konservierungsmittel<br>(1 x 100ml)                                  |

### **2.6.5. Bestimmung der Histaminkonzentration**

Zur Bestimmung der Histaminkonzentration wurde ein Enzymimmunoassay (Enzyme Immunoassay Kit: #1153, Immunotech International, Inc. Dianova-Immunotech GmbH, Marseille, France) verwendet, der auf einem kompetitiven Bindungsprinzip zwischen dem zu messenden Histamin und einem Histamin-Acetylcholinesterase-Konjugat mit an Mikrotiterplatten gebundenen Antikörpern basiert. Das Histamin-Acetylcholinesterase-Konjugat (Tracer) konkurriert mit dem Histamin der Probe um eine im Testansatz vorliegende Menge eines hochaffinen monoklonalen Antikörpers (AK). Die Verdrängung des Tracers vom AK ist proportional zur Konzentration des Histamins in der Probe.

Zur Ermittlung der Histaminkonzentration wurden die Perfusatproben für zehn Minuten (20 °C, 3000 U/min, keine Anlauf- und keine Bremszeit) zentrifugiert und der leukozytenfreie Überstand in Eppendorf-Hütchen pipettiert.

Es wurden jeweils 50 µl Acylierungs-Puffer und 100 µl Standard oder Perfusatprobe zugegeben und für 30 Minuten bei  $22,5 \pm 2,5$  °C inkubiert. Anschließend wurden 50 µl acetylierter Standard oder Perfusatprobe mit 200 µl Histamin-Acetylcholinesterase-Konjugat (Tracer) auf die antikörperbeschichtete Mikrotiterplatte pipettiert und für 18 Stunden bei  $4,0 \pm 2$  °C inkubiert.

Um die nicht gebundenen Komponenten zu entfernen, wurde die Lösung aus den Mikrotiterplatten aspiriert und mittels Waschlösung mehrmals gespült.

Anschließend wurden mit 200 µl Acetylthiocholin ein chromatogenes Substrat zugegeben und für 20 Minuten bei  $22,5 \pm 2,5$  °C inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl Stopplösung pro Testkammer konnte die Absorption bei 405 – 414 nm photometrisch bestimmt werden. Die Menge an gebildetem Farbstoff ist der Konzentration an Histamin umgekehrt proportional. Die Proben wurden jeweils als Doppelbestimmung angesetzt.



Mit dieser Methode konnte Histamin mit einer Sensitivität von 95% bei einer Spezifität von 100% bestimmt werden.

#### **2.6.5.1. Reagenzien für die Histaminbestimmung**

Ak-beschichtete Mikrotiterplatte: 96 Testkammern mit monoklonalen Anti-Histamin-Antikörpern

Standart: Histamin in Konzentrationen von 0 nM bis 50 nM (6 x 1 ml)

Acetylierungsreagenz: 50 Röhrchen mit jeweils 1 mg Acetylierungsreagenz

Acetylierungspuffer: 1 Fläschchen mit 5 ml gebrauchsfertiger Borat-Puffer-Lösung (pH = 8,2)

Tracer: 1 Flasche Histamin-Acetylcholin-Esterase-Konjugat (Commissariat à l'Énergie Atomique license)

Waschlösung: Wasser, Detergenz, Konservierungsmittel (20 x 50 ml Fläschchen)

Stopplösung: Detergenz (1 x 6 ml Fläschchen)

## **2.7. Statistik**

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde das Statistikprogramm "Statgraphics" von STSC Inc., USA eingesetzt. Aus den Rohdaten wurden für alle Messzeitpunkte Mittelwerte (MW) mit Standardfehler (SE) errechnet und durch das Tabellenkalkulationsprogramm "Excel" von Microsoft, USA grafisch dargestellt.

Zur Beurteilung des Signifikanzniveaus diente die Varianzanalyse für verbundene Stichproben (ANOVA), gefolgt von einem LSD-Multipel-Vergleich-Prozess (least significant difference test).

Die Nullhypothese wurde ab einem Signifikanzniveau  $p < 0,05$  verworfen.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Einleitung**

In allen Versuchsreihen wurden die Gewichtszunahme (lung weight gain, g) und der pulmonal-arterielle Druck (PAP, mmHg) kontinuierlich über einen Zeitraum von 240 Minuten registriert. Da die Lunge während der gesamten Versuchsdauer konstant mit 200 ml/min perfundiert wurde, entspricht eine Druckänderung in der Pulmonalarterie quantitativ einer Veränderung des pulmonalen Gefäßwiderstandes.

Nach der 20-minütigen Steady-State Phase und einem Wechsel des Perfusionsmediums wurde mit den Versuchen begonnen. Um die einzelnen Versuchsreihen besser miteinander vergleichen zu können, wurden für das Lungengewicht und den PAP jeweils die Differenzen zum Ausgangswert nach der Steady-State Phase angegeben.

In den Versuchen mit Zugabe von PMN wurde eine Probe aus dem rezirkulierenden Perfusionsmedium zur Leukozytenzählung entnommen. Durch die Zählung wurde nachgewiesen, dass über 90 % aller PMN im Gefäßbett der Kaninchenlunge verblieben waren.

### **3.2. Vorversuche**

In den Vorversuchen wurde der mögliche Einfluss von Voltaren® (Diclofenac), WEB 2086 (PAF-Antagonist) und Liquemin® (Heparin-Natrium) auf die Gewichtszunahme der Lunge und auf den PAP untersucht.

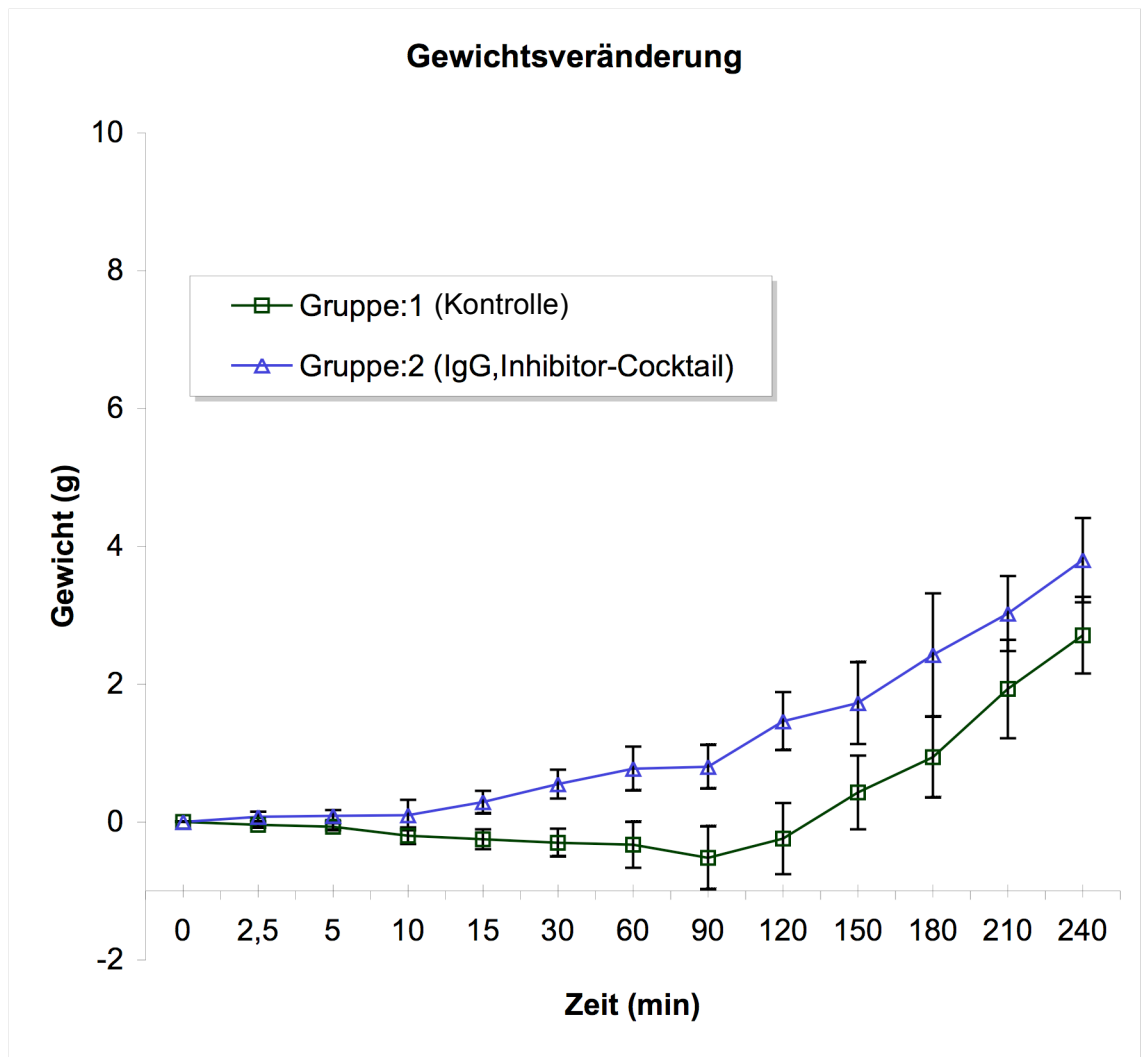
#### **3.2.1. Versuchsgruppen**

1.Kontrollgruppe: In dieser Gruppe wurden der Krebs-Henseleit-HAES-Pufferlösung (KHHB) nach erfolgreichem Perfusatwechsel und Abschluss der Steady-State Phase keine weitere Substanz zugesetzt. Die Erfassung der physiologischen Messgrößen wurde bei diesen Lungen insgesamt über 240 Minuten durchgeführt. (n=8)

2.Gruppe: In dieser Gruppe wurde dem KHHB zum Zeitpunkt  $T_{-20'}$  der bereits beschriebene Inhibitor-Cocktail zugesetzt, bestehend aus Voltaren®, Liquemin® und WEB 2086. (n=4)

#### **3.2.2. Veränderung des Lungengewichtes**

Der Verlauf des Lungengewichtes in der Kontrollgruppe (n=8) zeigte nur einen geringen Anstieg während der Versuchsdauer (Abb. 2). Innerhalb der 240 Minuten nahm das Gewicht langsam um  $2,8 \pm 0,6$  g (Tab. 1) zu. Der Verlauf in Gruppe 2 (n=4) war ähnlich. Nach einem kontinuierlichen und flachen Anstieg erreichte die Lunge nach 240 Minuten einen Gewichtszuwachs von  $3,8 \pm 0,6$  g (Abb. 2, Tab. 1). Bei  $T_{240'}$  zeigte sich ein 1,4-facher Anstieg der Gruppe 2 im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 2). Der Unterschied war nicht statistisch signifikant ( $p > 0,05$ ).



**Abb. 2**

Änderung des Lungengewichtes (g) über 240 Minuten am Modell der isolierten, ventilerten und perfundierten Kaninchenlunge.

Bei den Kontrollversuchen aus Gruppe 1 wurden dem Perfusionsmedium keine weiteren Substanzen zugegeben.

Dem Perfusionsmedium der Gruppe 2 wurde zum Zeitpunkt  $T_{-20'}$  der Inhibitor-Cocktail zugesetzt.

| Zeit<br>(min) | Gruppe:1 (n = 8)           |             | Gruppe:2 (n = 4)           |             |
|---------------|----------------------------|-------------|----------------------------|-------------|
|               | Mittelwerte<br>Gewicht (g) | SE<br>± (g) | Mittelwerte<br>Gewicht (g) | SE<br>± (g) |
| 0             | 0                          | 0           | 0                          | 0           |
| 2,5           | -0,04                      | 0,04        | 0,08                       | 0,08        |
| 5             | -0,07                      | 0,05        | 0,09                       | 0,09        |
| 10            | -0,20                      | 0,12        | 0,10                       | 0,22        |
| 15            | -0,25                      | 0,15        | 0,29                       | 0,17        |
| 30            | -0,30                      | 0,20        | 0,55                       | 0,21        |
| 60            | -0,33                      | 0,33        | 0,78                       | 0,32        |
| 90            | -0,52                      | 0,46        | 0,80                       | 0,32        |
| 120           | -0,24                      | 0,52        | 1,46                       | 0,42        |
| 150           | 0,43                       | 0,53        | 1,73                       | 0,59        |
| 180           | 0,94                       | 0,59        | 2,43                       | 0,89        |
| 210           | 1,93                       | 0,71        | 3,03                       | 0,54        |
| 240           | 2,71                       | 0,56        | 3,80                       | 0,61        |

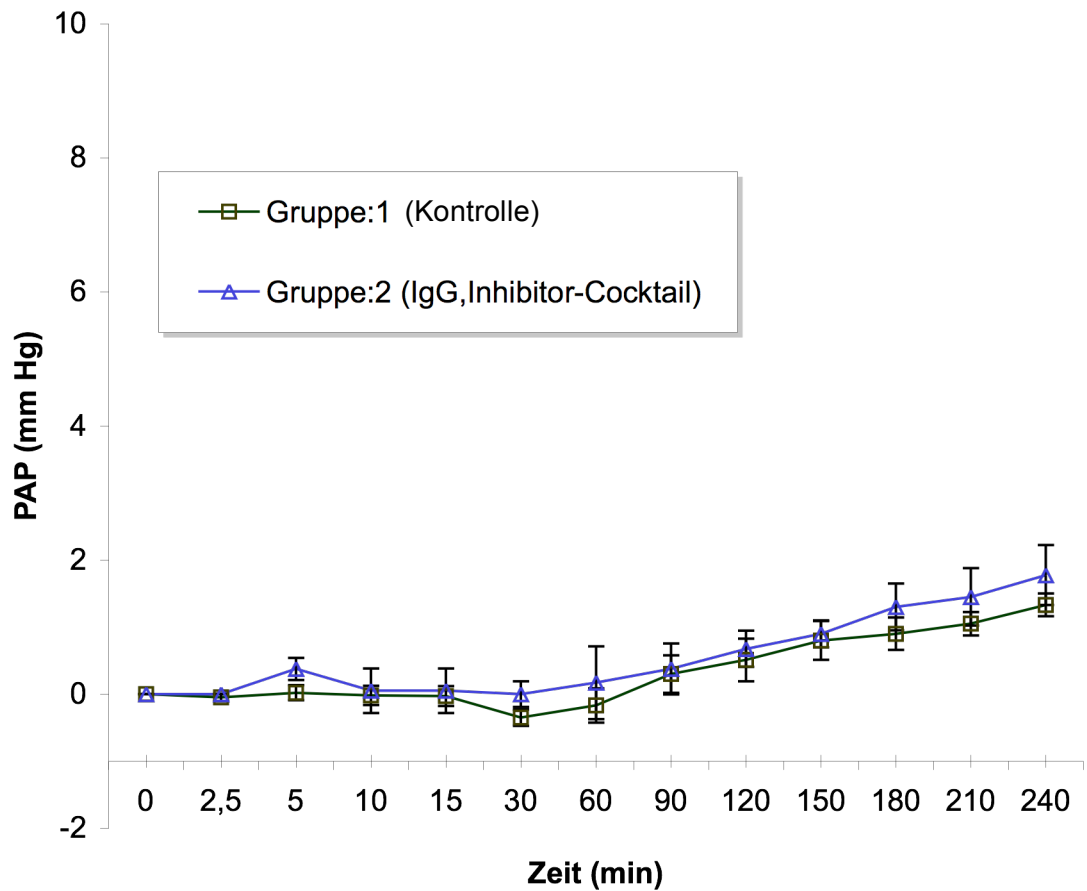
**Tab. 1**

Gewichtszunahme [Mittelwerte und Standardfehler (SE)] in den Gruppen 1 und 2 .

### 3.2.3. Veränderung des pulmonal-arteriellen Druckes

Bei den Versuchen der Gruppe 1 sowie der Gruppe 2 kam es im Verlauf nur zu einer geringfügigen Erhöhung des PAP (Abb. 3). Nach 240 Minuten wurden die Versuche in der Gruppe 1 bei einer durchschnittlichen Druckzunahme von  $1,3 \pm 0,2$  mmHg und in der Gruppe 2 bei einer durchschnittlichen Druckzunahme von  $1,8 \pm 0,4$  mmHg beendet (Abb. 3, Tab. 2). Bei T<sub>240'</sub> zeigte sich ein 1,3-facher Anstieg der Gruppe 2 im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 3, Tab. 2). Der Unterschied war nicht statistisch signifikant ( $p > 0,05$ ).

### Veränderung des PAP



#### **Abb. 3**

Änderung des pulmonal-arteriellen Druckes (mmHg) über 240 Minuten am Modell der isolierten, ventilerten und perfundierten Kaninchenlunge.

Bei den Kontrollversuchen aus Gruppe 1 wurden dem Perfusionsmedium keine weiteren Substanzen zugegeben.

Dem Perfusionsmedium der Gruppe 2 wurde zum Zeitpunkt  $T_{-20'}$  der Inhibitor-Cocktail zugesetzt.

| Zeit<br>(min) | Gruppe:1 (n = 8)         |                | Gruppe:2 (n = 4)         |                |
|---------------|--------------------------|----------------|--------------------------|----------------|
|               | Mittelwert<br>PAP (mmHg) | SE<br>± (mmHg) | Mittelwert<br>PAP (mmHg) | SE<br>± (mmHg) |
| 0             | 0                        | 0              | 0                        | 0              |
| 2,5           | -0,05                    | 0,06           | 0,00                     | 0,00           |
| 5             | 0,02                     | 0,11           | 0,38                     | 0,17           |
| 10            | -0,02                    | 0,14           | 0,05                     | 0,33           |
| 15            | -0,03                    | 0,15           | 0,05                     | 0,33           |
| 30            | -0,35                    | 0,12           | 0,00                     | 0,19           |
| 60            | -0,17                    | 0,26           | 0,17                     | 0,54           |
| 90            | 0,30                     | 0,28           | 0,38                     | 0,38           |
| 120           | 0,51                     | 0,32           | 0,68                     | 0,27           |
| 150           | 0,80                     | 0,29           | 0,90                     | 0,20           |
| 180           | 0,90                     | 0,24           | 1,30                     | 0,35           |
| 210           | 1,05                     | 0,17           | 1,45                     | 0,43           |
| 240           | 1,33                     | 0,17           | 1,78                     | 0,45           |

**Tab. 2**

Veränderung des PAP [Mittelwerte und Standardfehler (SE)] in den Gruppen 1 und 2.



### **3.3. Hauptversuche**

In den Hauptversuchen sollte nach intravasaler Granulozytenstimulation der Einfluss des kleinmolekularen, oxidationsresistenten Proteasen-Inhibitors CE-1037 auf die durch intravasale Granulozytenstimulation ausgelöste pulmonale Permeabilitätsstörung untersucht werden. Weiterhin sollte ein Beitrag zur Klärung der Frage geleistet werden, inwieweit CE-1037 Einfluss auf die Histaminfreisetzung hat.

#### **3.3.1. Versuchsgruppen I**

Zur besseren Übersicht werden zunächst die Versuchsgruppen besprochen, bei denen auf die Gabe von Kaninchenplasma verzichtet worden ist.

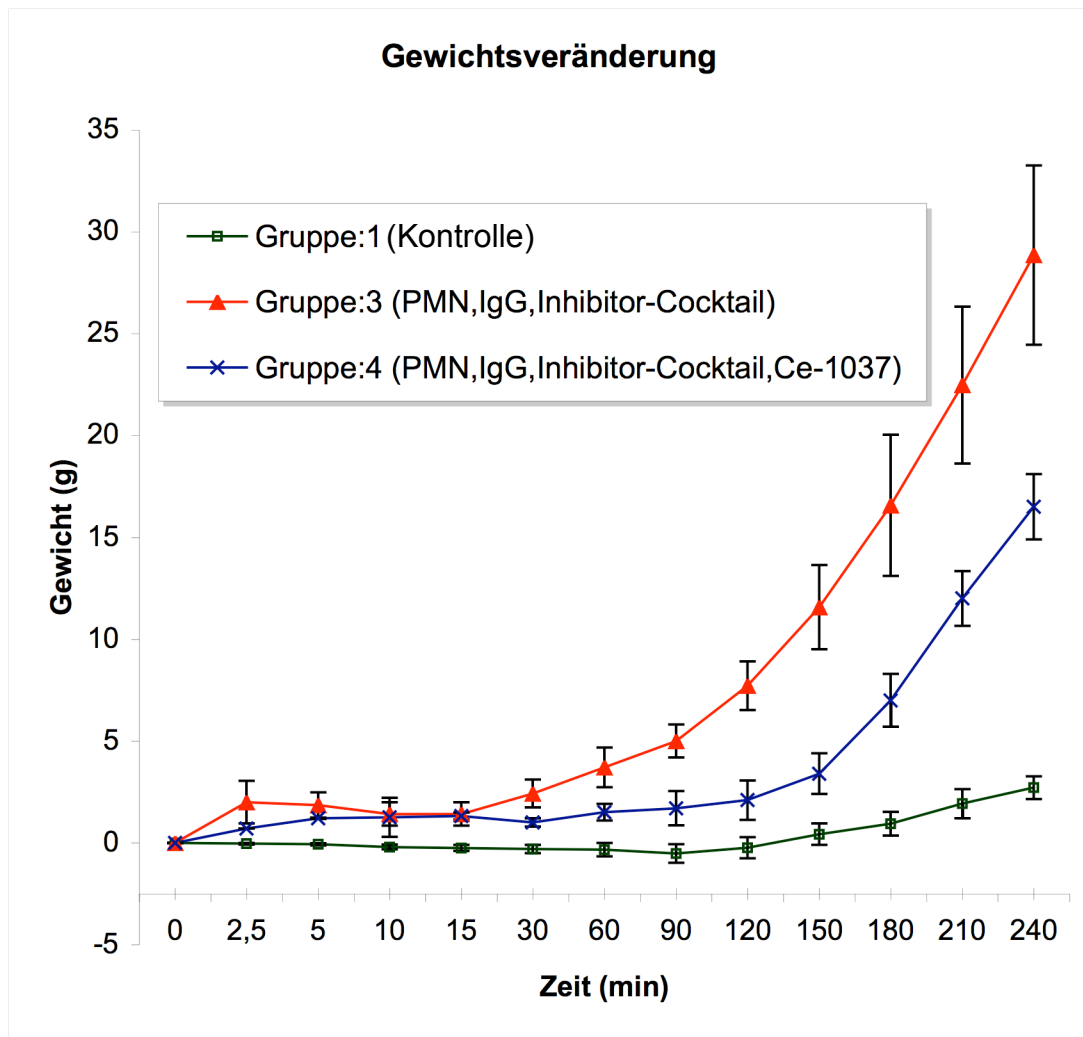
- 1.Kontrollgruppe: In dieser Gruppe wurden der Krebs-Henseleit-HAES-Pufferlösung (KHHB) nach dem Perfusatwechsel und Abschluss der Steady-State Phase keine weitere Substanz zugesetzt. (n=8)
- 3.Gruppe: Zum Zeitpunkt  $T_{-20'}$  wurde der Inhibitor-Cocktail zugegeben. Zum Zeitpunkt  $T_{-10'}$ , wurden  $182,5 \pm 22,5 \times 10^5/l$  humane PMN hinzugegeben. Bei  $T_0$  wurden dem KHHB 100 mg hitzeaggregiertes Immunglobulin (95% IgG) zugesetzt. (n=8)
- 4.Gruppe: In dieser Gruppe wurde bis auf eine zusätzliche Verabreichung des Elastase-Inhibitors CE-1037 analog zur Gruppe 3 verfahren. Zum Zeitpunkt  $T_{-15'}$  wurden 4 ml einer Gebrauchslösung (CE-1037, 1mg/ml) langsam als Bolus appliziert. Weitere 16 ml (CE-1037, 1mg/ml) wurden kontinuierlich über einen Perfusor mit 3,3 ml/h dem System zugeführt. (n=8)

### **3.3.2. Veränderung des Lungengewichtes**

In den ersten 60 Minuten bestanden keine Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen. In der Kontrollgruppe blieb das Lungengewicht konstant ( $-0,3 \pm 0,3$  g), in Gruppe 3 stieg das Gewicht um  $3,7 \pm 1,0$  g und in Gruppe 4 um  $1,5 \pm 0,4$  g an (Abb. 4, Tab. 3).

Danach nahm das Gewicht in der Versuchsgruppe 3 stetig zu, während es in der Gruppe 4 und der Kontrollgruppe zunächst noch nahezu konstant blieb. Zum Zeitpunkt  $T_{90}$  war der Unterschied in der Gewichtszunahme zwischen der Kontrollgruppe ( $-0,6 \pm 0,5$  g) bzw. der Gruppe 4 ( $1,7 \pm 0,8$  g) und der Gruppe 3 ( $5,0 \pm 0,8$  g) statistisch signifikant ( $p < 0,05$ , Abb. 4, Tab. 3).

In Gruppe 3 lag das Endgewicht nach 240 Minuten um  $28,9 \pm 4,4$  g über dem Ausgangsgewicht, die Gewichtszunahme war statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) höher als in Gruppe 4 ( $16,5 \pm 1,6$  g).



