



EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR
LIPOXYGENASE-VERMITTELTEN SIGNALTRANS-
DUKTION BEIM DURCH GRAM-NEGATIVE ERREGER
VERURSACHTEN LUNGENVERSAGEN IN ISOLIERT
PERFUNDIERTEN RATTENLUNGEN

MARC DÜNNER

INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



edition wissenschaft
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger

und dem

Sonderforschungsbereich 547 im Fachbereich Humanmedizin des
Universitätsklinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Leander Ermert

**Experimentelle Untersuchungen zur Lipoxygenase-
vermittelten Signaltransduktion beim durch
Gram-negative Erreger verursachten Lungenversagen in
isoliert perfundierten Rattenlungen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

MARC DÜNNER

Tierarzt aus Bergisch Gladbach

Gießen 2010

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer

Gutachter:

Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger

Prof. Dr. Leander Ermert

Tag der Disputation:

09.04.2010

Meinen Eltern

Doris und Heiner Dünner

1	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	1
2	<i>Vorwort</i>	2
3	<i>Einleitung</i>	3
	3.1 Sepsis und ARDS	3
	3.2 Das Krankheitsbild „Acute Respiratory Distress Syndrome“	5
	3.3 Inflammatorische Mediatoren im „acute respiratory distress syndrome“	7
4	<i>Material und Methodik</i>	16
	4.1 Material	16
	4.1.1 Tiere	16
	4.1.2 Pharmaka	16
	4.1.3 Lipopolysaccharid	16
	4.1.4 Lipoteichonsäure und Peptidoglykan	17
	4.1.5 Inhibitoren der Lipoxygenasen	17
	4.1.6 Arachidonsäure	19
	4.1.7 ELISAs	20
	4.2 Methodik	22
	4.2.1 Schlauchsystem für die Lungenperfusion	22
	4.2.2 Die isoliert perfundierte Rattenlunge	24
	4.2.3 „priming“ mit LPS und LTA/PepG	27
	4.2.4 Verabreichung von LOX-Inhibitoren	27
	4.2.5 Verabreichung von Arachidonsäure	29
	4.2.6 Probenentnahme und Probenanalyse	32
	4.2.7 Versuchsprotokollierung	32
	4.2.8 Auswertung und Statistik	33
	4.2.9 Plasmagewinnung	34
5	<i>Ergebnisse</i>	35
	5.1 Überblick	35
	5.2 Ergebnisse der LPS-Kontrollversuche	35
	5.3 Veränderungen des pulmonalarteriellen Drucks LPS-stimulierter Rattenlungen unter Einfluß von Lipoxygenase-Inhibitoren	35
	5.4 Veränderungen des Beatmungsdrucks LPS-stimulierter Rattenlungen unter Einfluß von Lipoxygenase-Inhibitoren	41

5.5	Veränderungen des Gewichts LPS- stimulierter Rattenlungen unter Einfluß von Lipoxygenase-Inhibitoren	46
5.6	Ergebnisse der ELISAs	51
5.6.1	Thromboxan	51
5.6.2	PGE ₂	55
5.6.3	6-keto-PGF _{1α}	57
5.6.4	LTC ₄	60
5.6.5	LTE ₄	62
5.7	Ergebnisse der LTA/PepG-Kontrollversuche	67
5.8	Veränderungen des pulmonalarteriellen Druckes, Beatmungsdruckes und des Gewichts „LTA/PegG- stimulierter“- Rattenlungen mit Plasma	69
5.9	Ergebnisse der ELISAs	74
5.9.1	Thromboxan	74
5.9.2	PGE ₂	76
5.9.3	6-keto-PGF _{1α}	77
6	<i>Diskussion</i>	80
7	<i>Zusammenfassung</i>	97
8	<i>Summary</i>	101
9	<i>Literaturverzeichnis - Referenzen</i>	104
10	<i>Anhang</i>	129
11	<i>Danksagung</i>	137
12	<i>Erklärung</i>	138