**Abb. 4**

Änderung des Lungengewichtes (g) über 240 Minuten am Modell der isolierten, ventilerten und perfundierten Kaninchenlunge.

Der Kontrollgruppe 1 wurden keine weiteren Substanzen zugegeben.

Gruppe 3 wurde zum Zeitpunkt  $T_{-20'}$  der Inhibitor-Cocktail zugeführt. Zehn Minuten später ( $T_{-10'}$ ) wurden  $182,5 \pm 22,5 \cdot 10^5/l$  PMN hinzugegeben. Zum Zeitpunkt  $T_0$  wurden die PMN mit 100 mg hitzeaggregierten Immunglobulinen aktiviert.

In Gruppe 4 wurde bis auf eine zusätzliche Gabe des Elastase-Inhibitors CE-1037 analog zur Gruppe 3 verfahren. Zum Zeitpunkt  $T_{-15'}$  wurden 4 ml einer Gebrauchslösung (CE-1037, 1mg/ml) langsam als Bolus appliziert. Weitere 16 ml (CE-1037, 1mg/ml) wurden kontinuierlich über einen Perfusor mit 3,3 ml/h dem System zugeführt.

| Zeit<br>(min) | Gruppe:1 (n = 8)          |             | Gruppe:3 (n = 8)          |             | Gruppe:4 (n = 8)          |             |
|---------------|---------------------------|-------------|---------------------------|-------------|---------------------------|-------------|
|               | Mittelwert<br>Gewicht (g) | SE<br>± (g) | Mittelwert<br>Gewicht (g) | SE<br>± (g) | Mittelwert<br>Gewicht (g) | SE<br>± (g) |
| 0             | 0                         | 0           | 0                         | 0           | 0                         | 0           |
| 2,5           | -0,04                     | 0,04        | 2,00                      | 1,05        | 0,70                      | 0,00        |
| 5             | -0,07                     | 0,05        | 1,85                      | 0,63        | 1,21                      | 0,03        |
| 10            | -0,20                     | 0,12        | 1,42                      | 0,57        | 1,25                      | 0,96        |
| 15            | -0,25                     | 0,15        | 1,42                      | 0,57        | 1,32                      | 0,17        |
| 30            | -0,30                     | 0,20        | 2,42                      | 0,69        | 1,00                      | 0,21        |
| 60            | -0,33                     | 0,33        | 3,70                      | 0,98        | 1,50                      | 0,41        |
| 90            | -0,52                     | 0,46        | 5,00                      | 0,81        | 1,70                      | 0,84        |
| 120           | -0,24                     | 0,52        | 7,71                      | 1,19        | 2,10                      | 0,96        |
| 150           | 0,43                      | 0,53        | 11,57                     | 2,07        | 3,40                      | 1,00        |
| 180           | 0,94                      | 0,59        | 16,57                     | 3,47        | 7,00                      | 1,30        |
| 210           | 1,93                      | 0,71        | 22,48                     | 3,85        | 12,00                     | 1,34        |
| 240           | 2,71                      | 0,56        | 28,85                     | 4,40        | 16,50                     | 1,60        |

**Tab. 3**

Gewichtszunahme [Mittelwerte und Standardfehler (SE)] in den Gruppen 1, 3 und 4 .

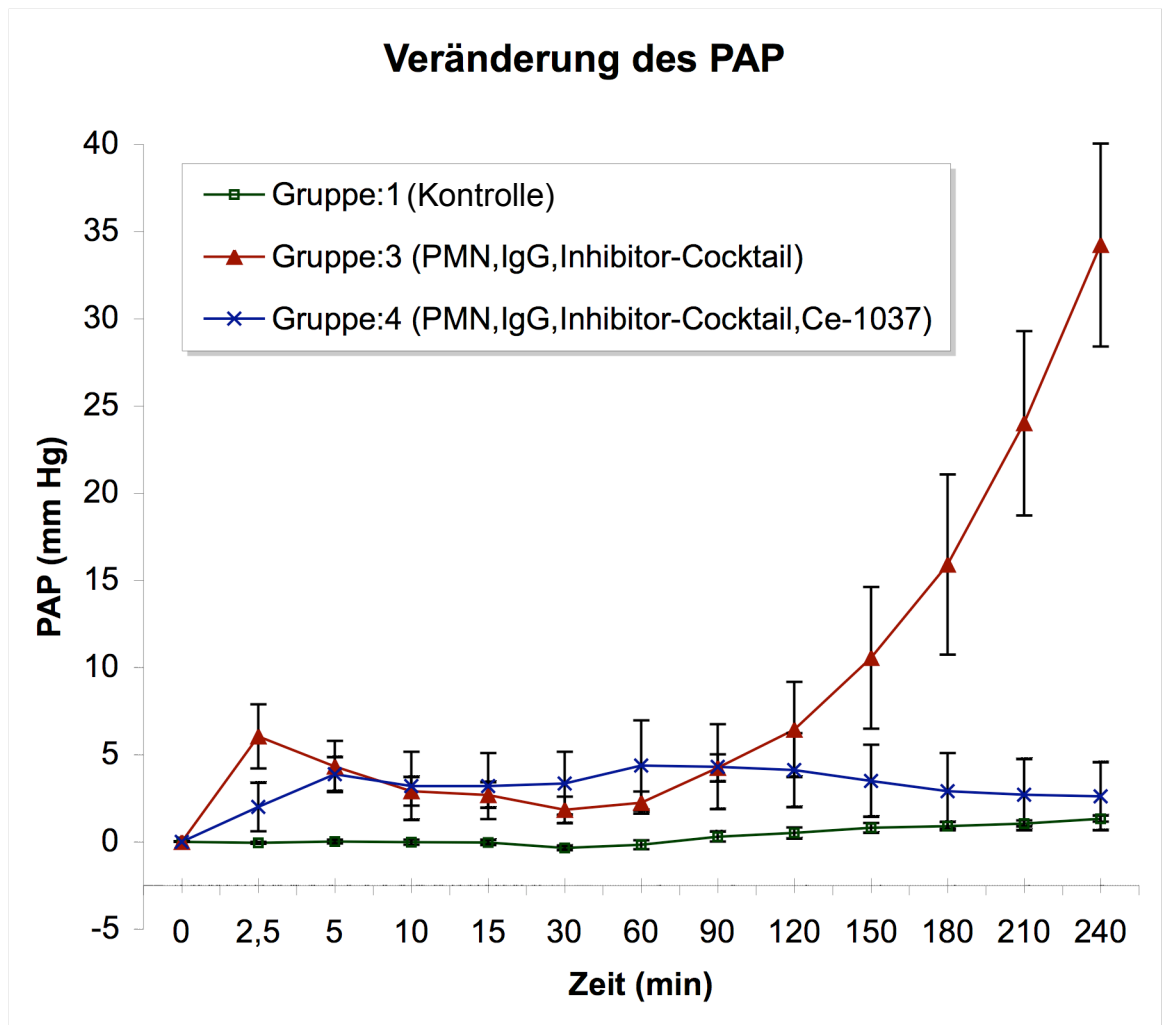
### 3.3.3. Veränderung des pulmonal-arteriellen Druckes

Der PAP stieg bereits innerhalb der ersten 2,5 Minuten in der Gruppe 3 mit  $6,0 \pm 1,8$  mmHg über seinen Ausgangswert von  $0,0 \pm 0,0$  mmHg deutlich an. Hingegen blieb der PAP zum Zeitpunkt  $T_{2,5'}$  in der Kontrollgruppe und in der Gruppe 4 (Ausgangswerte in der Kontrollgruppe und in der Gruppe 4 zum Zeitpunkt  $T_0$ :  $0,0 \pm 0,0$  mmHg) mit  $-0,1 \pm 0,1$  mmHg bzw.  $2,1 \pm 1,4$  mmHg auf einem konstant niedrigen Niveau (Abb. 5, Tab. 4). Der Unterschied zur Gruppe 3 war für die Kontrollgruppe und die Gruppe 4 statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). In den folgenden Minuten kam es in der Gruppe 3 zwischenzeitlich zu einem Abfall des PAP (Abb. 5).

Zum Zeitpunkt  $T_{120'}$  hatte der PAP in Gruppe 3 ( $6,4 \pm 2,7$  mmHg) und in Gruppe 4 ( $4,1 \pm 2,1$  mmHg) gegenüber dem Ausgangsniveau leicht zugenommen. Zu diesem Zeitpunkt war die Zunahme des PAP in den Gruppen 3 und 4 nicht statistisch signifikant unterschiedlich.

Nach 150 Minuten kam es zu einem deutlichen Anstieg des PAP in der Gruppe 3 ( $10,6 \pm 4,1$  mmHg), während der PAP in der Kontrollgruppe ( $0,8 \pm 0,3$  mmHg) und in der Gruppe 4 ( $3,5 \pm 2,1$  mmHg) kaum Änderungen zeigte (Abb. 5, Tab. 4). Der Unterschied zwischen den Gruppen 3 und 4 war am Zeitpunkt  $T_{150'}$  statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ).

Zu Versuchsende lag der PAP in der Gruppe 3 um  $34,2 \pm 5,8$  mmHg über dem Ausgangswert, in der Gruppe 4 um  $2,6 \pm 2,0$  mmHg. Der Unterschied war statistisch signifikant ( $p < 0,01$ ). Der pulmonal-arterielle Druck der Kontrollgruppe lag nach 240 Minuten um  $1,3 \pm 0,2$  mmHg über dem Ausgangswert.



**Abb. 5**

Änderung des PAP (mmHg) über 240 Minuten am Modell der isolierten, ventilerten und perfundierten Kaninchenlunge.

Darstellung des pulmonal-arteriellen Druckverlaufes nach Gabe eines Inhibitor-Cocktails und nach Aktivierung von  $182,5 \pm 22,5 \times 10^5/l$  PMN zum Zeitpunkt T<sub>-10'</sub> (Gruppe 3), sowie Darstellung des Druckverlaufs mit zusätzlicher Gabe des Elastase-Inhibitors CE-1037 (Gruppe 4).

Der Kontrollgruppe 1 wurden keine weiteren Substanzen zugegeben.

| Zeit<br>(min) | Gruppe:1 (n = 8)         |                | Gruppe:3 (n = 8)         |                | Gruppe:4 (n = 8)         |                |
|---------------|--------------------------|----------------|--------------------------|----------------|--------------------------|----------------|
|               | Mittelwert<br>PAP (mmHg) | SE<br>± (mmHg) | Mittelwert<br>PAP (mmHg) | SE<br>± (mmHg) | Mittelwert<br>PAP (mmHg) | SE<br>± (mmHg) |
| 0             | 0                        | 0              | 0                        | 0              | 0                        | 0              |
| 2,5           | -0,05                    | 0,06           | 6,04                     | 1,84           | 2,06                     | 1,39           |
| 5             | 0,02                     | 0,11           | 4,32                     | 1,46           | 3,88                     | 0,98           |
| 10            | -0,02                    | 0,14           | 2,90                     | 0,82           | 3,20                     | 1,96           |
| 15            | -0,03                    | 0,15           | 2,68                     | 0,73           | 3,20                     | 1,89           |
| 30            | -0,35                    | 0,12           | 1,83                     | 0,76           | 3,35                     | 1,81           |
| 60            | -0,17                    | 0,26           | 2,25                     | 0,64           | 4,38                     | 2,58           |
| 90            | 0,30                     | 0,28           | 4,24                     | 0,78           | 4,31                     | 2,43           |
| 120           | 0,51                     | 0,32           | 6,44                     | 2,73           | 4,11                     | 2,13           |
| 150           | 0,80                     | 0,29           | 10,55                    | 4,07           | 3,50                     | 2,06           |
| 180           | 0,90                     | 0,24           | 15,90                    | 5,17           | 2,91                     | 2,18           |
| 210           | 1,05                     | 0,17           | 24,00                    | 5,28           | 2,70                     | 2,05           |
| 240           | 1,33                     | 0,17           | 34,22                    | 5,82           | 2,61                     | 1,95           |

**Tab. 4**

Veränderung des PAP [Mittelwerte und Standardfehler (SE)] in den Gruppen 1, 3 und 4 .

### 3.3.4. Elastasekonzentration

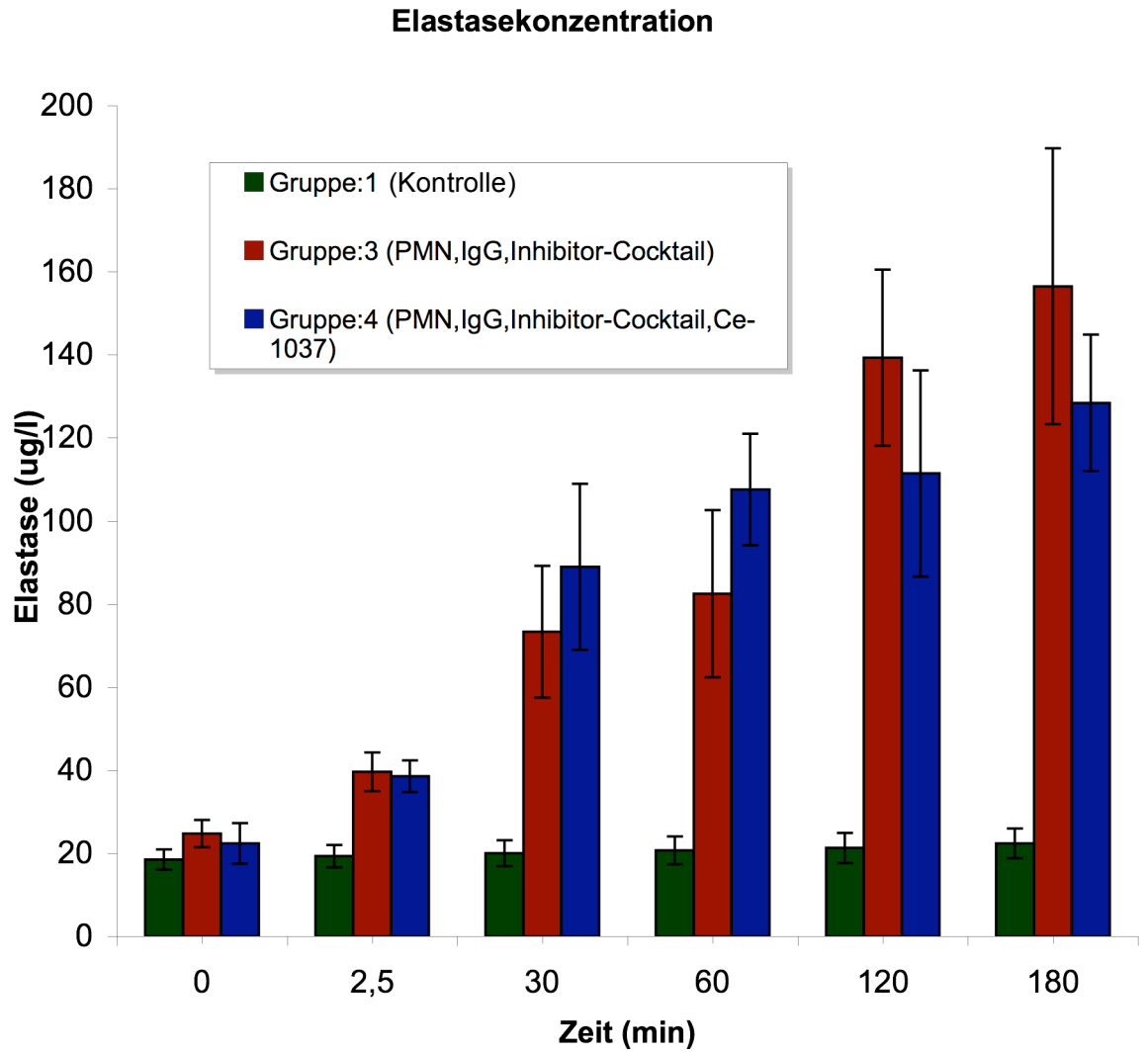
Zu Beginn der Versuchsreihen bestanden in allen 3 Gruppen vergleichbar niedrige Elastasekonzentrationen (Abb. 6). Zum Zeitpunkt  $T_0$  lag die Kontrollgruppe 1 bei  $18,4 \pm 2,5 \mu\text{g/l}$ , die Gruppe 3 bei  $24,7 \pm 3,3 \mu\text{g/l}$  und die Gruppe 4 bei  $22,3 \pm 4,9 \mu\text{g/l}$ . Die Messwerte der Gruppen 3 und 4 waren im Vergleich zur Kontrollgruppe leicht erhöht. Diese Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant ( $p > 0,05$ ).

Nach Stimulation der Granulozyten zum Zeitpunkt  $T_{2,5'}$  nahm die Elastasekonzentration in der Versuchsgruppe 3 von  $24,7 \pm 3,3 \mu\text{g/l}$  auf  $39,6 \pm 4,7 \mu\text{g/l}$  und in der Gruppe 4 von  $22,3 \pm 4,9 \mu\text{g/l}$  auf  $38,5 \pm 3,7 \mu\text{g/l}$  zu. Die Elastasekonzentration der Kontrollgruppe 1 stieg von  $18,4 \pm 2,5 \mu\text{g/l}$  auf  $19,3 \pm 2,7 \mu\text{g/l}$ . Der Unterschied zwischen Kontrollgruppe 1 und den Gruppen 3 und 4 war zum Zeitpunkt  $T_{2,5'}$  statistisch signifikant (jeweils  $p < 0,01$ ).

Zum Zeitpunkt  $T_{60'}$  lagen die Elastasekonzentrationen der Gruppe 3 mit  $82,5 \pm 20,1 \mu\text{g/l}$  und der Gruppe 4 mit  $107,6 \pm 13,4 \mu\text{g/l}$  ebenfalls statistisch signifikant über den Werten der Kontrollgruppe 1 mit  $20,7 \pm 3,4 \mu\text{g/l}$  (jeweils  $p < 0,01$ ).

Bis zum Ende der Versuchsreihen bei  $T_{180'}$  stieg die Elastasekonzentration kontinuierlich auf  $156,5 \pm 33,3 \mu\text{g/l}$  in der Gruppe 3 beziehungsweise auf  $128,5 \pm 16,4 \mu\text{g/l}$  in der Gruppe 4 an (Abb. 6, Tab. 5). Zu diesem Zeitpunkt lagen die Elastasekonzentrationen der Gruppen 3 und 4 ebenfalls statistisch signifikant (jeweils  $p < 0,01$ ) über denen der Kontrollgruppe 1 mit  $22,4 \pm 3,6 \mu\text{g/l}$ .





**Abb. 6**

Elastasekonzentration ( $\mu\text{g/l}$ ) über 180 Minuten am Modell der isolierten, ventilerten und perfundierten Kaninchenlunge.

Darstellung der Elastasekonzentration mit (Gruppe 4) und ohne Gabe des Elastase-Inhibitors CE-1037 (Gruppe 3).

Der Kontrollgruppe 1 wurden keine weiteren Substanzen zugegeben.

| Zeit<br>(min) | Gruppe:1 (n = 8) |        | Gruppe:3 (n = 8) |        | Gruppe:4 (n = 8) |        |
|---------------|------------------|--------|------------------|--------|------------------|--------|
|               | Mittelwert       | SE     | Mittelwert       | SE     | Mittelwert       | SE     |
|               | Elastase (µg/l)  | (µg/l) | Elastase (µg/l)  | (µg/l) | Elastase (µg/l)  | (µg/l) |
| 0             | 18,44            | 2,45   | 24,73            | 3,30   | 22,35            | 4,90   |
| 2,5           | 19,28            | 2,70   | 39,58            | 4,66   | 38,53            | 3,79   |
| 30            | 19,98            | 3,11   | 73,33            | 15,85  | 88,96            | 20,01  |
| 60            | 20,70            | 3,37   | 82,50            | 20,14  | 107,56           | 13,43  |
| 120           | 21,28            | 3,63   | 139,33           | 21,18  | 111,46           | 24,82  |
| 180           | 22,36            | 3,60   | 156,54           | 33,26  | 128,46           | 16,41  |

**Tab. 5**

Elastasekonzentration [Mittelwerte und Standardfehler (SE)] in den Gruppen 1, 3 und 4 .

### 3.3.5. Histaminkonzentration

Am Anfang der Versuchsreihe bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den 3 Versuchsgruppen. Bei  $T_0$  lag die Histaminkonzentration in Gruppe 1 bei  $30,7 \pm 3,8$  pg/ml, in Gruppe 3 bei  $32,3 \pm 3,0$  pg/ml und in Gruppe 4 bei  $45,7 \pm 9,4$  pg/ml (Abb. 7, Tab. 6).

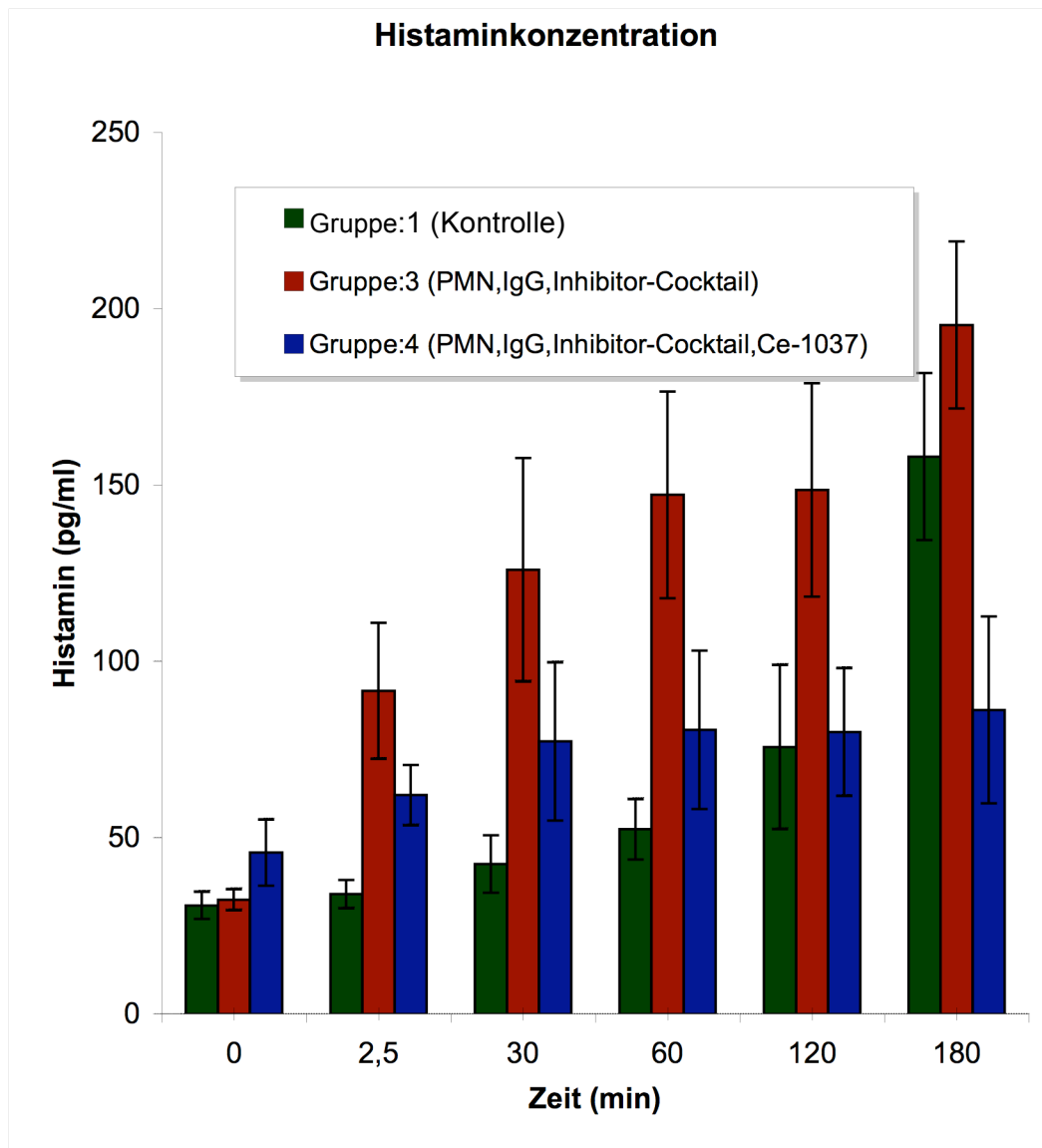
Nach Gabe von hitzeaggregierten Immunglobulinen kam es zum Zeitpunkt  $T_{2,5'}$  zu einem deutlichen Anstieg der Histaminkonzentration in der Gruppen 3 von  $32,3 \pm 3,0$  pg/ml auf  $91,6 \pm 19,3$  pg/ml und in der Gruppe 4 von  $45,7 \pm 9,4$  pg/ml auf  $62,0 \pm 8,5$  pg/ml. Die Histaminkonzentration der Kontrollgruppe 1 blieb in dieser Zeit annähernd auf dem Ausgangsniveau und stieg nur von  $30,7 \pm 3,8$  pg/ml auf  $34,03 \pm 4,0$  pg/ml.

Die Histaminkonzentration in der Versuchsgruppe 3 nahm bis zum Zeitpunkt  $T_{60'}$  kontinuierlich von  $32,3 \pm 3,0$  pg/ml auf  $147,2 \pm 29,3$  pg/ml zu, während es in der Kontrollgruppe 1 nur von  $30,7 \pm 3,8$  pg/ml auf  $52,3 \pm 8,6$  pg/ml, sowie in der Gruppe 4 von  $45,7 \pm 9,4$  pg/ml auf  $80,5 \pm 22,4$  pg/ml zu einem geringen Anstieg kam (Abb. 7, Tab. 6).

Zum Zeitpunkt  $T_{60'}$  war der Unterschied zwischen den Gruppen 3 und 4 statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ).

Nach dem Zeitpunkt  $T_{60'}$  kam es in den Gruppen 1 und 3 zu einem Anstieg der Histaminkonzentration, so dass nach 180 Minuten eine Endkonzentration von  $195,3 \pm 23,7$  pg/ml in Gruppe 3 und  $159,0 \pm 23,7$  pg/ml in Gruppe 1 gemessen wurde (Abb. 7, Tab. 6). Die Gruppe 4 zeigte keinen deutlichen Anstieg der Werte und lag zum Zeitpunkt  $T_{180'}$  bei  $86,2 \pm 26,5$  pg/ml.

Auch die Endkonzentration war in den Gruppen mit und ohne CE-1037 statistisch signifikant unterschiedlich ( $p < 0,01$ ).



**Abb. 7**

Anstieg der Histaminkonzentration (pg/ml) über 180 Minuten am Modell der isolierten, ventilierten und perfundierten Kaninchenlunge.

Darstellung der Histaminkonzentration mit (Gruppe 4) und ohne Gabe des Elastase-Inhibitors CE-1037 (Gruppe 3).

Der Kontrollgruppe 1 wurden keine weiteren Substanzen zugegeben.

| Zeit<br>(min) | Gruppe:1 (n = 8) |         | Gruppe:3 (n = 8) |         | Gruppe:4 (n = 8) |         |
|---------------|------------------|---------|------------------|---------|------------------|---------|
|               | Mittelwert       | SE      | Mittelwert       | SE      | Mittelwert       | SE      |
|               | Histamin (pg/ml) | (pg/ml) | Histamin (pg/ml) | (pg/ml) | Histamin (pg/ml) | (pg/ml) |
| 0             | 30,74            | 3,82    | 32,32            | 3,01    | 45,70            | 9,41    |
| 2,5           | 33,95            | 4,02    | 91,61            | 19,29   | 62,01            | 8,52    |
| 30            | 42,49            | 8,13    | 125,90           | 31,66   | 77,23            | 22,45   |
| 60            | 52,34            | 8,56    | 147,16           | 29,30   | 80,53            | 22,44   |
| 120           | 75,65            | 23,28   | 148,25           | 30,28   | 79,90            | 18,11   |
| 180           | 158,97           | 23,70   | 195,31           | 23,67   | 86,18            | 26,49   |

**Tab. 6**

Histaminkonzentration [Mittelwerte und Standardfehler (SE)] in den Gruppen 1, 3 und 4 .

### 3.3.6 Versuchsgruppen II

In den nun folgenden Versuchsreihen (Gruppe 5 und Gruppe 6) wurden 10 ml autologes Kaninchenplasma zum Zeitpunkt  $T_{-12'}$  in das Perfusionsmedium zugegeben.

Durch das Kaninchenplasma sollten dem zirkulierenden Perfusionsmedium Plasmaproteine, wie z.B. Transportproteine, Komplementfaktoren, Enzyme und Enzyminhibitoren, zugeführt werden.

Am Ende des jeweiligen Kapitels werden die Versuchsgruppen I und II gemeinsam dargestellt.

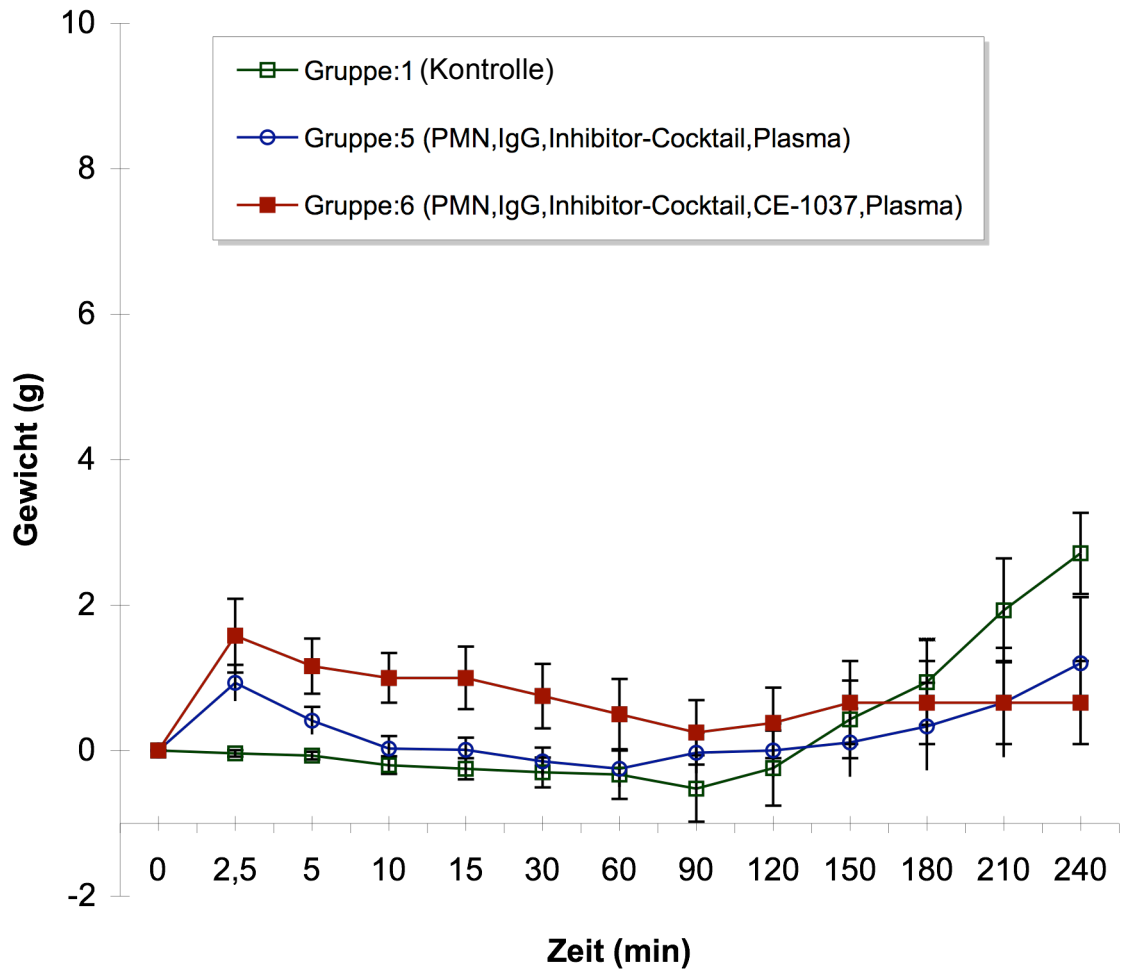
- 1.Kontrollgruppe: Bei diesen Versuchen wurden der Krebs-Henseleit-HAES-Pufferlösung (KHHB) nach Perfusatwechsel und Abschluss der Steady-State Phase keine weitere Substanz zugesetzt. (n=8)
- 5.Gruppe: Zum Zeitpunkt  $T_{-20'}$ , wurde dem frisch ausgetauschten KHHB der Inhibitor-Cocktail zugeführt. Zehn Minuten später zum Zeitpunkt  $T_{-10'}$ , wurden  $182,5 \pm 22,5 \times 10^5/l$  humane PMN hinzugegeben, bei  $T_{-12'}$  wurde das Kaninchenplasma dem zirkulierenden KHHB langsam in einer Menge von 10 ml zugesetzt. Bei  $T_0$  wurden 100 mg hitzeaggregiertes Immunglobulin dem KHHB zugegeben. (n=8)
- 6.Gruppe: In dieser Gruppe wurde bis auf eine zusätzlichen Verabreichung des Elastase-Inhibitors CE-1037 analog zur Gruppe 5 verfahren. Zum Zeitpunkt  $T_{-15'}$  wurden 4 ml einer Gebrauchslösung (CE-1037, 1mg/ml) langsam als Bolus appliziert. Weitere 16 ml (CE-1037, 1mg/ml) wurden kontinuierlich über einen Perfusor mit 3,3 ml/h dem System zugeführt. (n=8)

### 3.3.7. Veränderung des Lungengewichtes

Innerhalb der ersten 2,5 Minuten kam es in der Gruppe 5 ( $n = 8$ ) und in der Gruppe 6 ( $n = 8$ ) zu einem Anstieg des Lungengewichtes (Tab. 7, Abb. 8). Das Lungengewicht hatte zum Zeitpunkt  $T_{2,5'}$  in der Gruppe 5 um  $0,9 \pm 0,3$  g und in der Gruppe 6 um  $1,6 \pm 0,5$  g zugenommen. Dagegen blieb das Lungengewicht der Kontrollgruppe auf dem Ausgangsniveau ( $-0,04 \pm 0,04$  g). Der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den Gruppen 5 und 6 war zum Zeitpunkt  $T_{2,5'}$  statistisch signifikant (jeweils  $p < 0,05$ ). Anschließend war das Lungengewicht in den Gruppen 5 und 6 leicht rückläufig, so dass zwischen den Versuchsgruppen während der folgenden 120 Minuten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Veränderung des Lungengewichts gegenüber dem Ausgangsgewicht bestanden. Diese gleich bleibende Tendenz zeigte sich bei den Versuchsgruppen 5 und 6 durchgehend bis zum Ende der Versuche, wobei in Gruppe 5 nach 240 Minuten eine Gewichtszunahme von  $1,2 \pm 0,9$  g und in Gruppe 6 von  $0,7 \pm 0,6$  g vorlag (Tab. 7, Abb. 8). Die Kontrollgruppe zeigte nach 120 Minuten dagegen einen leichten, stetigen Anstieg des Lungengewichtes und erreichte eine Gewichtszunahme von  $2,7 \pm 0,6$  g gegenüber dem Ausgangsgewicht. Nach 240 Minuten bestanden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen 1, 5 und 6.

Gruppe 5 und 6 unterschieden sich jedoch bereits nach 90 Minuten statistisch signifikant gegenüber den Versuchsgruppen 3 und 4 (Abb. 8a). Nach 90 Minuten lag das Lungengewicht in Gruppe 5 bei  $-0,03 \pm 0,28$  g und bei Gruppe 6 bei  $0,3 \pm 0,4$  g, damit lagen sie statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) unterhalb der Werte der Gruppe 3 ( $5,0 \pm 0,8$  g) und Gruppe 4 ( $1,7 \pm 0,8$  g). Bis zum Ende der Versuchsreihen bei  $T_{240'}$  bestand ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen 5 ( $1,2 \pm 0,9$  g), Gruppe 6 ( $0,7 \pm 0,6$  g) und Gruppe 3 ( $28,9 \pm 4,4$  g), Gruppe 4 ( $16,5 \pm 1,6$  g). Das Lungengewicht der Gruppe 5 und 6 lag demnach ab  $T_{90'}$  statistisch signifikant unterhalb derer der Gruppe 3 und 4 (Abb. 8a).

## Gewichtsveränderung



### **Abb. 8**

Änderung des Lungengewichtes (g) über 240 Minuten am Modell der isolierten, ventilerten und perfundierten Kaninchenlunge.

Darstellung des Gewichtanstieges nach Gabe von  $182,5 \pm 22,5 \times 10^5/l$  humane PMN bei  $T_{-12'}$ , 10 ml Kaninchenplasma zum Zeitpunkt  $T_{-10'}$ , und 100 mg hitzeaggregiertes Immunglobulin bei  $T_0$  (Gruppe 5), sowie zusätzlicher Verabreichung des Elastase-Inhibitors CE-1037 zum Zeitpunkt  $T_{-15'}$  (Gruppe 6). Der Kontrollgruppe 1 wurden keine weiteren Substanzen zugegeben.

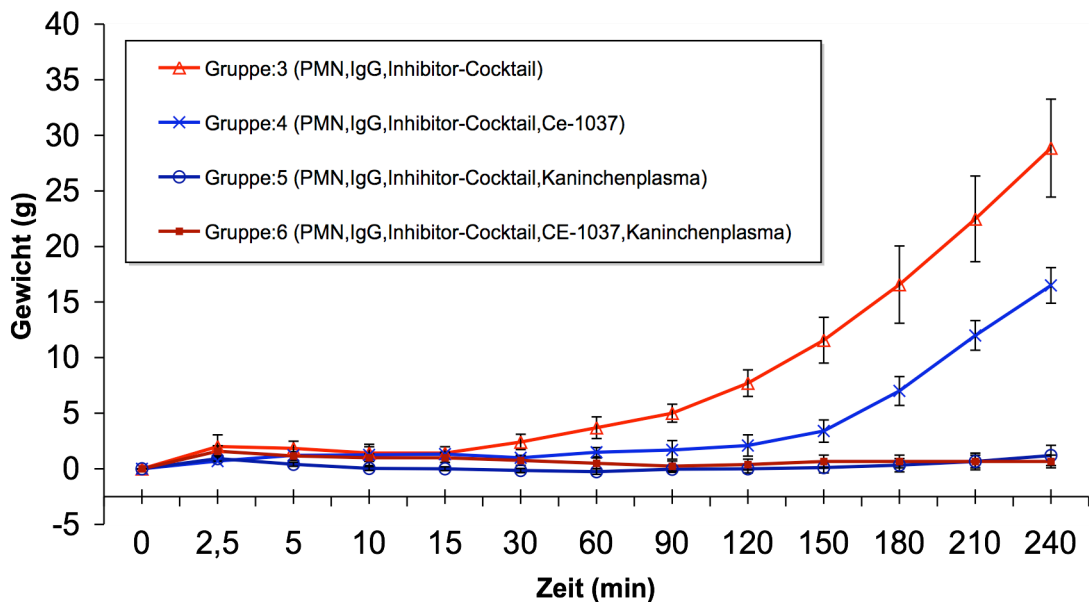


| Zeit (min) | Gruppe:1 (n = 8)       |          | Gruppe:5 (n = 8)       |          | Gruppe:6 (n = 8)       |          |
|------------|------------------------|----------|------------------------|----------|------------------------|----------|
|            | Mittelwert Gewicht (g) | SE ± (g) | Mittelwert Gewicht (g) | SE ± (g) | Mittelwert Gewicht (g) | SE ± (g) |
| 0          | 0,00                   | 0,00     | 0                      | 0,00     | 0,00                   | 0,00     |
| 2,5        | -0,04                  | 0,04     | 0,93                   | 0,25     | 1,58                   | 0,51     |
| 5          | -0,07                  | 0,05     | 0,41                   | 0,19     | 1,17                   | 0,38     |
| 10         | -0,20                  | 0,12     | 0,03                   | 0,17     | 1,00                   | 0,34     |
| 15         | -0,25                  | 0,15     | 0,01                   | 0,17     | 1,00                   | 0,43     |
| 30         | -0,30                  | 0,20     | -0,15                  | 0,19     | 0,75                   | 0,44     |
| 60         | -0,33                  | 0,33     | -0,25                  | 0,25     | 0,50                   | 0,48     |
| 90         | -0,52                  | 0,46     | -0,03                  | 0,28     | 0,25                   | 0,44     |
| 120        | -0,24                  | 0,52     | 0,00                   | 0,37     | 0,38                   | 0,49     |
| 150        | 0,43                   | 0,53     | 0,11                   | 0,47     | 0,67                   | 0,57     |
| 180        | 0,94                   | 0,59     | 0,33                   | 0,60     | 0,67                   | 0,57     |
| 210        | 1,93                   | 0,71     | 0,66                   | 0,75     | 0,67                   | 0,57     |
| 240        | 2,71                   | 0,56     | 1,20                   | 0,91     | 0,67                   | 0,57     |

**Tab. 7**

Gewichtszunahme [Mittelwerte und Standardfehler (SE)] in den Gruppen 1, 5 und 6 .

### Gewichtsveränderung



**Abb. 8a**

Änderung des Lungengewichtes (g) über 240 Minuten am Modell der isolierten, ventilerten und perfundierten Kaninchenlunge.

Gesamtdarstellung Hauptversuche (Versuchsgruppen I und II).

### 3.3.8. Veränderung des pulmonal-arteriellen Druckes

In der Anfangsphase kam es, wie bei der Zunahme des Lungengewichts, zu einem raschen Anstieg des PAP in der Gruppe mit Kaninchenplasma ohne CE-1037 (Gruppe 5) und in der Gruppe mit Kaninchenplasma und CE-1037 (Gruppe 6). Nach 2,5 Minuten lag der PAP in der Gruppe 5 um  $5,8 \pm 0,4$  mmHg und in der Gruppe 6 um  $7,1 \pm 1,5$  mmHg über den Ausgangswerten von  $0,0 \pm 0,0$  mmHg (Tab. 8, Abb. 9).

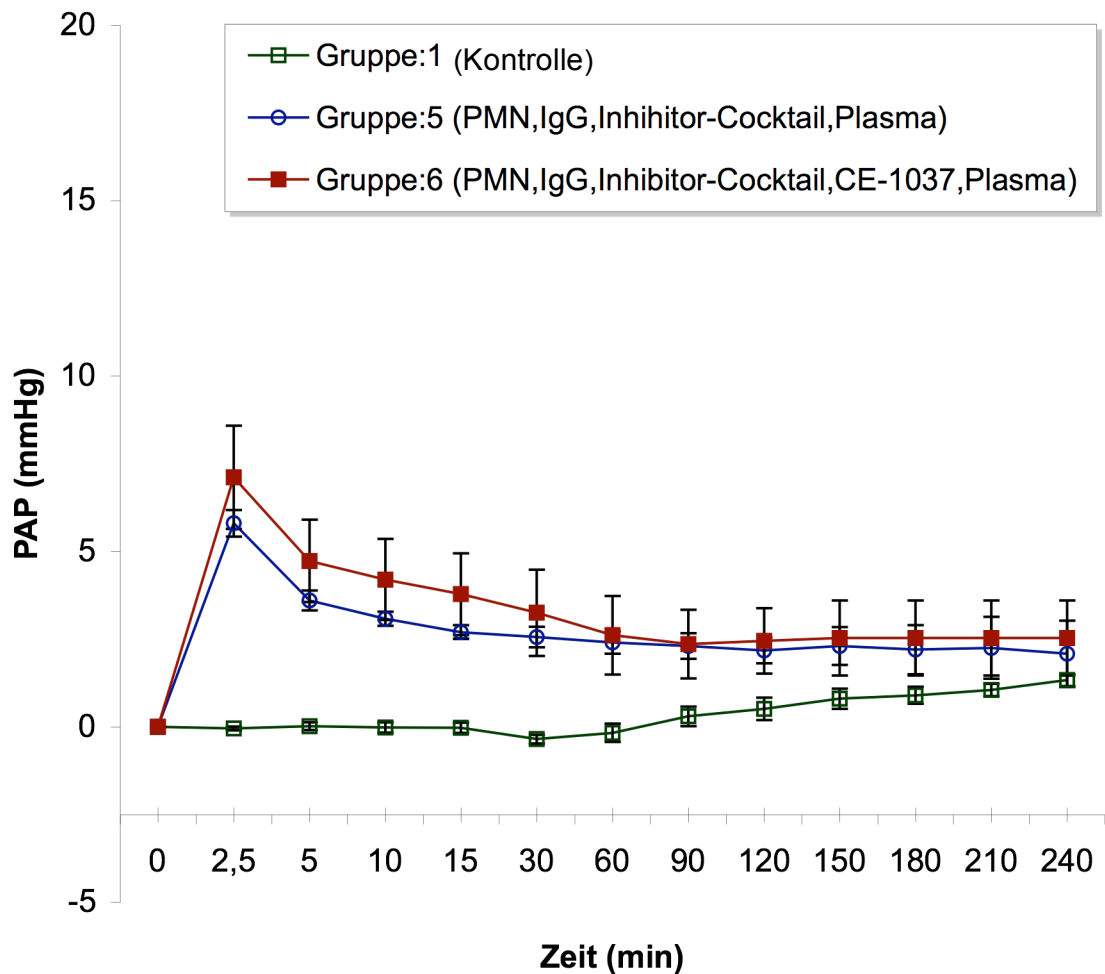
Der pulmonal-arterielle Druck der Kontrollgruppe fiel dagegen von  $0,0 \pm 0,0$  mmHg auf  $-0,1 \pm 0,1$  mmHg und lag zum Zeitpunkt  $T_{2,5}$  statistisch signifikant niedriger als der PAP der Gruppen 5 und 6 ( $p < 0,05$ ).

Im weiteren Verlauf kam es in den Gruppen 5 und 6 nach einem leichten Rückgang des PAP zu einem nahezu isobaren Kurvenverlauf bis zum Ende der Versuchsdauer. Nach 240 Minuten lag der PAP in der Versuchsgruppe 5 um  $2,1 \pm 0,2$  mmHg und in der Gruppe 6 um  $2,5 \pm 1,1$  mmHg über den Ausgangswerten von  $0,0 \pm 0,0$  mmHg (Tab. 8, Abb. 9).

Die Kontrollgruppe zeigte nach 60 Minuten einen flachen Anstieg des PAP und erreichte nach 240 Minuten eine Zunahme von  $1,3 \pm 0,2$  mmHg über dem Ausgangswert. Am Ende der Versuchsreihen bestanden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

Gruppe 4, 5 und 6 unterschieden sich statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) von Gruppe 3 ab  $T_{150}$  (Abb. 9a). Nach 150 Minuten lag der PAP der Versuchsgruppe 4 bei  $3,5 \pm 2,1$  mmHg, der Gruppe 5 bei  $2,3 \pm 0,5$  mmHg und der Gruppe 6 bei  $2,5 \pm 1,1$  mmHg. Der PAP der Versuchsgruppe 3 lag zum gleichen Zeitpunkt bei  $10,6 \pm 4,1$  mmHg und war damit statistisch signifikant höher als in der Gruppen 4, 5 und 6. Bis zum Ende der Versuchsreihen bei  $T_{240}$  lag die Gruppe 3 bei  $34,2 \pm 5,6$  mmHg (Abb.9a) und unterschied sich damit statistisch signifikant von Gruppe 4 ( $2,6 \pm 2,0$  mmHg), Gruppe 5 ( $2,1 \pm 0,9$  mmHg) und Gruppe 6 ( $2,5 \pm 1,1$  mmHg).

## Veränderung des PAP



### **Abb. 9**

Änderung des pulmonal-arteriellen Druckes über 240 Minuten am Modell der isolierten, ventilierten und perfundierten Kaninchenlunge.

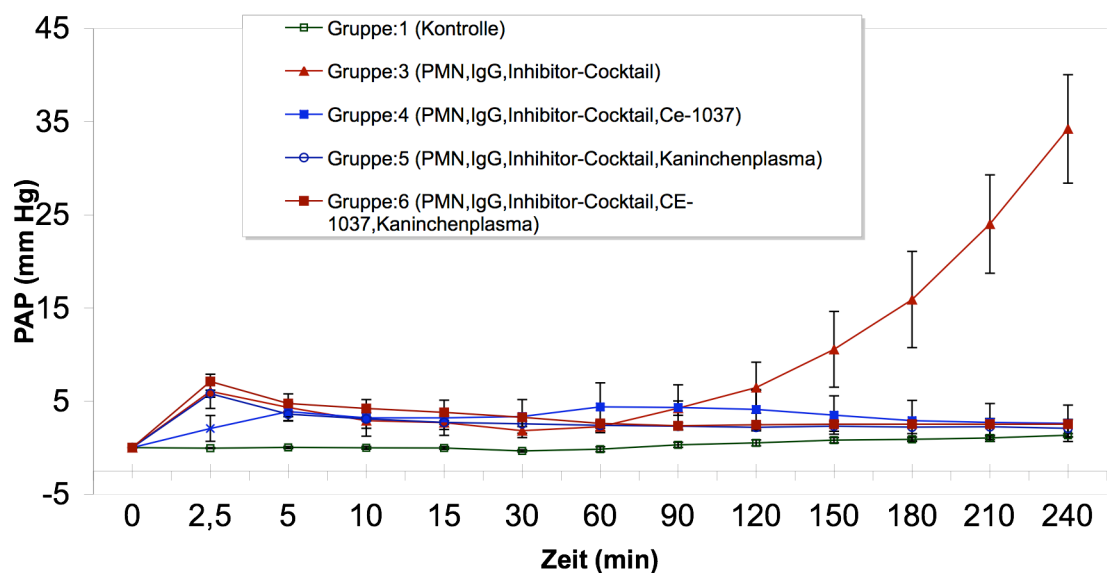
Darstellung des Druckverlaufes nach Gabe von  $182,5 \pm 22,5 \times 10^5/l$  humane PMN bei  $T_{-12'}$ , 10 ml Kaninchenplasma zum Zeitpunkt  $T_{-10'}$ , und 100 mg hitzeaggregiertes Immunglobulin bei  $T_0'$  (Gruppe 5), sowie zusätzlicher Verabreichung des Elastase-Inhibitors CE-1037 zum Zeitpunkt  $T_{-15'}$  (Gruppe 6). Der Kontrollgruppe 1 wurden keine weiteren Substanzen zugegeben.

| Zeit (min) | Gruppe:1 (n = 8)      |           | Gruppe:5 (n = 8)      |           | Gruppe:6 (n = 8)      |           |
|------------|-----------------------|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|-----------|
|            | Mittelwert PAP (mmHg) | SE (mmHg) | Mittelwert PAP (mmHg) | SE (mmHg) | Mittelwert PAP (mmHg) | SE (mmHg) |
| 0          | 0,00                  | 0,00      | 0,00                  | 0,00      | 0,00                  | 0,00      |
| 2,5        | -0,05                 | 0,06      | 5,80                  | 0,38      | 7,11                  | 1,47      |
| 5          | 0,02                  | 0,11      | 3,60                  | 0,28      | 4,73                  | 1,18      |
| 10         | -0,02                 | 0,14      | 3,08                  | 0,20      | 4,20                  | 1,16      |
| 15         | -0,03                 | 0,15      | 2,70                  | 0,20      | 3,78                  | 1,16      |
| 30         | -0,35                 | 0,12      | 2,56                  | 0,29      | 3,25                  | 1,23      |
| 60         | -0,17                 | 0,26      | 2,40                  | 0,32      | 2,61                  | 1,12      |
| 90         | 0,30                  | 0,28      | 2,30                  | 0,37      | 2,36                  | 0,98      |
| 120        | 0,51                  | 0,32      | 2,18                  | 0,37      | 2,45                  | 0,93      |
| 150        | 0,80                  | 0,29      | 2,30                  | 0,54      | 2,53                  | 1,07      |
| 180        | 0,90                  | 0,24      | 2,20                  | 0,70      | 2,53                  | 1,07      |
| 210        | 1,05                  | 0,17      | 2,25                  | 0,88      | 2,53                  | 1,07      |
| 240        | 1,33                  | 0,17      | 2,08                  | 0,94      | 2,53                  | 1,07      |

**Tab. 8**

Veränderung des PAP [Mittelwerte und Standardfehler (SE)] in den Gruppen 1, 5 und 6 .

### Veränderung des PAP



**Abb. 9a**

Änderung des pulmonal-arteriellen Druckes über 240 Minuten am Modell der isolierten, ventilerten und perfundierten Kaninchenlunge.

Gesamtdarstellung Hauptversuche (Versuchsgruppen I und II).

### 3.3.9. Histaminkonzentration

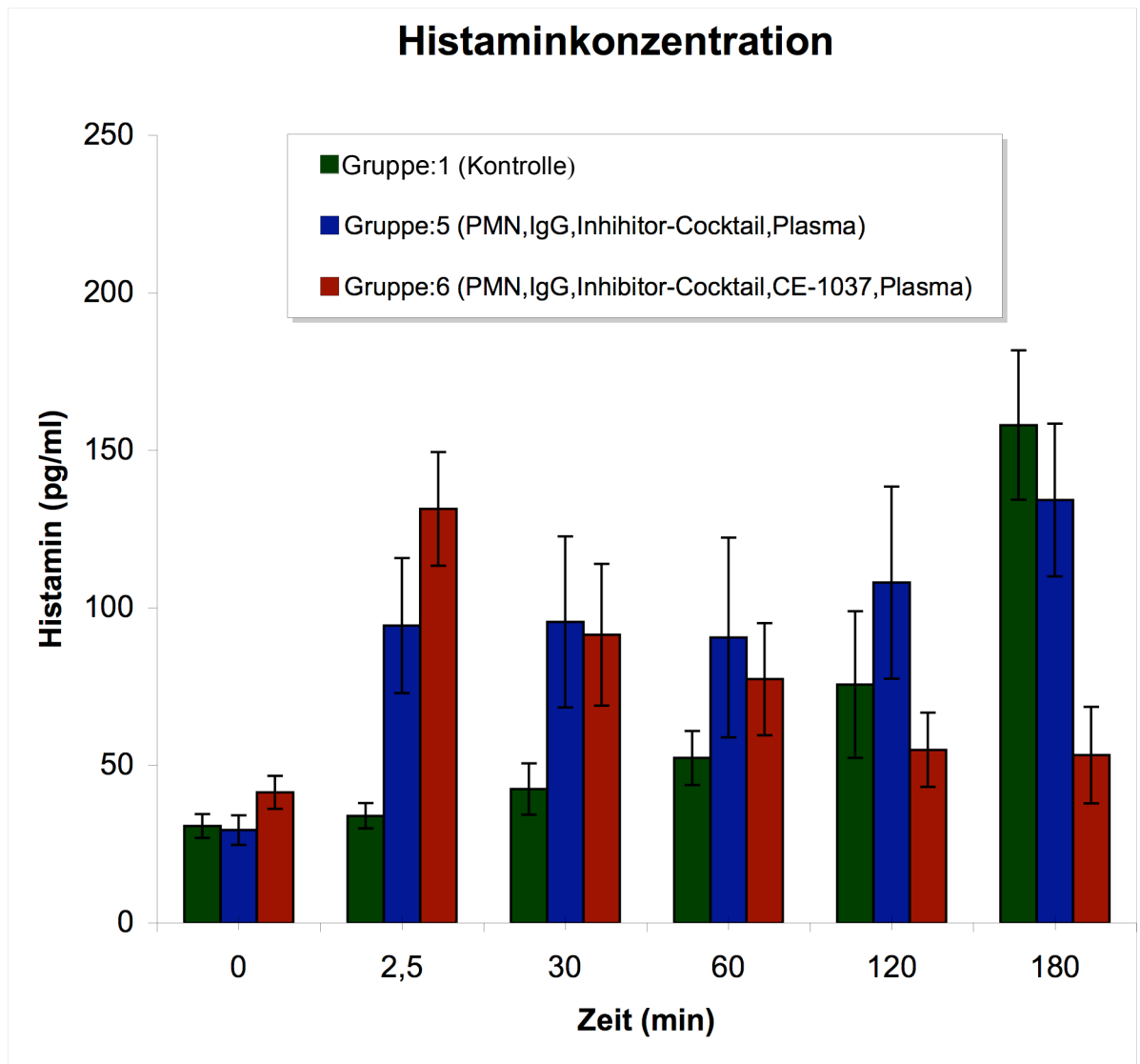
Zu Beginn der Versuchsreihe bestanden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen 1, 5 und 6. Bei  $T_0$  lag die Histaminkonzentration in Gruppe 1 bei  $30,7 \pm 3,8$  pg/ml, in Gruppe 5 bei  $29,5 \pm 4,7$  pg/ml und in Gruppe 6 bei  $41,4 \pm 5,2$  pg/ml (Abb. 10, Tab. 9).

Nach Gabe von hitzeaggregierten Immunglobulinen kam es zum Zeitpunkt  $T_{2,5'}$  zu einem deutlichen Anstieg der Histaminkonzentration in den Gruppen 5 und 6. Gruppe 5 stieg von  $29,5 \pm 4,7$  pg/ml auf  $94,4 \pm 21,4$  pg/ml und Gruppe 6 stieg von  $41,4 \pm 5,2$  pg/ml auf  $131,4 \pm 18,0$  pg/ml.

Die Histaminkonzentration der Kontrollgruppe blieb zu diesem Zeitpunkt annähernd auf dem Ausgangsniveau. Sie stieg von  $30,7 \pm 3,8$  pg/ml auf  $34,0 \pm 4,0$  pg/ml und war damit statistisch signifikant niedriger als in den Gruppen 5 ( $p < 0,05$ ) und 6 ( $p < 0,01$ ).

Im Folgenden kam es in den Gruppen 1 und 5 zu einem leichten, stetigen Anstieg der Histaminkonzentration, so dass nach 180 Minuten eine Endkonzentration von  $134,2 \pm 24,2$  pg/ml in der Gruppe 5 und  $159,0 \pm 23,7$  pg/ml in der Gruppe 1 gemessen wurde (Abb. 10, Tab. 9). In der Gruppe 6 kam es zu einem deutlichen Abfall der Histaminkonzentration auf eine Endkonzentration von  $53,5 \pm 15,5$  pg/ml. Zum Zeitpunkt  $T_{180'}$  war der Unterschied zwischen den Gruppen 5 und 6 statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ).

Die Histaminkonzentration in der Versuchsgruppe 3 nahm bis zum Zeitpunkt  $T_{60'}$  kontinuierlich von  $32,3 \pm 3,0$  pg/ml auf  $147,2 \pm 29,3$  pg/ml zu, während es in der Gruppe 4 von  $45,7 \pm 9,4$  pg/ml auf  $80,5 \pm 22,4$  pg/ml zu einem geringen Anstieg kam (Abb. 10a). Zum Zeitpunkt  $T_{60'}$  war der Unterschied zwischen den Gruppen 3 und 4 statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). Gruppe 4 ( $45,7 \pm 9,4$  pg/ml), Gruppe 5 ( $90,6 \pm 31,7$  pg/ml) und Gruppe 6 ( $77,3 \pm 17,8$  pg/ml) lagen mit den Histaminkonzentrationen zum Zeitpunkt  $T_{60'}$  auf gleich hohem Niveau und unterschieden sich nicht statistisch signifikant voneinander. Bei  $t_{180'}$  unterschieden sich Gruppe 4 ( $86,2 \pm 26,5$  pg/ml), Gruppe 5 ( $134,2 \pm 24,2$  pg/ml) und Gruppe 6 ( $53,5 \pm 15,4$  pg/ml) statistisch signifikant von Gruppe 3 ( $195,3 \pm 23,7$  pg/ml).



**Abb. 10**

Histaminkonzentration (pg/ml) über 180 Minuten am Modell der isolierten, ventilerten und perfundierten Kaninchenlunge.

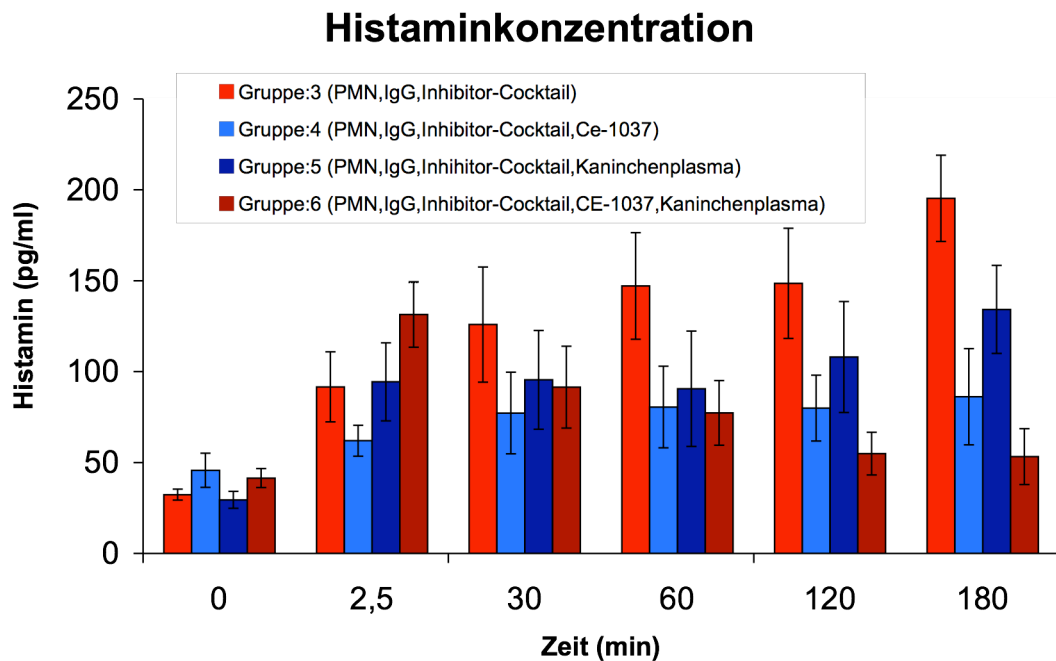
Darstellung der Histaminkonzentration mit (Gruppe 6) und ohne Gabe des Elastase-Inhibitors CE-1037 (Gruppe 5).

Der Kontrollgruppe 1 wurden keine weiteren Substanzen zugegeben.

| Zeit (min) | Gruppe:1 (n = 8) |         | Gruppe:5 (n = 8) |         | Gruppe:6 (n = 8) |         |
|------------|------------------|---------|------------------|---------|------------------|---------|
|            | Mittelwert       | SE      | Mittelwert       | SE      | Mittelwert       | SE      |
|            | Histamin (pg/ml) | (pg/ml) | Histamin (pg/ml) | (pg/ml) | Histamin (pg/ml) | (pg/ml) |
| 0          | 30,74            | 3,82    | 29,45            | 4,68    | 41,42            | 5,23    |
| 2,5        | 33,95            | 4,02    | 94,37            | 21,42   | 131,42           | 18,01   |
| 30         | 42,49            | 8,13    | 95,49            | 27,15   | 91,45            | 22,48   |
| 60         | 52,34            | 8,56    | 90,55            | 31,71   | 77,34            | 17,79   |
| 120        | 75,65            | 23,28   | 108,00           | 30,51   | 54,33            | 11,79   |
| 180        | 158,97           | 23,70   | 134,22           | 24,24   | 53,53            | 15,36   |

**Tab. 9**

Histaminkonzentration [Mittelwerte und Standardfehler (SE)] in den Gruppen 1, 5 und 6 .



**Abb. 10a**

Histaminkonzentration (pg/ml) über 180 Minuten am Modell der isolierten, ventilerten und perfundierten Kaninchenlunge.

Gesamtdarstellung Hauptversuche (Versuchsgruppen I und II).

## 4. Diskussion

Grundlage der Versuche am Modell der isolierten, ventilerten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge war die Beobachtung, dass es in fortgeschrittenen Stadien der Sepsis und des Lungenversagens des Erwachsenen (ARDS) zu einer Leukostase in der Lungenstrombahn mit konsekutiver Freisetzung verschiedener Mediatoren kommt. Die Mediatorenausschüttung ist die Hauptursache der massiven Veränderungen der vaskulären Permeabilität bei ARDS [5, 26, 28].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Zugabe des kleinmolekularen, oxidationsresistenten Proteasen-Inhibitors CE-1037 die Entstehung einer durch intravasale Granulozytenstimulation ausgelösten pulmonalen Permeabilitätsstörung verhindert werden kann.

Bei dem für diese Arbeit eingesetzten Modell der isolierten Kaninchenlunge wurde in voran gegangenen Studien [116, 198, 202] ebenso sowie in eigenen Versuchsreihen nachgewiesen, dass die Lungen ohne Erhöhung des pulmonal-arteriellen Druckes beziehungsweise ohne Aktivierung des AA-Metabolismus sowie ohne nennenswerte Veränderungen der Flüssigkeitsfiltration mit Änderung des Lungengewichtes für die Beobachtungsdauer von 4 Stunden nach Erreichen der Steady-State Phase stabil bleiben.

Für die Vor- und Hauptversuche dieser Arbeit wurde ein zellfreies Perfusionsmedium verwendet, um die komplexen, kaum kalkulierbaren Einflüsse der verschiedenen zirkulierenden Zellen auf das Gefäßendothel der isolierten Lunge auszuschließen. Durch das zellfreie Medium wurden daneben Interaktionen mit den klassischen humoralen Kaskadensystemen vermieden, durch die die direkte Einwirkung des applizierten Inhibitors CE-1037 auf die Gefäßwand möglicherweise maskiert worden wäre.

Neben der Lungengewichtszunahme wurde in den Versuchsreihen der pulmonal-arterielle Druck erfasst. Für die in der Literatur beschriebenen, stark abweichenden Werte dieser Parameter [130, 164, 202, 231] scheint neben der



Vielzahl der Techniken und Methoden besonders die Zusammensetzung des Perfusats verantwortlich zu sein. Hierbei ist der Proteingehalt des Perfusionsmediums besonders zu beachten. Um physiologische Bedingungen zu simulieren wurde dem Perfusionsmedium daher Humanalbumin zugesetzt, unter Berücksichtigung des kapillären Proteinreflexionskoeffizienten [34].

Die Einflüsse weiterer pathogenetischer Faktoren wurden durch die Gabe des Inhibitor-Cocktails, bestehend aus WEB 2086, Heparin-Natrium (Liquemin<sup>®</sup>) und Diclofenac-Natrium (Voltaren<sup>®</sup>), kontrolliert.

Durch die Applikation von WEB 2086 wurde der Einfluss des Plättchenaktivierenden Faktors (PAF) auf den pulmonal-arteriellen Widerstand unterdrückt [30, 105, 117, 175, 183, 232].

Evans et al. [50] konnten mit WEB 2086 in vitro die PAF-induzierte Plättchenaggregation sowie dosisabhängig die mikrovaskuläre Leckage des Lungenendothels hemmen. McCormack et al. [140] und Siebeck et al. [208] zeigten am Schwein, dass durch WEB 2086 die hypoxisch bedingte Vasokonstriktion in der Lunge sowie die pulmonale Dysfunktion beim Endotoxin-Schock deutlich abgeschwächt werden konnten.

PAF wird eine bedeutsame Rolle in der Pathogenese des ARDS und bestimmter Schockformen beigemessen [33, 80, 87, 214]. Untersuchungen von Matsumoto et al. [138] ergaben deutlich gesteigerte PAF-Konzentrationen in der bronchoalveolaren Spülflüssigkeit von ARDS-Patienten. Worthen et al. [240] stellten nach Verabreichung von PAF in Kaninchenlungen erhöhte Mengen an PMN sowie an Wasser und Albumin fest. Hwang et al. [90] wiesen im menschlichen Lungengewebe spezifische PAF-Rezeptoren nach, was für eine Beteiligung dieses Mediators an der Pathophysiologie von Lungenerkrankungen spricht.

Im Kaninchen und im Menschen wird PAF neben den PMN [33, 127] von verschiedenen Zellen synthetisiert. Samet et al. [184] wiesen die Bildung von PAF in menschlichen Bronchialepithelzellen und Warren et al. [232] in Alveolarmakrophagen von Mäusen nach. PAF erhöht direkt und indirekt über die Bildung von AA-Metaboliten wie TXA<sub>2</sub> und Leukotrien C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>) den Tonus und die Permeabilität der Lungengefäße [30, 45, 87, 88, 140, 170, 183, 207] und wirkt chemotaktisch und aktivierend auf Thrombozyten und Leukozyten [21,

42, 120, 184, 233, 240]. Schließlich zeigten Krögel et al. [120] an menschlichen eosinophilen Granulozyten und Schaberg et al. [187] an menschlichen Alveolarmakrophagen, dass PAF die Bildung von reaktiven O<sub>2</sub>-Spezies induziert und dadurch seine Wirkung auf Endothelzellen zu modulieren scheint.

Das nichtsteroidale Antiphlogistikum Diclofenac-Natrium (Voltaren®) blockiert die Prostaglandin- und Leukotriensynthese nach Stimulation von PMN [121, 193], es wurde aus diesem Grund dem Perfusionsmedium zugesetzt. Der initiale Anstieg des pulmonal-arteriellen Druckes und der vaskulären Permeabilität der Lunge wird in erster Linie dem Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) zugeschrieben, das eine pulmonale Vasokonstriktion bewirkt [194, 197, 199].

Neben einer Erhöhung der vaskulären Permeabilität wiesen Malik et al. [134] eine Förderung der Thrombozytenaggregation sowie der Granulozytenadhärenz an Endothelzellen durch Thromboxan nach.

Goldstein et al. [66] fanden, dass TXA<sub>2</sub> von PMN unabhängig vom Phagozytosereiz auch nach Stimulation der Zelloberfläche produziert wird. Überwiegend werden Cyclooxygenaseprodukte der Arachidonsäure jedoch von Zellen der Lungengefäßwand und des Lungengewebes gebildet und auf verschiedene Reize hin freigesetzt [198]. Baird et al. [5] konnten zeigen, dass eine durch reaktive O<sub>2</sub>-Produkte bedingte Endothelläsion einen adäquaten Stimulus zur Freisetzung von TXA<sub>2</sub> darstellt.

Neben Cyclooxygenaseprodukten geben PMN auch Leukotriene und andere Lipoxygenaseprodukte der AA ab, die ihrerseits die vaskuläre Permeabilität beeinflussen [24, 62, 134, 185, 215]. Zu den ausgeschütteten Mediatoren gehören die Leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>), D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>) und E<sub>4</sub> (LTE<sub>4</sub>). Palmblad et al. [167] wiesen nach, dass die Leukozytenadhäsion sowie die Leukozytenmigration durch LTB<sub>4</sub> in vitro gefördert werden. Am Modell der Hamsterbackentasche bewirkten LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> in den Versuchen von Dahlen et al. [44] eine deutliche Steigerung der Gefäßpermeabilität, während LTB<sub>4</sub> eine Leukozytenadhärenz an das Endothel postkapillärer Venolen verursachte. Samuelsson [185] stellte die zentrale Rolle der Leukotriene C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> und E<sub>4</sub> als „slow reacting substance of anaphylaxis“ (SRS-A) heraus und diskutierte neben den chemotaktischen und adhäsiven Eigenschaften von LTB<sub>4</sub> auch eine direkt aktivierende Wirkung auf PMN, durch die bei hohen

Konzentrationen von LTB<sub>4</sub> ein respiratorischer Burst und die Degranulation der Zellen ausgelöst werden könnte. Die Leukotriene werden zum überwiegenden Teil von PMN synthetisiert und abgesondert [17, 18, 52, 54, 60, 68, 125, 136, 139, 148, 204, 220].

Heparin-Natrium (Liquemin®) hemmt die Thrombinwirkung und konsekutiv die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin [15, 172, 212] und wurde aus diesem Grund dem Perfusionsmedium zugesetzt. Pletcher et al. [173] konnten anhand von kinetischen Studien zeigen, dass die Funktion von Heparin durch einen Antithrombin III-Heparinkomplex moduliert wird. Berry et al. [12] wiesen nach, dass dieser kovalente Bindungskomplex neben Thrombin auch Faktor Xa schnell inhibiert, der maßgeblich an der Umwandlung von Prothrombin (Faktor II) in Thrombin (Faktor IIa) beteiligt ist. Mittermeyer et al. [144] zeigten, dass die Aktivierung des Gerinnungssystems zu Mikrothrombosierungen der Lungenstrombahn führt. Wichtiger erscheinen heute jedoch die stimulierenden Wirkungen der Intermediärprodukte der Gerinnungskaskade und des Fibrinolyseystems. Barnhart et al. [7] wiesen die direkte schädigende Wirkung des Thrombins auf die Endothelzellen nach. Bayley et al. [8] zeigten im Tierexperiment, dass Fibrinopeptide einen Druckanstieg in den Lungengefäßen verursachen. Fibrinmonomere stimulieren direkt den AA-Metabolismus der Lunge, erhöhen den pulmonalen Strömungswiderstand und tragen wesentlich zur Entwicklung pulmonaler Störungen bei [156, 162]. Heparin-Natrium hemmt zusätzlich die Thrombozytenaggregation und kann dadurch die Freisetzung von vasoaktiven Substanzen aus Thrombozyten, wie zum Beispiel Serotonin, Thromboxan und Adrenalin, verhindern [151].

Die Dichtegradientenzentrifugation mit polyvinylpyrrolidon-beschichteten Silikonpartikeln nach Hjorth et al. [83] stellt eine gebräuchliche Methode zur Separation von humanen polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten dar. Mit ihr erfolgt die Isolierung der Granulozyten ohne Belastung für die funktionelle Aktivität mit 55%iger Ausbeute in 97%iger Reinheit.

Humane neutrophile Granulozyten können durch verschiedene Substanzen stimuliert werden. Nachgewiesen ist dies für Komplement, insbesondere C<sub>5a</sub> [14, 102, 153, 160], Phorbol-Myristat-Acetat [125], Endotoxin [47, 101, 102, 113,

154], Immunkomplexe [78, 79, 102] und hitzeaggregiertes IgG [79, 142]. In der vorliegenden Arbeit wurde als Stimulus zur Liberation von Mediatoren aus PMN hitzeaggregiertes IgG genutzt, das nach der Methode von Henson [79] hergestellt wurde. Aggregatbildung durch Hitzeeinfluss oder Antigenbindung führt zu einer Modifikation des IgG-Moleküls ohne Verlust der biologischen Aktivität und ohne Einbuße des F<sub>c</sub>-Stücks [236]. Hitzeaggregiertes IgG stellt einen physiologischen Phagozytosereiz dar, mit dem ausschließlich intravasal gelegene PMN stimuliert werden [78, 235]. Fehlen PMN, so löst hitzeaggregiertes IgG in der Lunge keine Reaktionen aus. Polymorphkernige neutrophile Granulozyten verfügen über Rezeptoren an der Oberfläche, mit denen sie F<sub>c</sub>-Fragmente von humanen Immunglobulinen erkennen und binden können. Bei Kontakt zwischen dem unlöslichen, hitzeaggregierten IgG und den Oberflächenrezeptoren eines PMN wird ein Phagozytosereiz ausgelöst. Es kommt zur Bildung eines Phagosoms. Die Lysosomen verschmelzen mit dem Phagosom und degranulieren ihre Enzyme in das neu gebildete Phagolysosom. Solange sich die PMN in der Zirkulation befinden, werden bei diesem Vorgang keine lysosomalen Enzyme frei. Bei nicht phagozytierbaren IgG-Komplexen, z.B. bei Adhärenz an das Endothel und bei frustraner Phagozytose, kommt es dagegen zur Ausschüttung des lysosomalen Inhalts nach extrazellulär [78, 79]. Bei diesem Prozess, der auch als „regurgitation during feeding“ bezeichnet wird, werden Enzyme, wie  $\beta$ -Glukuronidase, Lysosyme und Myeloperoxidasen [79, 235], und AA-Metabolite [18, 220] frei.

Gleichzeitig findet der „respiratory burst“ statt, bei dem neben der Freisetzung von lysosomalen Proteasen [141] auch toxische O<sub>2</sub>-Derivate aus aktivierten PMN ausgeschüttet werden [66]. Bei in vitro Untersuchungen von Flick [54] wurden isolierte humane PMN mit Antigen-Antikörper-Komplexen bzw. mit hitzeaggregierten IgG als Phagozytosereiz stimuliert. In diesen Untersuchungen wurde die Freisetzung von reaktiven O<sub>2</sub>-Spezies durch PMN nachgewiesen. Die Menge gebildeter Superoxidanionen wurde durch photometrische Bestimmung anhand der Menge an reduziertem Cytochrom C gemessen. Die stärkste Freisetzung erfolgte innerhalb der ersten 30 Minuten [66]. Danach erschöpfte sich der „respiratory burst“ und es wurden nur noch geringe Mengen an Superoxidanionen durch die stimulierten PMN gebildet [54, 66, 136]. In der Kontaktzone bewirken die toxischen Sauerstoffprodukte die Peroxidation von

zellulären Lipidmembranen und die oxidative Inaktivierung des endogenen  $\alpha_1$ -Proteasen-Inhibitors [36], so dass die liberierten Proteasen uneingeschränkt Strukturelemente der Gefäßwand lysieren können [151]. O<sub>2</sub>-Radikale wirken nur zum Zeitpunkt ihrer Liberation, nach dem „respiratory burst“ haben sie keine weitere Wirkung [56].

Im Vergleich zu anderen PMN-Stimuli wirkt hitzeaggregiertes IgG nur schwach aktivierend auf den „respiratory burst“, aber mittelstark auf die Freisetzung von Enzymen [66, 211].

Zusammenfassend kann nach den bisherigen Erkenntnissen davon ausgegangen werden, dass durch den Versuchsaufbau die pathophysiologisch wichtige Einflussnahme von PAF, toxischen O<sub>2</sub>-Derivaten, AA-Metaboliten, Thrombin und Thrombozytenaggregation auf die im Folgenden zu diskutierenden Ergebnisse weitgehend ausgeschlossen wurde.

In den Vorversuchen führte die Injektion des bereits beschriebenen Inhibitor-Cocktails, bestehend aus Voltaren®, Liquemin® und WEB 2086 in die mit KHHB zellfrei perfundierte Kaninchenlunge zu keinen pulmonalen Reaktionen. Innerhalb der 240 Minuten ließ sich lediglich ein nicht signifikanter Anstieg des Lungengewichts um  $2,8 \pm 0,6$  g bei der Kontrollgruppe (n = 8) und  $3,8 \pm 0,6$  g in der Gruppe mit Inhibitor-Cocktail (Gruppe 2, n = 4) erkennen. Damit entsprachen beide Gruppen den in der Literatur bereits beschriebenen Werten für normale Kaninchenlungen. Die Druckzunahme von  $1,3 \pm 0,2$  mmHg in der Kontrollgruppe und  $1,8 \pm 0,4$  mmHg bei der Gruppe 2 nach 240 Minuten war ebenfalls nicht statistisch signifikant. Die geringe kontinuierliche Gewichtszunahme, sowie der langsame Anstieg des pulmonal-arteriellen Druckes (PAP) ließen sich auf unvermeidliche geringfügige Verletzungen der Lunge und individuelle Unterschiede bei der Präparation zurückführen. Die Lungen blieben in Abwesenheit von chemischen Substanzen bei konstanten Versuchsbedingungen für die gesamte Beobachtungsdauer von 240 Minuten nach Erreichen der Steady-State Phase stabil. Eine Erhöhung des pulmonal-arteriellen Druckes bzw. eine Aktivierung des AA-Metabolismus traten nicht auf, die Flüssigkeitsfiltration, gemessen an der Änderung des Lungengewichtes, blieb im Versuchsverlauf nahezu unverändert.

Bei dem für diese Arbeit eingesetzten Modell der isolierten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge ist aus Vorversuchen bekannt [54], dass sowohl die Injektion von isolierten humanen PMN in die Lungenstrombahn ohne nachträgliche Stimulation als auch die alleinige Gabe von Immunkomplexen zu keinen pulmonalen Reaktionen führt.

In den Versuchsgruppen I ( Gruppe 1, 3 und 4) der Hauptversuche zeigte sich, dass es trotz der inhibitorischen Wirkung des Cocktails nach Stimulation der PMN durch hitzeaggregiertes IgG zu einem stark ausgeprägten Lungenödem kam, erkennbar an der deutlichen und anhaltenden Gewichtszunahme bis zum Ende der Versuchsreihe. Zum Zeitpunkt  $T_{240}$  hatte das Lungengewicht in der Gruppe 3 ( $n = 8$ ) um  $28,9 \pm 4,4$  g gegenüber dem Ausgangswert zugenommen, die Zunahme war statistisch signifikant höher als in der Kontrollgruppe ( $2,8 \pm 0,6$  g,  $p < 0,05$ ). Unter Berücksichtigung des Versuchsaufbaus wurde das Lungenödem überwiegend durch Proteasen, in erster Linie Elastase, ausgelöst [29, 98, 119, 189, 221]. Die in PMN enthaltenen Elastasen tragen zur akuten respiratorischen Insuffizienz bei und werden als Mitverursacher von nichtkardiogenen Permeabilitätsstörungen betrachtet [25, 27]. Der Schweregrad der Permeabilitätsstörung reicht von einer interstitiellen Schrankenstörung bis zur Ausbildung eines intraalveolären Lungenödems, oft begleitet von Widerstandserhöhungen im pulmonal-arteriellen System [136, 162, 220]. Ein deutlicher und progredienter Anstieg des pulmonal-arteriellen Drucks um  $34,2 \pm 5,8$  mmHg nach 240 Minuten trat in Gruppe 3 auf. Der Anstieg war statistisch signifikant ( $p < 0,01$ ) höher als in der Gruppe 4 mit CE-1037 ( $2,6 \pm 2,0$  mmHg) oder der Kontrollgruppe 1 ( $1,3 \pm 0,2$  mmHg).

Die im Organismus befindlichen PMN teilen sich auf in einen marginierenden und einen zirkulierende Pool, die normalerweise in einem dynamischen Gleichgewicht zueinander stehen [26, 37]. Ein großer Teil dieser PMN hält sich im marginierenden Leukozytenpool im Lungengefäßbett auf [215]. Obwohl auch Granulozyten in den Alveolen nachweisbar sind, ist das eigentliche Lungengewebe als Granulozytenspeicher quantitativ vernachlässigbar [37]. Bereits im Frühstadium eines ARDS erhöht sich die Zahl der PMN im Gefäßbett der Lunge [189], dagegen kommt es zu einem deutlichen Abfall der Leukozyten im venösen Blut der Peripherie. Dieses Phänomen wird als Leukozytensticking bezeichnet [28, 40]. In vorangegangenen Versuchen wurde nachgewiesen,

dass in dem hier verwendeten Lungenmodell nahezu alle isolierten humanen PMN in der Strombahn der Kaninchenlunge verbleiben [136] und dort ihre proteolytische Enzyme ausschütten. Der wichtigste Vertreter dieser Enzyme ist die bereits beschriebene Elastase [160]. Sie ist mit einer Gruppe anderer „neutraler Proteasen“, wie z. B. Kathepsin G und Kollagenase [46, 234], in vollaktiver Form in den azurophilen Granula der PMN gespeichert [61, 74, 102]. Elastase kann strukturelle Komponenten wie Proteoglykane und Kollagen zerstören. Sie wurde 1968 erstmalig beschrieben und erhielt ihren Namen von der Fähigkeit, als einzige Protease unlösliches Elastin im Gefäßgewebe abzubauen [98].

Janoff et al. [96, 99] konnten zeigen, dass nach Instillation von PMN-Elastase in isolierte Hundelungen innerhalb von 90 Minuten ein pulmonales Emphysem auftritt. Baird et al. [5] registrierte an isolierten Rattenlungen durch gereinigte humane Granulozytenelastase eine deutliche Gewichtszunahme und einen deutlichen Anstieg des pulmonal-arteriellen Drucks im Sinne eines Lungenödems. Immunhistochemisch fanden sie, dass sich das Enzym direkt an elastische Fasern der Alveolarsepten anlagert und diese Septen zerstört. Ähnliche Ergebnisse fanden Koch et al. [116]. Sie konnten die kausale Beteiligung der Elastase an der irreversiblen Schrankenstörung des Gefäßbettes der Lunge beweisen. Nach einer Latenz von ungefähr 30 Minuten kam es durch die Gabe einer pathologischen Elastasemenge zu einer exponentiellen Zunahme des Gewichts. Die Versuche von Böhm [17] und Flick [54] zeigten ebenfalls eine Gewichtszunahme der Lunge mit einer Latenz von 30 – 120 Minuten nach Applikation von Elastase. Die zeitliche Latenz ist ein weiteres Indiz für die ursächliche Beteiligung der Granulozytenelastase. Goldstein et al. [66] konnten zeigen, dass die stärkste Freisetzung an Superoxidanionen und AA-Metaboliten „respiratory burst“ innerhalb der ersten 30 Minuten erfolgt, die zu einer sofortigen Ödembildung in der Lunge führt. Danach erschöpft sich der „respiratory burst“, die stimulierten PMN setzten nur noch geringe Mengen Superoxidanionen und AA-Metaboliten frei [54, 66, 136]. In der eigenen Untersuchung wurde die Elastase immunchemisch bestimmt. Zum Zeitpunkt  $T_0$  zeigten die Kontrollgruppe ( $18,4 \pm 2,5 \mu\text{g/l}$ ) und die Gruppen 3 ( $24,7 \pm 3,3 \mu\text{g/l}$ ) und 4 ( $22,4 \pm 4,9 \mu\text{g/l}$ ) vergleichbar niedrige Konzentrationen von Elastase, es bestanden keine signifikanten Unterschiede. Nach Stimulation

der Granulozyten ( $T_{2,5}$ ) durch hitzeaggregiertes IgG war die Elastasekonzentration in den Gruppen 3 ( $39,6 \pm 4,7 \mu\text{g/l}$ ) und 4 ( $38,5 \pm 3,7 \mu\text{g/l}$ ) signifikant ( $p < 0,01$ ) höher als in der Kontrollgruppe ( $19,3 \pm 2,7 \mu\text{g/l}$ ). In den vorgelegten Versuchen kam es zu einer konstanten Zunahme der Elastasekonzentration während der Versuchszeit. Das bestätigt die Ergebnisse von Flick [54] und Martin [136], die bis zur vierten Stunde nach Stimulation eine kontinuierliche Ausschüttung von Elastase aus den Granulozyten feststellten. Nach 180 Minuten lag die Elastasekonzentration in Gruppe 3 bei  $156,5 \pm 33,3 \mu\text{g/l}$ , in Gruppe 4 bei  $128,5 \pm 16,4 \mu\text{g/l}$  und damit signifikant ( $p < 0,01$ ) höher als in der Kontrollgruppe ( $22,4 \pm 3,6 \mu\text{g/l}$ ). Die Elastasekonzentration lag in den Gruppen 3 und 4 zu diesem Zeitpunkt oberhalb des mit dem gleichen Bestimmungsverfahren ermittelten Diskriminationswertes (PMN-Elastase =  $85 \mu\text{g/l}$  am 5. Tag) zur Vorhersage von Komplikationen ab dem 6. Tag bei postoperativ und posttraumatisch intensivpflichtigen Patienten [122]. Redl et al. [176] fanden bei Patienten, die im weiteren Verlauf ein ARDS oder ein Multiorganversagen entwickelten, bereits bei Krankenhauseinweisung im Plasma eine Elastasekonzentration von  $>133 \mu\text{g/l}$ . Die in den Gruppen 3 und 4 nach 180 Minuten gemessene Elastasekonzentration lag ebenfalls in diesem Bereich.

In der Kontrollgruppe wurden über die gesamte Versuchsdauer Elastasekonzentrationen zwischen  $18,4 \pm 2,5 \mu\text{g/l}$  und  $22,4 \pm 3,6 \mu\text{g/l}$  gemessen. Die gemessenen Werte entsprachen den für den verwendeten Assay berechneten Referenzwerten ( $22 \pm 10 \mu\text{g/l}$ ) an einer gesunden Normalbevölkerung [163].

Die humanen PMN wurden in einer physiologischen Konzentration appliziert. Die nahezu gleiche Elastasekonzentration bei Mensch und Kaninchenmodell legt die Schlussfolgerung nahe, dass die hier diskutierten Ergebnisse sich auf die Verhältnisse beim Menschen übertragen lassen, auch wenn die in der systemischen Zirkulation beim Menschen gemessenen Konzentrationen an Elastase nur eingeschränkt Rückschlüsse auf deren pulmonale Konzentration zulässt.

In der Gruppe 4 mit CE-1037 ( $n = 8$ ) kam es nach Applikation der Granulozyten und Stimulation durch hitzeaggregiertes IgG nur zu einer schwachen kontinuierlichen Gewichtszunahme, die einer geringeren Extravasation des



Perfusats in das Lungeninterstitium entspricht. Das Lungengewicht nahm in der Gruppe 4 bis zum Zeitpunkt  $T_{60}$  um im Mittel  $1,5 \pm 0,4$  g zu. Nach 90 Minuten war der Unterschied zwischen der Gruppe 4 mit CE-1037 ( $1,7 \pm 0,8$  g) und der Gruppe 3 ohne CE-1037 ( $5,0 \pm 0,8$  g) statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) nachweisbar. Auch bei Versuchsende war die Zunahme des Lungengewichts um  $16,5 \pm 1,6$  g in der Gruppe 4 statistisch signifikant geringer als in der Gruppe 3 ( $28,9 \pm 4,4$  g,  $p < 0,05$ ). Durch die konstante Infusion des synthetischen Proteasen-Inhibitors CE-1037 konnte die Bildung eines interstitiellen Lungenödems signifikant reduziert werden. Dieser Sachverhalt stützt die bereits angeführte Schlussfolgerung, dass die pathologischen Veränderungen an den Lungengefäßschranken im verwendeten Versuchsmodell vorwiegend durch die in Granulozyten gespeicherten Proteasen, speziell die Elastase, verursacht wurden.

Die Ergebnisse stimmen mit den Resultaten von Patton et al. [168] überein. Bei in vivo Versuchen an Hamsterlungen fanden sie ausgeprägte pulmonale Blutungen nach intratrachealer Instillation von gereinigter humaner PMN-Elastase. Diese Blutungen ließen sich sowohl nach intravenöser als auch nach intratrachealer Applikation von CE-1037 signifikant unterdrücken. Dabei kam es zu einer langsam reversiblen Hemmung der Elastase. Der synthetische Proteasen-Inhibitor CE-1037 war in diesen Versuchsreihen für mehr als sechs Stunden wirksam und konnte außerdem bei Applikation 15 Minuten nach Elastase-Gabe ein Fortschreiten der proteolytischen Aktivität inhibieren.

Die immunchemische Bestimmung der Elastasekonzentration ergab in der Gruppe 4 mit CE-1037 sowie in der Gruppe 3 ohne CE-1037 im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte Werte ( $p < 0,01$ ). Dies zeigt, dass auch in der Gruppe 4 mit kontinuierlicher Infusion des Inhibitors eine Stimulation der PMN mit konsekutiver Freisetzung von Elastase stattgefunden hat. Bereits kurz nach Stimulation der Granulozyten ( $T_{2,5'}$ ) war die Elastasekonzentration in den Versuchsgruppen 3 ( $39,6 \pm 4,7$   $\mu\text{g/l}$ ) und 4 ( $38,5 \pm 3,7$   $\mu\text{g/l}$ ) signifikant ( $p < 0,01$ ) höher als in der Kontrollgruppe ( $19,3 \pm 2,7$   $\mu\text{g/l}$ ). Nach 180 Minuten betrug die Elastasekonzentration in der Gruppe 3 ohne CE-1037 durchschnittlich  $156,5 \pm 33,3$   $\mu\text{g/l}$  und in der Gruppe 4 mit CE-1037  $128,5 \pm 16,4$   $\mu\text{g/l}$ . Der Unterschied war nicht signifikant. Dies unterstreicht die Feststellung, dass der

synthetische Proteasen-Inhibitor CE-1037 zu einer signifikanten Hemmung der Elastasefunktion führte.

Auch Kirschenheuter et al. [111] wiesen durch in vitro Versuche die hohe Effektivität von CE-1037 bezüglich der Hemmung der humanen neutrophilen Elastase nach. Es handelt sich bei diesem Inhibitor um ein nicht-oxidierbares 2-Phenylisobutyrat von niedrigem Molekulargewicht. Neben der hohen Spezifität gegenüber der humanen PMN-Elastase besitzt CE-1037 nur eine geringere inhibitorische Wirkung auch auf  $\alpha$ -Chymotrypsin.

Viele Studien haben die Histamineffekte auf die vaskuläre Resistenz und Compliance in der pulmonalen Strombahn untersucht [22, 69, 91, 126, 180, 181]. Histamin wird von den basophilen Granulozyten und Mastzellen gebildet und sezerniert. Mastzellen befinden sich im perivaskulären Lungenparenchym [68], wo sich ihre Zahl je nach den pathophysiologischen Bedingungen ändert [108]. Neben der Bronchokonstriktion tragen ein histamininduziertes Schleimhautödem und eine histamininduzierte Sekretzunahme wesentlich zur Atemwegsverengung bei [219].  $H_1$ -Rezeptor-moduliert entfaltet Histamin seine Wirkung auf den pulmonalen kapillären Druck durch eine Erhöhung des postkapillären Widerstandes [6]. Eine Stimulation der  $H_2$ -Rezeptoren führt dagegen zu einer pulmonalen Vasodilatation [6, 226] und einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität [22, 118, 133], vermittelt durch eine vorübergehende Erweiterung der Zwischenzellabstände der venösen Endothelzellen [31, 132]. Gespeichert in den cytoplasmatischen Vesikeln [49] von Mastzellen und basophilen Granulozyten erfolgt nach adäquatem Stimulus die Freisetzung von Histamin cAMP-moduliert über einen  $Ca^{2+}$ -abhängigen Mechanismus [210]. Die Histaminausschüttung wird durch IgE [48, 49], Morphium, Komplement [67, 210] oder das ZNS moduliert. Elektronenmikroskopische Untersuchungen deuten auf einen vesikulären Transport zwischen sekretorischen Granula und der Plasmamembran der Mastzellen bzw. basophilen Granulozyten hin. Dieser Transport wird auch als „Piecemeal-Degranulation“ bezeichnet [48].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es unter der Einwirkung des Elastase-Inhibitors CE-1037 zu einer statistisch signifikanten ( $p < 0,01$ ) Reduktion der Histaminausschüttung kam.

Dies stimmt mit den Ergebnissen von He et al. [71] überein. Sie zeigten, dass die IgE-vermittelte Histaminausschüttung aus Hautmastzellen durch einen selektiven Chymase-Inhibitor zu annähernd 80%, durch den Proteasen-Inhibitor Chymostatin zu 70% und durch einen Trypsin-Inhibitor der Sojabohne zu 60% inhibiert werden konnte. Als Wirkmechanismus wurde eine stabilisierende Wirkung der Proteasen-Inhibitoren auf die Mastzellen diskutiert. In einer vorangegangenen Studie fanden He et al. [73] eine Reduktion der IgE-getriggerten Histaminausschüttung an Haut- und Drüsenzellen bis zu 90% durch die Proteasen-Inhibitoren APC 366, Leupeptin und BAPNA.

Cunningham et al. [41] wiesen in kinetischen Studien mit dem Proteasen-Inhibitor CE-0266 neben der guten Selektivität gegenüber der humanen Elastase auch eine gute Selektivität gegenüber Pankreaselastasen von Schweinen (PPE) und eine schwächere Selektivität gegenüber  $\alpha$ -Chymotrypsin und Cathepsin G nach. Hultsch et al. [89] stellten eine dosisabhängige Reduktion der Histaminausschüttung von humanen dispersen Lungenmastzellen durch den Proteasen-Inhibitor Diisopropylfluorophosphat (DFP) und durch einen Chymotrypsin-like-enzyme-inhibitor fest und sprachen der Chymase eine wichtige Rolle in der Spätphase der Mastzellaktivierung in der menschlichen Lunge zu. Khiav et al. [109] zeigten, dass Proteasen-Inhibitoren direkt die Freisetzung von Prostaglandin D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) und Histamin aus Mastzellen und basophilen Granulozyten von Menschen und Ratten verhinderten. Proteasen-Inhibitoren waren auch Gegenstand der Untersuchungen von Kido et al. [110], in denen durch Leupeptin die Mastzelldegranulation und somit die Histaminausschüttung aus peritonealen Rattenmastzellen signifikant reduziert wurde. Kobayashi et al. [115] zeigten, dass in Urin und Serum gefundene Proteasen-Inhibitoren die IgE-vermittelte Histamin- und Leukotrien C<sub>4</sub>-Ausschüttung deutlich verringerten. Nach 30 Minuten Inkubation der Mastzellen mit dem Inhibitor kam es zu einer Reduktion der IgE-getriggerten Histaminausschüttung um 21%  $\pm$  5%. Als möglicher Mechanismus wurde die Unterbrechung einer Rezeptor-Effektor-Kette angesehen, da nur die IgE-vermittelte Histaminausschüttung vermindert wurde. Wong et al. [238] zeigten, dass die zwei Proteasen-Inhibitoren Genistein und Thyrophostin 47 konzentrationsabhängig die IgG-induzierte Kontraktion der

Bronchialmuskulatur hemmen und die Konzentration von Peptidoleukotrienen und Histamin im Lungengewebe deutlich reduzieren.

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen fanden sich in der eigenen Untersuchung in der Gruppe 4 (n = 8) mit dem Proteasen-Inhibitor CE-1037 bereits nach 60 Minuten geringere Histaminkonzentrationen ( $80,5 \pm 22,4$  pg/ml) als in der Gruppe 3 ohne CE-1037 ( $147,2 \pm 29,3$  pg/ml). Nach 180 Minuten war die Endkonzentration in der Gruppe 4 mit CE-1037 ( $86,2 \pm 26,5$  pg/ml) signifikant ( $p < 0,01$ ) niedriger als in der Gruppe 3 ( $195,3 \pm 23,7$  pg/ml). Dies stützt die Annahme, dass CE-1037 einen Einfluss auf die Histaminausschüttung von Mastzellen hat. Ebenfalls fanden sich in der Gruppe 6 (n = 8) mit CE-1037 und autologem Kaninchenplasma ab  $T_{60}$  geringere Histaminkonzentrationen ( $77,3 \pm 17,8$  pg/ml). In der letzten Histaminmessung nach 180 Minuten lagen die Werte in Gruppe 6 bei  $53,5 \pm 15,4$  pg/ml und lagen damit statistisch signifikant ( $p < 0,01$ ) unter den Werten der Kontrollgruppe 1 (n = 8) mit  $159,0 \pm 23,7$  pg/ml und unter den Werten der Gruppe 5 (n = 8) ohne CE-1037 aber mit autologem Kaninchenplasma ( $134,2 \pm 24,2$  pg/ml).

Kirschenheuter et al. [111] beschreiben in ihren Versuchen CE-1037 als hochspezifischen HNE-Inhibitor, der neben seiner spezifischen Wirkung auf HNE auch andere Enzyme inhibiert. In absteigender Spezifität sind dies Cathepsin G (CAT-G), porcine pancreatic elastase (PPE) und  $\alpha$ -Chymotrypsin ( $\alpha$ -CH).

In der eigenen Untersuchung bestanden auch Hinweise auf eine Reduktion der histaminabhängigen Initialreaktion. Innerhalb der ersten 2,5 Minuten waren der pulmonal-arterielle Druck und das Lungengewicht in der Gruppe 4 mit CE-1037 signifikant niedriger als in der Gruppe 3 ohne CE-1037.

Da die Spezifität von CE-1037 für  $\alpha$ -Chymotrypsin gering zu sein scheint [111], geben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit Anlass für weitere Forschungsarbeiten zur Reduktion der Histaminausschüttung durch CE-1037.

In den Versuchsgruppen II (Gruppe 1, 5 und 6) der Hauptversuche wurde dem Perfusionsmedium 10 ml autologes Kaninchenplasma zugegeben (Gruppen 5 und 6). Durch diese Zugabe sollte dem Perfusionsmedium ein physiologisches Maß autologer Plasmabestandteilen wie Eiweißkörper (Albumin, Globulin, Fibrinogen), anorganische Salze und Transportstoffe (Proteasen, Proteasen-

Inhibitoren, Immunkörper, Hormone) zugeführt werden. Innerhalb der ersten 2,5 Minuten kam es zu einem Anstieg des Lungengewichtes um  $0,9 \pm 0,3$  g in Gruppe 5 ( $n = 8$ ) und  $1,6 \pm 0,5$  g in Gruppe 6 ( $n = 8$ ). Anschließend war das Lungengewicht bis zum Ende der Versuchsdauer leicht rückläufig. Unterschiede zwischen den Gruppen 5 und 6 mit und ohne CE-1037 bestanden nicht.

Ähnlich dem Verlauf der Lungengewichtskurven kam es auch im Verlauf des pulmonal-arteriellen Druckes (PAP) in der Anfangsphase  $T_{2,5'}$  zu einem Anstieg um  $5,8 \pm 0,4$  mmHg in der Gruppe 5 ohne CE-1037 und  $7,1 \pm 1,5$  mmHg in der Gruppe 6 mit CE-1037, der Unterschied zu der Kontrollgruppe war für beide Gruppen statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). Pathophysiologisch kommt es im Initialstadium innerhalb von Sekunden zu einer Erhöhung des kapillären Filtrationsdrucks durch Änderung des Gefäßtonus im Sinne einer Vaso(Veno)konstriktion [160]. Darauf folgt die Lockerung der "inter-endothelialen-junctions" durch Alteration der Endothelzellen [94, 152, 160, 161]. Auslöser dieser genannten Veränderungen sind Mediatoren der drei klassischen humoralen Kaskadensysteme: des Komplementsystems, des Koagulation-Fibrinolyse-Systems und des Kinin-Kallikrein-Systems [11, 156, 241]. Aus diesem Grund konnte diese initiale Reaktion weder durch den Inhibitor-Cocktail noch durch CE-1037 blockiert werden. Auch der Zusatz von Kaninchenplasma konnte den anfänglichen Anstieg von PAP und Lungengewicht nicht verhindern.

Die Zugabe von Kaninchenplasma konnte in Gruppe 5 ( $n = 8$ ) jedoch deutlich die Gewichtsveränderung und den PAP am Ende der Versuchsreihen beeinflussen. Das Lungengewicht lag bei  $T_{240'}$  in Gruppe 5 (ohne CE-1037, mit Kaninchenplasma) bei  $1,2 \pm 0,9$  g, der PAP bei  $2,1 \pm 0,9$  mmHg und unterschied sich damit statistisch signifikant von der Gruppe 3 mit einem Lungengewicht von  $28,9 \pm 4,4$  g und einem PAP von  $34,2 \pm 5,8$  mmHg. Desgleichen konnte durch die Zugabe von Kaninchenplasma in Gruppe 6 ( $n = 8$ ) das Lungengewicht am Ende der Versuchsreihen beeinflusst werden. Zum Zeitpunkt  $T_{240'}$  lag das Lungengewicht in Gruppe 6 bei  $0,7 \pm 0,6$  g und unterschied sich damit statistisch signifikant von Gruppe 4 ( $n = 8$ ) mit  $16,5 \pm 1,6$  g. Dieser Einfluss ist neben der Erhöhung des kolloidosmotischen Druckes durch Zugabe von Albumin, auch auf die im Kaninchenplasma enthaltenden Proteasen-Inhibitoren, im Speziellen auf den  $\alpha_1$ -Protease-Inhibitor ( $\alpha_1$ -PI)

zurückzuführen. Die höchste Affinität zur HNE [58, 165, 166] besitzt der auch mengenmäßig im Plasma überwiegende  $\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitor [225]. Er bindet 90% der Elastase extrem rasch und irreversibel [84, 165, 166]. Die Hemmaktivität des  $\alpha_1$ -Protease-Inhibitors kann durch toxische Sauerstoffmetabolite vermindert werden [152, 155, 242]. Die Affinität von  $\alpha_1$ -PI nimmt dadurch um den Faktor 2000 gegenüber Elastase ab [219]. Durch die Zugabe des Inhibitor-Cocktails kann die pathophysiologisch wichtige Einflussnahme von PAF, toxischen  $O_2$ -Derivaten, AA-Metaboliten, Thrombin und Thrombozytenaggregation auf die zu diskutierenden Ergebnisse jedoch weitgehend ausgeschlossen werden. Dadurch konnten der im Kaninchenplasma enthaltenden  $\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitor seine volle Hemmaktivität entfalten. Hinzu kommt, dass es sich im Gegensatz zum  $\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitor, bei CE-1037 um einen kleinmolekularen Proteasen-Inhibitor handelt. Dieser Unterschied kann begründen, warum der leichter intravasal verbleibende  $\alpha_1$ -PI seine Hemmaktivität mehr entfalten konnte.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von He et. al, Cunningham et. al und Hultsch et al. fanden sich in den eigenen Untersuchungen in der Gruppe 6 (n = 8) mit CE-1037 und autologem Kaninchenplasma ab  $T_{60}$  geringere Histaminkonzentrationen ( $77,3 \pm 17,8$  pg/ml) als in der Gruppe 5 (n = 8) ohne CE-1037. In der Histaminmessung nach 180 Minuten lagen die Werte in Gruppe 6 bei  $53,5 \pm 15,4$  pg/ml und lagen damit statistisch signifikant ( $p < 0,01$ ) unter den Werten der Gruppe 5 (n = 8) ohne CE-1037 ( $134,2 \pm 24,2$  pg/ml). Dies stützt gleichfalls die Annahme, dass der kleinmolekulare oxidationsresistente Proteasen-Inhibitor CE-1037 Einfluss auf die Histaminausschüttung von Mastzellen hat.

Weitere experimentelle Arbeiten sind jedoch notwendig um den genauen Mechanismus zu klären, der zur Reduktion der Histaminausschüttung durch CE-1037 führt.

## 5. Zusammenfassung

Am Model der isolierten, ventilerten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge wurde der Einfluss des synthetischen, kleinemolekularen, oxidationsresistenten Proteasen-Inhibitors CE-1037 auf die durch intravasale Granulozytenstimulation ausgelöste pulmonale Permeabilitätsstörung untersucht.

Die Lungen wurden nach einem standardisierten Verfahren isoliert. Mittels einer elektronischen Wägezelle wurde das Lungengewicht zur Quantifizierung der Flüssigkeitsextravasation kontinuierlich registriert. Gleichzeitig wurde der pulmonal-arterielle Druck über einen elektromechanischen Druckwandler erfasst. Mittels einer Starlingpumpe wurde die Ventilation gewährleistet. Eine Rollenpumpe perfundierte das Lungenpräparat kontinuierlich mit 200 ml pro Minute. Die Kaninchenlungen wurden mit einer Krebs-Henseleit-HAES-Pufferlösung (KHHB) perfundiert. Humane neutrophile Granulozyten wurden durch eine Dichtegradientenzentrifugation isoliert und je nach Versuchsanordnung eingesetzt. Zur Stimulation der Granulozyten dienten hitzeaggregierte menschliche Immunglobuline der Klasse G. Zur Vermeidung der Einwirkung von vasoaktiven Mediatoren erfolgte die Gabe eines Inhibitor-Cocktails, bestehend aus WEB 2086, Heparin-Natrium (Liquemin®) und Diclofenac-Natrium (Voltaren®). In den zu definierten Zeitpunkten entnommenen Perfusatproben wurde die Elastasen- und Histaminkonzentration gemessen.

Für die Vor- und Hauptversuche der vorliegenden Arbeit wurde ein zellfreies Perfusionsmedium verwandt, um die komplexen Einflüsse der verschiedenen zirkulierenden Zellen mit dem Gefäßendothel der isolierten Lunge zu unterbinden und die Interaktionen mit den klassischen humoralen Kaskadensystemen zu vermeiden. Ohne den Einfluss dieser Faktoren kam es in den Versuchen nach Stimulation der PMN durch hitzeaggregiertes IgG zu einem stark ausgeprägten Lungenödem, quantifiziert durch eine anhaltende Gewichtszunahme bis zum Ende der Versuchsreihe. Als Auslöser dieser Reaktion kommt unter den lysosomalen Proteasen der Granulozyten und Makrophagen vorwiegend Elastase in Betracht. Elastase führt zu einer nicht reversiblen Schädigung der alveolären und kapillären Schrankenfunktion. Eine

Schrankenstörung wurde anhand des deutlichen Anstieges des PAP und des Lungengewichts in den Hauptversuchen nachgewiesen.

Dagegen traten in der Versuchsgruppe mit CE-1037 keine deutliche, progrediente Lungengewichtszunahme und keine Erhöhung des PAP auf. Die Elastasekonzentration stieg aber wie in der Versuchsreihe ohne CE-1037 an.

In den Hauptversuchen wurde eine Reduktion der Histaminkonzentration unter der Zugabe von CE-1037 registriert. Ein möglicher Wirkungsmechanismus ist die Reduktion der  $\alpha$ -Chymotrypsin ( $\alpha$ -CH) -induzierten Histaminausschüttung aus Lungenmastzellen. Diese Ergebnisse sind Anlass für weitere experimentelle Arbeiten, um den Pathomechanismus der Hemmung der Histaminausschüttung zu klären.

Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse führen unter Berücksichtigung der Beobachtungen anderer Autoren zu dem Schluss, dass CE-1037 im in vitro Modell der Kaninchenlunge zu einer deutlichen Hemmung der durch die PMN-Elastase hervorgerufenen irreversiblen Störung der pulmonalvaskulären Schrankenfunktion führt. CE-1037 ist ein hochwirksamer HNE-Inhibitor. Die Ergebnisse legen ebenfalls nahe, dass CE-1037 über die Hemmung von Proteasen zu einer Reduktion der Histaminausschüttung in der Lunge führt.



## 6. Summary

The aim of this study was to investigate the effect of the potent neutrophil elastase inhibitor CE-1037 on pulmonary vascular resistance and permeability in the isolated recirculatingly perfused and ventilated rabbit lung model after neutrophil mediated respiratory failure.

The rabbit lung is isolated in a standardized procedure. Rabbits of either sex were anaesthetised and anticoagulated. The trachea was cannulated, and the rabbits were mechanically ventilated by means of a Starling Pump. The thorax was opened via the diaphragm, and after a median sternotomy a catheter was inserted into the pulmonary artery. The lung and heart organ preparation was removed and suspended on weight transducer in a temperature-controlled and humidified chamber. The lungs were perfused by a roller pump at constant-volume inflow of 200 ml/min in a recirculating system containing 200 ml Krebs-Henselein hydroxyethyl starch buffer (KHHB) solution. The lungs were ventilated with 4 % CO<sub>2</sub> in air (frequency 45 min<sup>-1</sup>, tidal volume 25 ml, positive end-expiratory pressure 1,5 cm H<sub>2</sub>O). Human neutrophils were isolated by centrifugation through a Percoll gradient and infused into the system after stimulation with heat-denaturated class G immunoglobulins. To avoid the influence of vasoactive substances, the platelet-activating factor (PAF) antagonist WEB 2086, the cyclooxygenase inhibitor diclofenac and the coagulation inhibitor heparin sodium were added to the recirculating system. The pulmonary arterial pressure (PAP) and weight gain as an indicator of extravascular lung water as well as pH were continuously recorded. PO<sub>2</sub>, PCO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> saturation, oncotic pressure, histamine- and elastase values in the perfusate were determined at 30-min intervals. A cellfree perfusion medium was used in the present study in order to avoid the complex interactions with different circulating cells, which may mask direct effects on vascular tone and mediator release.

The control-group in the study did not show major changes in vascular resistance or permeability during a period of 4 hours. After PMN-stimulation with heat-denaturated immunoglobulins the pulmonary artery pressure and the lung weight increased continuously reflecting the formation of interstitial edema. This disturbance of pulmonary vascular permeability is due to a structural, morphological injury of the vessels and alveoli caused by lysosomal proteases,

particular elastase from PMN. By the addition of the synthetic, low molecular weight, slowly reversible inhibitor of human neutrophil elastase CE-1037 to the perfusion fluid the edema formation could be suppressed largely. The elastase values in the perfusate was determined and increased continuously even under addition of CE-1037. The histamine values could also be suppressed by addition of CE-1037. One possible mode of operation might be conditioned by CE-1037 the inhibition of  $\alpha$ -chymotrypsin induced histamine release in lung mast cells.

The results of this study demonstrate in consideration of other authors that CE-1037 suppress largely the human neutrophil elastase mediated respiratory failure in the isolated recirculatingly perfused and ventilated rabbit lung model. CE-1037 is a potent inhibitor of human neutrophil elastase. The results suggest as well that CE-1037 reduce the histamine release through a different protease inhibition.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Anderson, R. R., Holliday, R. L., Driedger, A. A., Lefcoe, M., Reid, B., Sibbald, W. J.: "Documentation of Pulmonary Capillary Permeability in the Adult respiratory Distress Syndrome Accompanying Human sepsis". *Am. Rev. Respir. Dis.* 119, 1979, 869 - 877.
2. Andreasson, S., Smith, L., Risberg, B.: "The Role of High-Dose Corticosteroids (HDC) in Pulmonary Capillary-Alveolar Membrane Integrity". *Acta Chir. Scand.* 526, 1985, 83 - 93.
3. Arroliga, A. C., Ghamra, Z. W., Perez Trepichio, A., Perez Trepichio, P., Komara, J. J., Smith, A., Wiedemann, H. P.: "Incidence of ARDS in an adult population of northeast Ohio". *Chest* 6, 2002, 1972 - 1976.
4. Bachofen, M., Weibel, E. R.: "Alteration of the Gas Exchange Apparatus in Adult Respiratory Insufficiency Associated with Septicemia". *Am Rev. Respir. Dis.* 116, 1977, 589 - 615.
5. Baird, B. R., Cheronis, J. C. Sandhaus, R. A., Berger, E. M., White, C. W., Repine, J. E.: "O<sub>2</sub>-Metabolites and Neutrophil Elastase Synergistically Cause Edematous Injury in Isolated Rat Lungs". *J. Appl. Physiol.* 61, 1986, 2224 - 2229.
6. Barman, S. A., Tayler, A. E.: "Histamine's Effect on Pulmonary Vascular Resistance and Compliance at Elevated Tone". *Am. J. Physiol.* 257 (Heart Circ. Physiol. 26), 1989, H 618 - H 625.
7. Barnhart, M. I., Chen, S.: "Platelet - Vessel Wall Dynamics". *Suppl. Thromb. Haemost.* 63, 1978, 301 - 317.
8. Bayley, T., Clements, J. A., Osbahr, A. J.: "Pulmonary and Circulatory Effects of Fibrinopeptides". *Circ. Res.* 21, 1967, 469 - 485.
9. Beesley, J. E., Pearson, J. D., Hutchings, A., Carleton, J. S., Gordon, J. L.: "Granulocytes Migration through Endothelium in Culture". *J. Cell Sci.* 38, 1979, 237 - 248.
10. Befus, D.: "The role of mast cell in allergic bronchospasm". *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65, 1987, 435 - 441.
11. Belew, M., Gerdin, B., Porath, J., Saldeen, T.: "Isolation of Vasoactive Peptides from Human Fibrin and Fibrinogen Degraded by Plasmin". *Thromb. Res.* 13, 1978, 983 - 994.
12. Berry, L., Stafford, A., Fredenburgh, J., O'Brodovich, H., Mitchell, L., Andrew, M., Chan, A.K.: "Investigation of the Anticoagulant Mechanisms of a Covalent Antithrombin-Heparin Complex". *J. Biol. Chem.* 25, 1998, 34730 - 34736.
13. Bevilacqua, M. P., Pober, J. S., Mendrick, D. L., Cotran, R. S., Gimbrone, M. A.: "Identification of an Inducible Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 1987, 9238 - 9242.

14. Bjork, J., Hugli, T. E., Smedegard, G.: "Microvascular Effects of Anaphylatoxins C3a und C5a". *J. Immunol.* 134, 1985, 1115 - 1119.
15. Bloom, A. L.: "Physiology of Blood Coagulation". *Haemostasis.* 20,1990, 14 - 29.
16. Blondin, J., Aaron, J.: "The Role of Lysosomal Elastase in the Digestion of Escherichia coli Proteins by Human Polymorphnuclear Leucocytes". *J. Clin. Invest.* 58, 1976, 971 - 979.
17. Böhm, K.-D.: "Akute Veränderungen des pulmonalen Gefäßtonus und der Permeabilität durch stimulierte Granulozyten". *Diss. Giessen, 1994*
18. Borgeat, P., Samuelsson, B.: "Metabolism of Arachidonic Acid in Polymorph-nuclear Leukocytes". *J. Biol. Chem.* 254, 1979, 7865 - 7869.
19. Boxer, L. A., Allen, J. M., Baehner, R. L.: "Diminished Polymorphonuclear Leukocyte Adherence". *J. Clin. Invest.* 66, 1980, 268 - 274.
20. Boxer, L. A., Allen, J. M., Schmidt, M., Yoder, M., Baehner, R. L.: "Inhibition of Polymorphnuclear Leukocyte Adherence by Prostacyclin". *J. Lab. Clin. Med.* 95, 1980, 672 - 678.
21. Braquet, P., Paubert-Braquet, M., Vargatig, B. B.: " Platelet Activating Factor, a Potential Mediator of Shock". *Adv. Prostagl. Thromboxane Leukotr. Res.* 17, 1987, 818 - 823.
22. Braude, S. E., Royston, D., Coe, C., Barnes, P. J.: "Histamine Increases Lung Permeability by an H<sub>2</sub> -Receptor Mechanism". *Lancet.* 2, 8399, 1984, 372 - 374.
23. Braude, S. E., Nolop, K. B., Flemming, J. S., Krausz, T., Tayler, K. M., Royston, D.: "Increased Pulmonary Transvascular Protein Flux after Canine Cardio-pulmonary Bypass". *Am. Rev. Resp. Dis.* 134, 1986, 867 - 872.
24. Bray, M. A., Cunningham, F. M., Ford-Hutchinson, A. W., Smith, M. J. H.: "Leukotriene B<sub>4</sub>: A Mediator for Vascular Permeability". *Br. J. Pharmacol.* 72, 1981, 483 - 486.
25. Brigham, K. L.: "Pulmonary Edema: Cardiac and Noncardiac". *Am. J. Surg.* 138, 1979, 361 - 367.
26. Brigham, K. L., Meyrick, B.: "Interactions of Granulocytes with the Lungs". *Circ. Res.* 54, 1984, 623 - 635
27. Brower, M. S., Harpel, P. C.: "Proteolytic Cleavage of a<sub>2</sub>-Plasmin Inhibitor and C<sub>1</sub> Inactivator by Human Polymorphnuclear Leukocyte Elastase". *J. Biol. Chem.* 257, 1982, 9849 - 9854.
28. Burchardi, H., Stokke, T., Hensel, I., Köstering, H., Rahlf, G., Schlag, G., Heine, H., Hörl, W. H.: "Adult Respiratory Distress Syndrome (ARDS): Experimental Models with Elastase and Thrombin Infusion in Pigs". *Adv. Exp. Med. Biol.* 167, 1984, 319 - 333.

29. Campbell, E. J., Senior, R. M., McDonald, J. A., Cox, D. L.: "Relative Importance of Cell-Substrate Contact and Oxidative Inactivation of Proteinase Inhibitors in Vitro". *J. Clin. Invest.* 70, 1982, 845 - 852.
30. Casals-Stenzel, J., Franke, J., Friedrich, T., Lichey, J.: "Bronchial and Vascular Effects of PAF in the Rat Isolated Lung are Completely Blocked by WEB 2086, a Novel Specific PAF Antagonist". *BR. J. Pharmacol.* 91, 4, 1987, 799 - 802.
31. Casley-Smith, J. R., Window, J.: "Quantitative Morphological Correlations of Alterations in Capillary Permeability Following Histamine and Moderate Burning, in the Mouse Diaphragm; and the Effects of Benzopyrones". *Microvasc. Res.* 11, 1976, 279 - 305.
32. Chand, N., Pillar, J., Diamantis, W., Sofia, R. D.: "Inhibition of Allergic Histamine Release by Azelastine and Selected Antiallergic Drugs from Rabbit Leukozytes". *Immun.* 77, 1985, 451 - 455.
33. Chang, S. W., Fedderson, C. O., Henson, P. M., Völkel, N. F.: "Platelet-Activating Factor Mediates Hemodynamic Changes and the Lung Injury in Endotoxin-Treated Rats". *J. Clin. Invest.* 79, 5, 1987, 1298 - 1509.
34. Chang, R. S. Y., Wright, K., Effros, R. M.: "Role of Albumin in Prevention of Edema in Perfused Rabbit Lungs". *J. Appl. Physiol.* 50, 1981, 10650 - 10700.
35. Chughtai, B., O'Riordan, T. G.: "Potential Role of Inhibitors of Neutrophil Elastase in Treating Diseases of the Airway". *J. Aerosol Med.* 17, 2004, 289 - 298.
36. Cochrane, C. G., Spragg, R., Revak, S. D.: "Pathogenesis of the Adult Respiratory Distress Syndrome - Evidence of Oxidant Activity in Bronchoalveolar Lavage Fluid". *J. Clin. Invest.* 71, 1982, 754 - 761.
37. Cohen, A. B., Rossi, M., Geczy, D., Knight, L.: "Neutrophil Turnover in Normal Rabbit Lungs". *J. Clin. Invest.* 69, 1982, 794 - 789.
38. Craddock, P. R., Fehr, J., Dalmaso, A. P., Brigman, K. L., Jacob, H. S.: "Hemodialysis Leukopenia: Pulmonary Vascular Leukostasis Resulting from Complement Activation by Dialyzer Cellophane Membranes". *J. Clin. Invest.* 59, 1977, 879 - 888.
39. Craddock, P. R., Hammerschmidt, D., White J. G., Dalmaso, A. P., Jakob, H. S.: "Complement (C5a)- Induced Granulocyte Aggregation in Vitro. A Possible Mechanism of Complement Mediated Leukostasis and Leukopenia". *J. Clin. Invest.* 60, 1977, 260 - 264.
40. Craddock, P. R.: "Complement, granulocytes, and shock lung". *Am. J. Emerg. Med.* 2, 1984, 78 - 81.
41. Cunningham, R. T., Mangold, S. E., Spruce, L. W., Ying, Q. I., Simon, S. R., Wieczorek, M., Ross, S., Cheronis, J. C., Kirschenheuter, G. P.: "Synthesis and Evaluation of CE-0266: A New Human Neutrophil Elastase Inhibitor". *Bioorganic Chem.* 20, 1992, 345 - 355.
42. Cusak, N. J.: "Platelet-Activating Factor". *Nature*, 285, 1980, 193 - 195.

43. Dahinden, C. A., Kurimoto, J., Baggiolini, M., Dewald, B., Walz, A.: "Histamine and Sulfidoleukotriene Release from Human basophils: Different effects of Antigen, Anti-IgE, C5a, f-Met-Leu-Phe and the Neutrophil-Activating Peptide NAF". *Immunol.* 90, 1989, 113 - 118.
44. Dahlen, S.-E., Björk, J., Hedquist, P., Arfors, K.-E., Hammarström, S., Lindgren, J.-A., Samuelsson, B.: "Leukotrienes Promote Plasma Leakage and Leukocyte Adhesion in Postcapillary Venules: In Vivo Effects with Relevance to the Acute Inflammatory Response". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 1981, 3887 - 3891.
45. Davidson, D., Singh, M., Wallace, G. F.: "Role of Leukotriene C<sub>4</sub> in Pulmonary Hypertension: Platelet-Activating Factor vs. Hypoxia". *J. Appl. Physiol.* 68, 4, 1990, 1628 - 1633.
46. Dewald, B., Rindler-Ludwig, R., Bretz, U., Baggiolini, M.: "Subcellular Localization and Heterogeneity of Neutral Proteases in Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocytes". *J. Exp. Med.* 141, 1975, 709 - 723.
47. Dittmer, H., Jochum, M., Fritz, H.: "Freisetzung von granulozytärer Elastase und Plasmaproteinveränderungen nach traumatisch-hämorrhagischem Schock". *Unfallchirurg.* 89, 1986, 160 - 169.
48. Dvorak, A. M.: "Histamine Content and Secretion in Basophils and Mast Cells". *Prog. Histochem. Cytochem.* 33, 1998, 169 - 320.
49. Dvorak, A. M., Morgan, E. S., Lichtenstein, L. M., MacGlashan, D. W.Jr.: "Activated Human Basophils Contain Histamine in Cytoplasmic Vesicles". *Int. Arch. Allergy Immunol.* 105, 1994, 8 - 11.
50. Evans, T. W., Dent, G., Rogers, D. F., Aursudkij, B., Chung, K. F., Barnes, P. J.: "Effect of a PAF Antagonist, WEB 2086, on Airway Microvascular Leakage in the Guinea-Pig and Platelet Aggregation in Man". *Br. J. Pharmacol.*, 94, 1, 1988, 164 - 168.
51. Estenssoro, E., Dubin, A., Laffaire, E., Canales, H., Saenz, G., Moseinco, M., Pozo, M., Gomez, A., Baredes, N., Jannello, G., Osatnik, J.: "Incidence, clinical course, and outcome in 217 Patients with acute respiratory distress syndrom". *Critical Care Med.* 30, 11, 2002, 2450 - 2456.
52. Feinmark, S. J., Cannon, P. J.: "Endothelial Cell Leukotriene C<sub>4</sub> Synthesis Results from Intercellular Transfer of Leukotriene A<sub>4</sub> Synthesized by Polymorphnuclear Leukocytes". *J. Biol. Chem.* 261, 1986, 16466 - 16472.
53. Ferrante, A., Nandoskar, M., Walz, A., Goh, D. H. B., Kowanko, I. C.: "Effects of Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin- 1Alpha and Beta on Human Neutrophil Migration, Respiratory Burst and Degranulation". *Int. Arch. Allergy Appl. Immun.* 86, 1988, 82 - 91.
54. Flick, K.: "Effekte stimulierter Granulozyten und granulozytärer Elastase in der pulmonalen Zirkulation. Untersuchungen am Modell der isolierten, ventilierten und perfundierten Kaninchenlunge". *Diss. Giessen* 1989.

55. Folds, J. D., Prince, J., Spitznagel, J. K.: "Limited Cleavage of Human Immunoglobulins by Elastase of Human Neutrophil Polymorphnuclear Granulocytes". *Lab. Invest.* 39, 1978, 313 - 321.
56. Frank, L., Massaro, D.: "The Lung and Oxygen Toxicity". *Arch. Int. Med.* 139, 1979, 347 - 350.
57. Fritz, H., Jochum, M.: "Granulocyte Proteinase as Mediators of Unspecific Proteolysis in Inflammation". *A Review. Folia. Histochem. Cytobiol.* 24, 1986, 99 - 115.
58. Gadek, J. E., Fells, G. A., Zimmerman, R. L., Rennard, S. I., Crystal, R. G.: "Antielastases of the Human Alveolar Structures. Implications for the Protease-Antiprotease Theory of Emphysema". *J. Clin. Invest.* 68, 1981, 889 - 898.
59. Gando, S., Kameue, T., Matsuda, N., Sawamura, A., Hayakawa, M., Kato, H.: "Systemic inflammation and disseminated intravascular coagulation in early stage of ALI and ARDS: role of neutrophil and endothelial activation". *Inflammation* 4, 28, 2004, 237 - 244.
60. Garcia, J. G. N., Noonan, T. C., Jubiz, W., Malik, A. B.: "Leukotrienes and the Pulmonary Microcirculation". *Am. Rev. Resp. Dis.* 136, 1987, 161 - 169.
61. Garcia, R. C., Peterson, C. G. B., Segal, A. W., Venge, P.: "Elastase in the Different Primary Granules of the Human Neutrophil". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1132, 1985, 1130 - 1136.
62. Gay, J. C., Beckman, J. K., Brash, A. R., Oates, J. A., Lukens, J. N.: "Enhancement of Chemotactic Factor- Stimulated Neutrophil Oxidative Metabolism by Leukotriene B<sub>4</sub>". *Blood.* 64, 1984, 780 - 785.
63. Goeckenjan, G.: "Notfalldiagnostik bei akuter respiratorischer Insuffizienz". *Dtsch. Med. Wschr.* 111, 1986, 824 - 826.
64. Goldblum, S. E., Cohen, D. A., Gillespie, M. N., McClan, C. J.: "Interleukin-1- Induced Granulocytopenia and Pulmonary Leukostasis in Rabbits". *J. Appl. Physiol.* 62, 1987, 122 - 128.
65. Goldblum, S. E., Jay M., Yoneda, K., Cohen, D. A., McClain, C. J., Gillespie, M. N.: "Monokine-Induced Acute Lung Injury in Rabbits". *J. Appl. Physiol.* 63, 1987, 2093 - 2100.
66. Goldstein, I. M., Roos, D., Kaplan, H. B., Weissmann, G.: "Complement and Immunoglobulins Stimulate Superoxide Production by Human Leukocytes Independently of Phagocytosis". *J. Clin. Invest.* 56, 1975, 1155 - 1163.
67. Goss, C. H., Brower, R. G., Hudson, L. D., Rubenfeld, G. D.: "Incidence of acute lung injury in the United States." *Crit. Care Med.* 6, 2003, 1607 - 1611.
68. Gresele, P., Arnout, J., Coene, M. C., Deckmyn, H., Vermeylen, J.: "Leukotriene B<sub>4</sub> Production by Stimulated Whole Blood: Studies with Isolated Polymorphnuclear Cells". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137, 1986, 334 - 342.

69. Hakim, T. S., Michel, R. P., Chang, H. K.: "Partitioning of Pulmonary Vascular Resistance in Dogs by Arterial and Venous Occlusion". *J. Appl. Physiol.* 52, 1982, 7110 - 7150.
70. Havemann, K., Gramse, M.: "Physiology and Pathophysiology of Neutral Proteinases of Human Granulocytes". *Adv. Exp. Med. Biol.* 167, 1984, 1 - 20.
71. He, S., Gaca, M. D., McEuen, A. R., Walls, A. F.: "Inhibitors of Chymase as Mast Cell-Stabilizing Agents: Contribution of Chymase in the Activation of Human Mast Cells". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 291, 1999, 517 - 523.
72. He, S., Walls, A. F.: "The Induction of a Prolonged Increase in Microvascular Permeability by Human Mast Cell Chymase". *Eur. J. Pharm.* 352, 1998, 91 - 98.
73. He, S., Gaca, M. D., Walls, A. F.: "A Role for Tryptase in the Activation of Human Mast Cells: Modulation of Histamine Release by Tryptase and Inhibitors of Tryptase". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289, 1999, 289 - 297.
74. Heck, L. W., Darby, W. L., Hunter, F. A., Bhowm, A., Miller, E. J., Bennett, J. C.: "Isolation, Characterization, and Amino-Terminal Amino Acid Sequence Analysis of Human Neutrophil Elastase from Normal Donors". *Anal. Biochem.* 149, 1985, 153 - 162.
75. Heideman, M., Kaijser, B., Gelin, L.-E.: "Complement Activation Early in Endotoxin Shock". *J. Surg. Res.* 26, 1979, 74 - 78.
76. Heidtmann, H. H., Travis, J.: "A Novel Chymotrypsin-Like Serine Proteinase from Human Lung". *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 374, 1993, 871 - 875.
77. Heine, H.: "Proteases - Proteases Inhibitors: A Local Cellular Information System". *Adv. Exp. Med. Biol.* 167, 1984, 121 - 127
78. Henson, P. M.: "The Immunologic Release of Constituents from Neutrophil Leukocytes. II. Mechanisms of Release during Phagocytosis, and Adherence to Non Phagocytosable Surfaces". *J. Immunol.* 107, 1971, 1547 - 1557.
79. Henson, P. M., Johnson, H. B., Spiegelberg, H. L.: "The Release of Granule Enzymes from Human Neutrophils Stimulated by Aggregated Immunoglobulins of Different Classes and Subclasses". *J. Immunol.* 109, 6, 1972, 1182 - 1192.
80. Heuer, H., Casals-Stenzel, J.: "The Pathophysiological Role of PAF in Anaphylactic Lung Reaction in the Guinea Pig and in Endotoxin Shock Evidenced by the Specific PAF-Antagonist WEB 2086". *Prog. Clin. Biol. Res.* 308, 1989, 925 - 930.
81. Higgs, G. A., Moncada, S., Vane, J. R.: "Prostacyclin Reduces the Number of "Slow Moving" Leukocytes in Hamster Cheek Pouch Venules". *J. Physiol. (London)* 280, 1978, 55 - 56.
82. Hinman, L. M., Stevens, C. A., Matthay, R. A., Gee, J. B. L.: "Elastase and Lysosome Activities in Human Alveolar Macrophages". *Am. Rev. Resp. Dis* 121, 1980, 263 - 271.



83. Hjorth, R., Jonsson, A.-K., Vretblad, P. A.: "Rapid Method of Purification of Human Granulocytes Using Percoll. A Comparison with Dextran Sedimentation". *J. Immunol. Meth.* 43, 1981, 95 - 101.
84. Hochstraße, K., Schuster, R., Reichert, R., Heimbürger, N.: "Nachweis und quantitative Bestimmung von Komplexen zwischen Leukozytenproteasen und  $\alpha_1$ -Antitrypsin in Körpersekreten und Körperflüssigkeiten". *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 353, 1972, 1120 - 1124.
85. Hogan, A. D., Schwartz, L. B.: "Markers of Mast Cell Degranulation". *Methods* 13, 1997, 43 - 52.
86. Hoover, R. L., Folger, R., Haering, W. A., Ware, B. R., Karnovsky, M. J.: "Adhesion of Leukocytes to Endothelium: Role of Divalent Cations, Surface Charge, Chemotactic Agents and Substrate". *J. Cell. Sci.* 45, 1980, 73 - 86.
87. Huang, Y. C., Kennedy, T. P., Su, Y. F., Watkins, W. D., Whorton, A. R., Piantadosi, C. A.: "Protection Against Platelet - Activating Factor-Induced Injury by Interferon Inducer in Perfused Rabbit Lung". *J. Appl. Physiol.* 74, 1, 1993, 251 - 258.
88. Huang, Y. C., Nozik, E. S., Piantadosi, C. A.: "Superoxide Dismutase Potentiates Platelet-Activating Factor-Induced Injury in Perfused Lung". *Am. J. Physiol.* 266, 3 Pt. 1, 1994, L 246 - L 254.
89. Hultsch, T., Ennis, M., Heidtmann, H. H.: "The Effect of Serine Esterase Inhibitors on Ionophore-Induced Histamine Release from Human Pulmonary Mast Cells". *Agents Actions* 23, 1988, 198 - 200.
90. Hwang, S. B., Lam, M. H., Shen, T. Y.: "Specific Binding Sites for Platelet Activating Factor in Human Lung Tissues". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128, 2, 1985, 972 - 979.
91. Hyman, A. L.: "The Direct Effects of Vasoactive Agents on Pulmonary Veins. Studies of Responses to Acetylcholine, Serotonin, Histamine, and Isoproterenol in Intact Dogs". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 168, 1969, 96 - 105.
92. Isakson, P. C., Raz, A., Denny, S. E., Wyche, A., Needleman, P.: "Hormonal Stimulation of Arachidonate Release from Isolated Perfused Organs". *Prostaglandins.* 14, 1977, 853 - 871.
93. Igarashi, Y., Kurosawa, M., Ishikawa, O., Miyachi, Y., Saito, H., Ebisawa, M.: "Characteristics of Histamine Release from Cultured Human Mast Cells". *Clin. Exp. Allergy.* 26, 1996, 597 - 602.
94. Jacob, H. S.: "Role of Complement and Granulocytes in Septic Shock". *Acta Chir. Scand.* 499, 1980, 97 - 106.
95. Janoff, A.: "Human Granulocyte Elastase. Further Delineation of its Role in Connective Tissue Damage". *Am. J. Path.* 68, 1972, 579 - 591.
96. Janoff, A.: "Elastase and Emphysema - Current Assessment of the Protease-Antiprotease Hypothesis". *Am. Rev. Respir. Dis.* 132, 1985 a, 417.

97. Janoff, A., Carp, H., Lee, D. K., Drew, R. T.: "Cigarette smoke inhalation decreases  $\alpha_1$ -Antitrypsin activity in rat lung". *Science* 206, 1979, 1313 - 1314.
98. Janoff, A., Scherer, J.: "Mediators of Inflammation in Leukocyte Lysosomes. IX. Elastolytic Activity in Granules of Human Polymorphonuclear Leukocytes". *J. Exp. Med.* 128, 1968, 1137 - 1155.
99. Janoff, A., Sloan, B., Weinbaum, G., Damiano, V., Sandhaus, R. A., Elias, J., Kimbel, P.: "Experimental Emphysema Induced with Purified Human Neutrophil Elastase: Tissue Localization of the Instilled Proteases". *Am. Rev. Respir. Dis.* 115, 1977, 461 - 478.
100. Janoff, A., White, R., Carp, H., Harel, S., Dearing, R., Lee, D.: "Lung Injury Induced by Leukocytic Proteases". *Am. J. Path.* 97, 1979, 111 - 136.
101. Jochum, M., Machleidt, W., Fritz, H.: "Proteolysis-Induced Pathomechanisms in Acute Inflammation and Related Therapeutic Approaches". *Agents Actions Suppl.* 42, 1993, 51-69.
102. Jochum, M., Duswald, K.H., Neumann, S., Witte, J., Fritz, H.: "Proteinases and their Inhibitors in Septicemia - Basic Concepts and Clinical Implications". In: Hörl, W. H., Heidland, A. (Eds.): *Proteases. Plenum Publishing Corporation, 1984, 391 - 404.*
103. Jochum, M., Lander, S., Heimbürger, N., Fritz, H.: "Effect of Human Granulocytes Elastase on Isolated Human Antithrombin III". *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 362, 1981, 103 - 112.
104. Jochum, M., Witte, J., Duswald, K. -H., Inthorn, D., Welter, H., Fritz, H.: "Pathobiochemistry of Sepsis: Role of Proteinases, Proteinase Inhibitors and Oxidizing Agents". *Behring Inst. Mitt.* 79, 1986, 121 - 130.
105. Johnson, P. R., Armour, C. L., Black, J. L.: "The Action of Platelet Activating Factor and its Antagonism by WEB 2086 on Human Isolated Airways". *Eur. Respir. J.* 3, 1, 1990, 55 - 60.
106. Johnson, U., Ohlsson, K., Olsson, I.: "Effects of Granulocyte Neutral Proteases on Complement Components". *Scand. J. Immunol.* 5, 1976, 421 - 426.
107. Katunuma, N.: "New Biological Functions of Intracellular Proteases and their Endogenous Inhibitors as Bioreactants". *Adv. Enzyme Regul.* 30, 1990, 377 - 392.
108. Kay, J. M., Waymire, J. C., Grover, R. F.: "Lung Mast Cell Hyperplasia and Pulmonary Histamine Forming Capacity in Hypoxic Rats". *Am. J. Physiol.* 226, 1974, 178 - 184.
109. Khiav, B. E., Pearce, F. L.: "Role of Serine Esterases in Mast Cell Activation". *Br. J. Pharmacol.* 123, 1998, 1267 - 1273.
110. Kido, H., Fukusen, N., Katunuma, N.: Chymotrypsin- and Trypsin-Type Serine Proteases in Rat Mast Cells: Properties and Funktionen". *Arch. Biochem. Biophys.* 239, 1985, 436 - 443.

111. Kirschenheuter, G. P., Oleksyszyn, J., Spruce, L. W., Wieczorek, M., Kloppel, T. M., Sanford, R. S., Cheronis, J. C.: "Synthesis and Characterization of Human Neutrophil Elastase Inhibitors Derived from Aromatic Esters of Phenylalkanoic Acids". In: *Proteases, Protease Inhibitors and Protease-Derived Peptides*. Basel: Birkhäuser Verlag, 1993, 71 - 82.
112. Klausner, J. M., Kobzik, L., Valeri, C. R., Shepro, D., Hechtman, H. B.: "Selective Lung Leukosequestration after Complement Activation". *J. Appl. Physiol.* 65, 1988, 80 - 88.
113. Klebanoff, S. J.: "Oxygen Metabolism and the Toxic Properties of Phagocytes". *Ann. Int. Med.* 93, 1980, 480 - 489.
114. Klingelmann, H. -G., Egbring, R., Holst, F., Gramse, M., Havemann, K.: "Digestion of  $\alpha_2$ -Plasmin Inhibitor by Neutral Proteases from Human Leukocytes". *Thromb. Res.* 24, 1981, 479 - 483.
115. Kobayashi, H., Shibata, K., Fujie, M., Terao, T.: "Urinary Trypsin Inhibitor Reduce The Release of Histamine from Rat Peritoneal Mast Cells". *J. Lab. Clin. Med.* 131, 1998, 3775 - 3850.
116. Koch, T., H. P., Rosenkranz, S., H., van Ackern, K.: "Alterations of Filtration Coefficients in Pulmonary Edema of Different Pathogenesis". *J. Appl. Physiol.* 73 (6), 1992, 2396 - 2402.
117. Korth, R., Hirafuji, M., Keraly, C. L., Delautier, D., Bidault, L., Benveniste, J.: "Interaction of the PAF Antagonist WEB 2086 and its Hetrazepine Analogues. with Human Platelets and Endothelial Cells". *Br. J. Pharmacol.* 98, 2, 1989, 653 - 661.
118. Korthuis, R. J., Wang, C. Y., Spielman, W. S.: "Transient Effects of Histamine on the Capillary Filtration Coefficient". *Microvasc. Res.*, 28, 1984, 322 - 344.
119. Kramps, J. A., Twisk, C. van, Linden, A. C. van der: "L-Pyroglutamyl-L-prolyl-L-Valine-P-Nitroanilide, a Highly Specific Substrate for Granulocyte Elastase". *J. Clin. Lab. Invest.* 43, 1983, 427 - 432.
120. Kröger, C., Yukawa, T., Dent, G., Venge, P., Chung, K. F., Barnes, P. J.: "Stimulation of Degranulation from Human Eosinophils by Platelet -Activating Factor". *J. Immunol.* 142, 10, 1989, 3518 - 3526.
121. Ku, E. C., Lee, W., Ktohari, H. V., Scholer, D. W.: "Effect of Diclofenac Sodium on the Arachidonic Acid Cascade". *Am. J. Med.* 28, 80 ( 4b), 1986, 18 - 23.
122. Lang, H., Jochum, M., Fritz, H., Redl, H.: "Validity of the Elastase assay in Intensive Care Medicine". In: Schlag, G., Redl, H. ( Eds.): *Second Vienna Shock Forum*. New York: Alan R. Liss, 1989, 701 - 706.
123. Le, J., Vilcek, J.: "Biology of Disease. Tumor Necrosis Factor and Interleukin 1: Cytokines with Multiple Overlapping Biological Activities." *Lab. Invest.* 56, 1987, 234 - 248.
124. Legrand, Y., Caen, J., Robert, L.: "Substrate Specificity of Leukocyte and Platelet Elastases". *Thrombos. Haemostas.* 39, 1978, 785 - 796.

125. Liles, W. C., Meier, K. E., Henderson, W. R.: "Phorbol Myristate Acetate and the Calcium Ionophore A23187 Synergistically Induce Release of LTB<sub>4</sub> by Human Neutrophils: Involvement of Protein Kinase C Activation in Regulation of the 5-Lipoxygenase Pathway". *J. Immunology*. 138, 1987, 3396 - 3402.
126. Linehan, J. H., C. A., Rickaby, D. A.: "Distribution of Vascular Resistance and Compliance in a Dog Lung Lobe". *J. Appl. Physiol.* 53, 1982, 158 - 168.
127. Lotner, G. Z., Lynch, J. M., Betz, S. F., Henson, P. M.: "Human Neutrophil Derived Platelet Activating Factor". *J. Immunol.* 124, 1980, 676 - 680.
128. Ludolph-Hauser, D., Rueff, F., Sommerhoff, C. P., Przybilla, B.: "Tryptase, a Marker for the Activation and Localization of Mast Cells". *Hautarzt* 50, 1999, 556 - 561.
129. Lu, Y., Song, Z., Zhou, X., Huang, S., Zhu, D., Yang, C. B. X., Sun, B., Spragg, R.: "A 12 month clinical survey of incidence and outcome of ARDS in Shanghai ICU's." *Intensive Care Med.* 12, 2004, 2197 - 2203.
130. Magno, M., Atkinson, B., Katz, A., Fishman, A. P.: "Estimation of Pulmonary Interstitial Fluid Space Compliance in Isolated Perfused Rabbit Lung". *J. Appl. Physiol.* 48, 1980, 677 - 683.
131. Mainardi, C. L., Dixit, S. N., Kang, A. H.: "Degradation of Type IV (Basement Membrane) Collagen by a Proteinase Isolated from Human Polymorphonuclear Leukocyte Granules". *J. Biol. Chem.* 255, 1980, 5435 - 5441.
132. Majno, G., Palade, G. E.: "Studies on Inflammation. I. The effect of Histamine and Serotonin on Vascular Permeability: An Electron Microscopic Study". *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 11, 1961, 571 - 606.
133. Majno, G., Shea, S. M., Leventhal, M.: "Endothelial Contraction Induced by Histamine-Type Mediators". *The J. of Cell Biol.* 42, 1969, 647 - 652.
134. Malik, A. B., Perlman, M.B., Cooper, J.A., Noonan, T., Bizios, R.: "Pulmonary Microvascular Effects of Arachidonic Acid Metabolites and their Role in Lung Vascular Injury". *Fed. Proc.* 44. 1985, 36 - 42.
135. Martin, G. S., Eaton, S., Mealer, M., Moss, M.: "Extravascular lung water in patients with severe sepsis: a prospective cohort study". *Crit. Care* 9, 2005, 74 - 75.
136. Martin, U.: "Experimentelle Untersuchungen zum Einfluß freigesetzter Granulozytenproteasen auf die pulmonalvaskuläre Permeabilität". *Diss. Giessen*, 1987
137. Martin, W. J., Taylor, J. C.: "Abnormal Interaction of  $\alpha_1$ -Antitrypsin and Leukocyte Elastolytic Activity in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease". *Am. Rev. Respir. Dis.* 120, 1979, 411 - 419.
138. Matsumoto, K., Taki, F., Kondoh, Y., Taniguchi, H., Takagi, K.: "Platelet-Activating Factor in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Patients with Adult Respiratory Distress Syndrome". *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 19, 7, 1992, 509 - 515.
139. McColl, S. R., Hurst, N. P., Cleland, L. G.: "Modulation by Phorbol Myristate Acetate of Arachidonic Acid Release and Leucotriene Synthesis by Human

Polymorphnuclear Leukocytes Stimulated with A23187". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141, 1986, 399 - 404.

140. McCormack, D. G., Barnes, P. J., Evans, T. W.: "Platelet-Activating Factor: Evidence Against a Role in Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction". *Crit. Care Med.* 18, 12, 2000, 1398 - 1402.

141. McGuire, W. W., Spragg, R. G., Cohen, C. G.: "Studies on the Pathogenesis of the adult Respiratory Distress Syndrome". *J. Clin. Invest.* 69, 1982, 543 - 553.

142. Messner, R. P., Jelinek, J.: "Receptors for Human  $\beta$ -Globulin on Human Neutrophils". *J. Clin. Invest.* 49, 1970, 2165 - 2171.

143. Minami M., Nakahara, K., Matsumura, A., Mizuta, A.: "Histamine Release from Pulmonary Mast Cells after Lung Transplantation in Rats". *J. Heart Lung Transplant* 14, 1995, 505 - 511.

144. Mittermeyer, Ch., Ostendorf, P., Rieder., U. N.: "Pathologisch-anatomische Untersuchungen bei der respiratorischen Insuffizienz durch Schock. I. lichtmikroskopische und biochemische Analyse". *Intensivmed.* 14, 1977, 252 - 262.

145. Moran, J. L., Solomon, P. J., Fox, V., Salagaras, M., Williams, P. J., Quinlian, K., Bersten, A. D.: "Modelling 30 day mortality in ARDS in an adult ICU". *Anaesth. Intensive Care* 3, 2004, 317 - 329.

146. Movat, H. Z., Cybulsky, M. I., Colditz, I. G., Chan, M. K. W., Dinarello, C. A.: "Acute Inflammation in Gram-Negative Infection: Endotoxin, Interleukin 1, Tumor Necrosis Factor and Neutrophils". *Fed. Proc.* 46, 1987, 97 - 104.

147. Murray, J. F.: "Mechanisms of acute respiratory failure". *Am. Rev. Resp. Dis.* 115, 1977, 1071 - 1078.

148. Nadeau, M., Fruteau de Lacos, B., Picard, S.: "Studies on Leukotriene B<sub>4</sub> Omega-Oxidation in Human Leukocytes". *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 62, 1984, 1321 - 1326.

149. Nadel, J. A.: "Roles of Mast Cell Proteases in Airways". *Drugs* 37, 1989, 51 - 55.

150. Nathan, C. F.: "Secretory Products of Macrophages". *J. Clin. Invest.* 79, 1987, 319 - 326.

151. Neuhof, H., Neuhof, Ch., Seeger, W.: "Schock" Lehrbuch der internistischen Intensivtherapie, 3., überarb. und erw. Aufl. –Stuttgart; New York: *Schattauer* 2003, 281 - 334.

152. Neuhof, H.: "Role of Proteinases in the Pathophysiology of Organ Failure". *First Wiggers-Bernard Conference on Shock, Sepsis and Organ Failure. Schloß Fuschl, Austria, 1989.*

153. Neuhof, H.: "Action and Interaction of Mediator Systems and Mediators in the Pathogenesis of ARDS and Multiorgan Failure". *Acta Anaesthesiol. Scand.* 35, Supplementum 95, 1991, 7 - 14.

154. Neuhof, H., Seeger, W., Roka, H. W. L., Lasch, H. G.: "Verbrauchskoagulopathie und Lungenfunktion". *Internist* 23, 1982, 457 - 462.
155. Neuhof, H.: "II. Wirkung von Mediatoren und Toxinen - Zur Rolle der Mediatoren bei der Sepsis". *Intensivmedizin und Notfallmedizin, Intensivmed* 26, 1989, 3 - 9.
156. Neuhof, H., Lasch, H. G.: "Interactions between Intravascular Coagulation and Tissue Perfusion". *Clin. Hemorheol.* 4, 1984, 5 - 13.
157. Neuhof, H., Noack, A., Hoffmann CH., Seeger, W.: "Thromboxane-Mediated Pulmonary Vasoconstriction in Rabbits Induced by Acute Alveolar Hypoxia". In: *Schrör, C. (Eds.): Prostaglandins and other Eicosanoids in the Cardiovascular System. Basel: Karger, 1985, 328 - 334.*
158. Neuhof, H., Seeger, W., Wolf, H. R. D.: "Generation of Mediators by Limited Proteolysis during Blood Coagulation and Fibrinolysis - its Pathogenetic Role in the Adult Respiratory Distress Syndrome (ARDS)". *Resuscitation.* 14, 1986, 23 - 32.
159. Neuhof, H., Seeger, W., Suttorp, N.: "Activation of the Pulmonary Arachidonic Acid System and its Consequences for Hemodynamics and Fluid Balance". In: *Schlag, G., Redl, H. (Eds.): First Vienna Shock Forum: Pathophysiological Role of Mediators and Mediator Inhibitors in Shock. New York: Alan R. Liss, 1987, 289 - 300.*
160. Neuhof, H., Hoffmann, CH., Seeger, W., Suttorp, N., Fritz, H.: "Proteases as Mediators of Pulmonary Vascular Permeability". In: *Schlag, G., Redl, H. (Eds.): Second Vienna Shock Forum. New York: Alan R. Liss, 1989, 305 - 314.*
161. Neuhof, H., Fritz, H.: "Proteinases as Mediators of the Disturbance of Pulmonary Vascular Permeability in Sepsis, Polytrauma and ARDS". In: *Rügheimer, E. (Eds.): New Aspects on Respiratory Failure. Berlin: Springer, 1989, 67 - 74.*
162. Neuhof, H.: "Zur pathogenetischen Bedeutung der klassischen Kaskadensysteme und des Arachidonsäure-Metabolismus". *Med. Welt* 35, 1984, 1457 - 1462.
163. Neumann, S., Gunzer, G., Henrich, N., Lang.: "PMN Elastase Assay: Enzyme Immunoassay for Human Polymorphnuclear Elastase Complexed with  $\alpha_1$ -Proteinase Inhibitor". *J. Clin. Chem. Biochem.* 22, 1984, 693 - 697.
164. Nicolaysen, G.: "Increase in Cappillary Filtration Rate Resulting from Reduction in the Intravascular Calcium Ion Concentration". *Acta. Physiol. Scand.* 81, 1971, 517 - 527.
165. Ohlsson, K., Olsson, I.: "Neutral Proteases of Human Granulocytes: III. Interaction between Human Granulocyte Elastase and Plasma Protease Inhibitors". *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 34, 1974, 349 - 355.
166. Ohlsson, K., Olsson, A.-S.: "Immunoreactive Granulocyte Elastase in Human Serum". *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 359, 1988, 1531 - 1539.

167. Palmblad, J., Malmsten, C. L., Uden, A.-M., Radmark, O., Engsted, L., Samuelsson, B.: "Leukotriene B<sub>4</sub> is a Potent and Stereospecific Stimulator of Neutrophil Chemotaxis and Adherence". *Blood*. 58, 2001, 658 - 662.
168. Patton, L. M.: "In Vivo Evaluation of MDL 201, 404 YA, a Novel Inhibitor of Human Neutrophil Elastase". In: *Proteases, Protease Inhibitors and Protease-Derived Peptides*. Basel: Birkhäuser Verlag, 1993, 83 - 96.
169. Pearson, J. D., Carleton, J. S., Beesley, J. E., Hutchings, A., Gordon, J. L.: "Granulocyte Adhesion to Endothelium in Culture". *J. Cell. Sci.* 38, 1979, 225 - 235.
170. Pederson, K. E., Rigby, P. J., Goldie, R. G.: "Quantitative Assessment of Increased Airway Microvascular Permeability to 125I-Labelled Plasma Fibrinogen Induced by Platelet Activating Factor and Bradykinin". *Br. J. Pharmacol.* 104, 1, 2001, 128 - 132.
171. Peter, K., Beyer, A.: "Akute respiratorische Insuffizienz". *Internist*. 21, 1980, 4 - 10.
172. Petitou, M., Imberty, A., Duchaussoy, P., Driguez, P. A., Ceccato, M. L., Gourvenec, F., Sizun, P., Héraux, J. P., Perez, S., Herbert, J. M.: "Experimental Proof for the Structure of a Thrombin-Inhibiting Heparin Molecule". *Chemistry*. 7, 2001, 858 - 73.
173. Pletcher, C.H., Cunningham, M., Nelsestuen, G.L.: "Kinetic Analysis of Various Heparin Fractions and Heparin Substitutes in the Thrombin Inhibition Reaction". *Biochim. Biophys. Acta*. 28, 1985, 106 - 13.
174. Pober, J.S., Bevilacqua, M. P., Mendrick, D. L., Lapierre, L. A., Fiers, W., Gimbrone, M. A. Jr.: "Two Distinct Monokines, Interleukin 1 and Tumor Necrosis Factor, each Independently Induces Biosynthesis and Transient Expression of the Same Antigen on the Surface of Cultured Human Vascular Endothelial Cells". *J. Immunol.* 136, 1996, 1680 - 1687.
175. Pretolani, M., Lefort, J., Malanchere, E., Vargaftig, B. B.: "Interference by the Novel PAF-Acether Antagonist WEB 2086 with the Bronchopulmonary Responses to PAF-Acether and to Active and Passive Anaphylactic Shock in Guinea-Pigs". *Eur. J. Pharmacol.* 21, 140, 3, 1987, 311 - 321.
176. Redl, H., Paul, E., Goris, R. J. A., Pacher, R., Woloszczuk, W., Schlag, G.: "Plasma Levels of Elastase  $\alpha_1$ -Protease Inhibitor Complex in the Monitoring of ARDS and Multi-Organ Failure - a Summary of Three Clinical Trials". *2nd Int. Congr. On Proteases*, 1987.
177. Regel, G., Dwenger, A., Seidel, J., Nerlich, M. L., Sturm, J. A., Tscherne, H.: "Die Bedeutung der neutrophilen Granulozyten bei der Entstehung des posttraumatischen Lungenversagens". *Unfallchirurg* 90, 1987, 99 - 106.
178. Riede, U. N., Mittermeyer Ch., Hassenstein, J., Bensing, K., Sandritter, W.: "Pathologisch-anatomische Untersuchungen bei der respiratorischen Insuffizienz durch Schock. II. Ultrastrukturell-morphometrische Befunde". *Intensivmed.* 14, 1987, 263 - 273.

179. Riede, U.-N., Costabel, U.: „Respiratorisches System“. *Allgemeine und spezielle Pathologie, U.-N., Schäfer, H.-E, Wehner, H. 2., neu bearbeitete Aufl. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verl., 1989, 225 - 296.*
180. Rippe, B. C., Parker, J. C., Tayler, A. E.: “Effects of Histamine, Serotonin, and Norepinephrine on Circulation of Dog Lungs“. *J. Appl. Physiol. 57, 1984, 223 - 232.*
181. Rippe, B., Parker, J. C., Townsley, M. I., Mortillaro, N. A., Tayler, A. E.: “Segmental Vascular Resistances and Compliances in Dog Lung“. *J. Appl. Physiol. 62, 1987, 1206 - 1215.*
182. Rylander, C., Tylen, U., Rossi-Norrlund, R., Herrmann, P., Quintel, M., Bake, B.: “Uneven distribution of ventilation in acute respiratory distress syndrom“. *Critical Care 9, 2005, R165 - R171.*
183. Sakamoto, T., Elwood, W., Barnes, P. J., Chung, K. F.: “Effect of Inhaled Lyso-Platelet-Activating Factor on Airway Microvascular Leakage in the Guinea Pig“. *J. Appl. Physiol. 74, 3, 1993, 1117 - 1122.*
184. Samet, J. M., Noah, T. L., Devlin, R. B., Yankaskas, J. R., McKinnon, K., Dailey, L. A., Friedman, M.: “Effect of Ozone on Platelet-Activating Factor Production on Phorbol-Differentiated HL 60 Cells, a Human Bronchial Epithelial Cell Line (BEAS S 6), and Primary Human Bronchial Epithelial Cells“. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 7, 5, 2002, 514 - 522.*
185. Samuelsson, B.: “Leukotrienes: Mediators of Immediate Hypersensitivity. Reactions and Inflammation“. *Science. 220, 1983, 568 - 575.*
186. Saugstad, O. D., Aasen, A. O., Guldvog, I., Lium, B., Larsbraaten, m., Lyngaas, K., Amundsen, E.: “Activation of the Kallikrein-Kinin Systems during Experimental Lung Insufficiency in Dogs“. *Acta Chir. Scand. 499, 1980, 123 - 129.*
187. Schaberg, T., Haller, H., Lode, H.: “Evidence for a Platelet-Activating Factor Receptor on Human Alveolar Macrophages“. *Biochem. Biophys. res. Commun. 177, 2, 1991, 704 - 710.*
188. Schlag, G., Voigt, W. H., Redl, H., Glatzl, A.: “Vergleichende Morphologie des posttraumatischen Lungenversagens“. *Anästh. Intensivther. Notfallmed. 15, 1998, 315 - 339.*
189. Schlag, G., Redl, H.: “Die Leukostase in der Lunge beim Hypovolämisch - traumatischen Schock“. *Anästhesist 29, 1980, 606 - 612.*
190. Schlag, G., Redl, H.: “New Aspects of Shock Lung“. *Anästh. Intensivther. Notfallmed. 17, 1982, 86 - 91.*
191. Schmidt, W., Egbring, R., Havemann, K.: “Effects of Elastase-Like and Chymotrypsin-Like Neutral Proteases from Human Granulocytes on Isolated Clotting Factors“. *Thromb. Res. 6, 1975, 315 - 326.*
192. Schmid-Schoenbein, G. W., Usami, S., Skalak, R., Chien, S.: “The Interaction of Leukocytes and Erythrocytes in Capillary and Postcapillary Vessels“. *Microvasc. Res. 19, 1980, 45 - 70.*



193. Schror, K., Seidel, H.: "Blood-vessel Eall Arachidonate Metabolism and its Pharmacological Modification in a New in Vitro Assay System". *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 337, 2, 1988, 177 - 182.
194. Seeger, W., Wolf, H., Stähler, G., Neuhof, H., Roka, L.: "Increased Pulmonary Vascular resistance and Permeability due Arachidonate Metabolism in Isolated Rabbit Lungs". *Prostaglandins.* 23, 1982, 157 - 173.
195. Seeger, W., Lasch, H. G.: "Lunge und Sepsis – Modell eines akuten Organversagens". *Med. Welt* 38, 1987, 157 - 173.
196. Seeger, W., Neuhof, H., Graubert, E., Wolf, H., Roka, L.: "Comparative Influence of the Ca-ionophore A 23187, Bradykinin, Kallidin and Elesdoisin on the Rabbit Pulmonary Vasculature with Special Reference to Arachidonate Metabolism". In: Fritz, Back, Dietze, Haberland (Eds.): *Kinins-III. Pt.A* .: Plenum Publishing Corporation, 1983, 533 - 551.
197. Seeger, W., Wolf, H., Neuhof, H., Roka, L.: "Arachidonsäure-Metabolite als Mediatoren von Widerstandserhöhung und Schrankenstörung in der Pulmonalen Mikrozirkulation". *Prax. Klin. Pneumol.* 37, 728 - 731.
198. Seeger, W., Wolf, H., Neuhof, H., Roka.: "Release and Oxygenation of Arachidonate Acid: Nonspecific Triggering and Pathophysiological Consequences in Isolated Rabbit Lungs". *Adv. Prostagl. Thromboxane Leukotr. Res.* 12, 1983, 99 - 105.
199. Seeger, W., Ernst, C., Walmrath, D., Neuhof, H., Roka, L.: "Influence of the Thromboxane Antagonist BM 13.177 on the Arachidonic Acid-Induced Increase in Pulmonary Vascular Resistance and Permeability in Rabbit Lungs". *Thromb. Res.* 40, 1985, 793 - 805.
200. Seeger, W., Stöhr, G., Wolf, H. R. D., Neuhof, H.: "Alteration of Surfactant Function due to Protein Leakage. Special Interaction with Fibrin Monomer". *J. Appl. Physiol.* 58, 1985, 326 - 339.
201. Seeger, W., Suttrop, N., Hellwig, A., Bhakdi, S.: "Noncytolytic Terminal Complement Complexes may Serve as Calcium Gates to Elicit Leukotriene B<sub>4</sub> Generation in Human Polymorphnuclear Leucocytes". *J. Immunol.* 137, 1986, 1286 - 1293.
202. Seeger, W., Walmrath, D., Menger, M., Neuhof, H.: "Increased Lung Vascular Permeability after Arachidonic Acid and Hydrostatic Challenge". *J. Appl. Physiol.* 61, 1986, 1781 - 1789.
203. Seeger, W., Neuhof, H., Hall, J., Roka, I.: "Pulmonary Vasoconstrictor Response to Soluble Fibrin in Isolated Lungs: Possible Role of Thromboxane Generation". *Circ. Res.* 62, 1988, 651 - 659.
204. Sellmayer, A., Strasser, T., Weber, P. C.: "Differences in Arachidonic Acid Release, Metabolism and Leukotriene B<sub>4</sub> Synthesis in Human Polymorphnuclear Leukocytes Activated by Different Stimuli". *Bioch. Biophys. Acta.* 927, 2002, 4217 - 4222.

205. Shalaby, M. R., Palladino, M. R. Jr., Hirabayashi, S. E., Eessalu, T. E., Lewis, G. G. D., Shepard, H. M., Aggarawal, B. B.: "Receptor Binding and Activation of Polymorphnuclear Neutrophils by Tumor Necrosis Factor-Alpha". *J. Leucocyte Biol.* 41, 1987, 196 - 204.
206. Shasby, D. M., Vanbenthuyzen, K. M., Tate, R. M., Shasby, S. S., McMurty, I., Repine, J. E.: "Granulocytes Mediate Acute edematous Lung Injury in Rabbits and in Isolated Rabbit Lungs Perfused with Phorbol Myristate Acetate: Role of Oxygen Radicals". *Am. Rev. Resp. Dis.* 125, 1982, 443 - 447.
207. Shibamoto, T., Yamaguchi, Y., Hayashi, T. Jr., Saeki, Y., Kawamoto, M., Koyama, S.: "PAF Increases Capillary Pressure but not Vascular Permeability in Isolated Blood-Perfused Canine Lungs". *Am. J. Physiol.* 264, 5 Pt 2, 2003, H 1454 - H 1459.
208. Siebeck, M., Kohl, J., Endres, S., Spannagl, M., Machleidt, W.: "Delayed Treatment with Platelet Activating Factor Receptor Antagonist WEB 2086 Attenuates Pulmonary Dysfunction in Porcine Endotoxin Shock". *J. Trauma.* 37, 5, 1994, 745 - 751.
209. Sielaff, T. D., Sugerman, H. J., Tatum, J. L., Blocher, C. R.: "Successful Treatment of Adult Respiratory Distress Syndrome by Histamine and Prostaglandin Blockade in a Porcine Pseudomonas Model". *Surgery.* 102, 2, 1987, 350 - 357.
210. Siraganian, R. P., Hook, W. A.: "Complement-Induced Histamine Release from Human Basophils. II. Mechanism of the Histamine Release Reaction". *J. Immunol.* 116, 1976, 639 - 646.
211. Smedly, L. A., Tonnesen, M. G., Sandhaus, R. A., Haslett, C., Guthrie, L. A., Johnston, R. B. Jr.: "Neutrophil-Mediated Injury to Endothelial Cells - Enhancement By Endotoxin and Essential Role of Neutrophil Elastase". *J. Clin. Invest.* 77, 1986, 1233 - 1243.
212. Spannagl, M., Hoffmann, H., Siebeck, M., Weipert, J., Schwarz, H. P., Schramm, W.: "A Purified Antithrombin III—Heparin Complex as a Potent Inhibitor of Thrombin in Porcine Endotoxin Shock". *Thromb. Res.* 61, 1991, 1 - 10.
213. Sprung, C. L., Schultz, D. R., Marcial, E., Caralis, P. V., gelbard, M. A., Arnold, P. E., Long, W. M.: "Complement Activation in Septic Shock Patients". *Crit. Care Med.* 14, 1986, 525 - 528.
214. Stahl, G. L., Bittermann, H., Lefer, A. M.: "Protective Effects of a Specific Platelet Activating Factor (PAF) Antagonist, WEB 2086, in Traumatic Shock". *Thromb. Res.* 53, 3, 1998, 327 - 338.
215. Staub, N. C., Schultz, E. L., Koike, K., Albertine, H. H.: "Effect of Neutrophil Migration Induced by Leukotriene B<sub>4</sub> on Protein Permeability in Sheep Lung". *Fed. Proc.* 44, 1985, 30 - 35.
216. Strohmaier, W., redl, H., Schlag, G., Inthorn, D.: "D-Erythro-Neopterin Plasma Levels in Intensive Care Patients with and without Septic Complications". *Crit. Care Med.* 15, 1987, 757 - 760.

217. Suttorp, N., Seeger, W., Zinsky, W., Bhakdi, S.: "Complement Complex C 5b - 8 Induces PGI<sub>2</sub> Formation in Cultured Endothelial Cells". *Am. J. Phy.* 253, 1987, 13 - 21.
218. Suttorp, N., Galanos, C., Neuhof, H.: "Endotoxin Alters Arachidonate Metabolism in Pulmonary Endothelial Cells". *Am.J. Physiol.*, 253, 1987, 384 - 391.
219. Suttorp, N., Neuhof, H., Grimminger, F., Seeger, W.: "Biochemie und Pathobiochemie der Lunge". *Pneumologie in Praxis und Klinik*, 1994, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 67 - 121.
220. Suttorp, N., Seeger, W., Zucker-Reimann, J., Roka, L., Bhakdi, S.: "Mechanismus of Leukotriene Generation in Polymorphnuclear Leukocytes by Staphylococcal Alpha-Toxin". *Infection and Immunity*. 55, 1997, 104 - 110.
221. Suttorp, N., Nolte, A., Wilke, A., Drenckhahn, D.: "Human Neutrophil Elastase Increases Permeability of Cultured Pulmonary Endothelial Cell Monolayers". *Int. J. Microcirc.: Clin. Exp.* 13, 1993, 187 - 203.
222. Tate, R. M., Vanbenthuyzen, K. M., Shasby, D. M., McMurty, I. F., Repine, J. E.: "Oxygen-Radical-Mediated Permeability Edema and Vasoconstriction in Isolated Perfused Rabbit Lungs". *Am. Rev. Respir. Dis.* 126, 1982, 802 - 806.
223. Tate, R. M., Repine, J. E.: "State of the Art - Neutrophils and the Adult Respiratory Distress Syndrome". *Am. Rev. Respir. Dis.* 128, 1983, 552 - 559.
224. Travis, J., Potempa, J., Watorek, W., Kurdowska, A.: "Neutrophil Proteinases: Caution Signs in Designing Inhibitors Against Enzymes with Possible Multiple Funktionen". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 624, 1991, 81 - 86.
225. Tschesche, H.: "Structures and Function of Natural Inhibitors as Antagonists of Proteinase Activities". *Adv. Exp. Med. Biol.* 167, 1984, 73 - 87.
226. Tucker, A., Weir, E. K., Reeves, J. T., Grover, R. F.: "Histamine H<sub>1</sub>- and H<sub>2</sub>-Receptors in Pulmonary and Systematic Vasculature of the Dog". *Am. J. Physiol.* 229, 4, 1995, 1008 - 1013.
227. Varani, J., Fligiel, S. E. G., Till, G. O., Kunkel, R. G., Ryan, U. S., Ward, P. A.: "Pulmonary Endothelial Cell Killing by Human Neutrophils". *Lab. I.* 53, 1985, 656 - 663.
228. Vogelmeier, C., Buhl, R.: "Therapy of Lung Diseases with Antiproteases". *Pneumologie* 48, 1994, 57 - 62.
229. Wachtvogel, Y. T., Kucich, U., James, H. L., Scott, C. F., Shapira, M., Zimmermann, M., Cohen, A. B., Colman, R. W.: "Human Plasma Kallikrein Releases Neutrophil Elastase during Blood Coagulation". *J. Clin. Invest.* 72, 1983, 1672 - 1677.
230. Wachtvogel, Y. T., Pixley, R. A., Kucich, U., Abrams, W., Weinbaum, G., Shapira, M., Colman, R. W.: "Purified Plasma Factor XIIIa Aggregates Human Neutrophils and Causes Degranulation". *Blood.* 67, 1986, 1731 - 1737.

231. Wagensteen, O. D., Lysaker, E., Savaryn, P.: "Pulmonary Capillary Filtration and Reflection Coefficients in the Adult Rabbit". *Microvasc. res. In Press*.
232. Warren, J. S., Barton, P. A., Mandel, D. M., Matrosic, K.: "Intrapulmonary Tumor Necrosis Factor Triggers Local Platelet-Activating Factor Production in Rat Immune Complex Alveolitis". *Lab. Invest.* 63, 6, 1999, 746 - 754.
233. Warren, J. S.: "Relationship Between Interleukin- 1 Beta and Platelet-Activating Factor in the Pathogenesis of Acute Immune Complex Alveolitis in the Rat". *Am. J. Pathol.* 141, 3, 1992, 551 - 560.
234. Watorek, W., Farley, D., Salvesen, G., Travis, J.: " N. E. and the Cathepsin G: Structure, Function, and Biological Control". *Adv. Exp. Med. Biol.* 240, 1998, 23 - 31.
235. Weissmann, G., Zurier, R. B., Spieler, P. J., Goldstein, I. M.: "Mechanisms of Lysosomal Enzyme Release from Leukocytes Exposed to Immune Complexes and other Particles". *J. Exp. Med.* 134, 1971, 149 - 165.
236. Weissmann, G., Brand, A., Franklin, E. C.: "Interaction of Immunoglobulins with Liposomes". *J. Clin. Invest.* 53, 1974, 536 - 543.
237. Witte, S.: "Trombin as a Permeability Influencing Agent". *Prog. Appl. Microcirc.* 12, 1987, 212 - 216.
238. Wong, F. W. S., Koh, D. S. K., Koh, A. H. M., Ting, W. L., Womg, P. T. H.: "Effects of Tyrosine Kinase Inhibitors on Antigen Challenge of Guinea Pig Lung In Vitro". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283, 1997, 131 - 137.
239. Wong, P. S., Travis, J.: "Isolation and Properties of Oxidized alpha-1-Proteinase Inhibitor from Human Rheumathoid Synovial Fluid". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96, 1989, 1449 - 1454.
240. Worthen, G. S., Goin, A. J., Mitchel, B. C., Larsen, G. L., Reeves, J. R., Henson, P. M.: "Platelet-Activating Factor Causes Neutrophil Accumulation and edema in Rabbit Lungs". *Chest.* 83, 5, 1983, 13 - 15.
241. Yamamoto, T., Cochrane, C. G.: "Guinea Pig Hageman Factor as a Vascular Permeability Enhancement Factor". *Am. J. Pathol.* 105, 1981, 164 - 175.
242. Zaslou, M. C., Clark, R. A., Stone, P. J., Calore, J. D., Snider, G. L., Franzblau, C.: "Human Neutrophil Elastase Does not Bind to Alpha1-Protease Inhibitor that Has Been Exposed to Activated Human Neutrophil". *Am. Rev. Re Dis.* 128, 1998, 434 - 439.

## **Danksagung:**

Herrn Prof. Dr. H. Neuhof, unter dessen Anleitung und in dessen Abteilung diese Arbeit entstand, möchte ich für die Überlassung des Themas und die Förderung bei der Durchführung danken.

Weiterhin danke ich Frau Antje Weber, Frau Tiziana Wieth und Herrn Harald Michnacs, die mir mit Geduld, Sachkenntnis und Freundlichkeit zur Seite standen.

Schließlich gilt mein Dank meiner ganzen Familie.

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündliche 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“.