1 Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure / arachidonic acid
ALI	acute lung injury
ARDS	acute respiratory distress syndrome
Cys LT ₁ /LT ₂	Cysteinyl-Leukotrien
DMSO	Dimethylsulfoxid
dPAP ₀₋₁₂₀	Veränderung des PAP von t=0 bis t=120
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ERK	extracellular signal-related kinases
FLAP	five lipoxygenase activating protein
5-HETE	5-Hydroeicosatetraensäure
5-HPETE	5-Hydroperoxyeicosatetraensäure
IIPs	innate immune proteins
Il-1	Interleukin 1
LBP	Lipopolysaccharide binding protein
5-LOX	5-Lipoxygenase
12-LOX	12-Lipoxygenase
15-LOX	15-Lipoxygenase
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure (lipoteichoic acid)
LTC ₄	Leukotrien C ₄
LTE ₄	Leukotrien E ₄
LVP	left ventricular pressure (linksventrikulärer Druck)
MAPEG	membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism
MAP	mitogen-activated protein
MGST	microsomal glutathione transferases
MDP	Muramyl-dipeptid (N-Acetylmuramyl-L-Alanin-D-Isoglutamin)
PAP	pulmonal arterial pressure (pulmonalarterieller Druck)
PAP ₀	pulmonalarterieller Druck zum Zeitpunkt t=0 min
PAP ₆₀	pulmonalarterieller Druck zum Zeitpunkt t=60 min
PAP ₁₂₀	pulmonalarterieller Druck zum Zeitpunkt t=120 min
PepG	Peptidoglykan
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
6-keto-PGF _{1α}	6-keto-Prostaglandin F _{1α}
SEM	standard error of the mean
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
TNF _α	Tumornekrosefaktor alpha
TLR	toll-like receptor
TXB ₂	Thromboxan B ₂
VP	ventilation pressure (Beatmungsdruck)
W	weight (Gewicht)

2 Vorwort

Die Experimente zur vorliegenden Arbeit fanden im Zeitraum von April 2002 bis September 2003 im Laborbereich von Herrn Prof. Dr. med. W. Seeger, Medizinisches Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik II (Leiter Prof. Dr. W. Seeger), Justus-Liebig-Universität Gießen, in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Leander Ermert statt. Die vorliegende Arbeit beleuchtet die Pathogenese des „acute respiratory distress syndrome“, das unter anderem als Komplikation der Sepsis auftreten kann und einen maßgeblichem Beitrag zum septischen Schockgeschehen leistet.

Untersucht wurde der Einfluß von sieben verschiedenen Hemmstoffen des Lipoxygenasemetabolismus auf die vasale und bronchiale Reaktivität der isoliert perfundierten Rattenlunge, sowie ihr Einfluß auf die Bildung der Metaboliten der Arachidonsäure.

3 Einleitung

3.1 Sepsis und ARDS

Sepsis ist ein Krankheitsbild, das besonders in der Intensivmedizin eine große Bedeutung besitzt. Trotz intensiver Forschung und moderner Therapieansätze in den vergangenen Jahren ist das Verständnis von Ätiologie und Pathogenese der Sepsis weiterhin sehr lückenhaft.

Die allerdings nach wie vor immense Bedeutung dieses Krankheitsbildes belegen aktuelle Daten: Im Bereich der USA allein werden im Jahr rd. 700.000 Fälle mit schwerer Sepsis registriert und für die Staaten der OECD sprechen Hochrechnungen von mehr als 1,5 Mio. Fällen innerhalb dieses Zeitraums. Die Letalität für diese Patienten liegt zwischen 30 % und 50% und ist damit über die letzten 10 Jahre praktisch unverändert hoch geblieben. Neben der auf hohem Niveau stagnierenden Mortalitätsrate kam es desweiteren im Verlauf der letzten Jahre zu einem Anstieg der Vorkommenshäufigkeit. Hierauf weisen Schütte et al. (1997) und Gottschlich et al. (2007) in ihren Arbeiten hin.

Die Zunahme der Sepsisfälle ist bedingt durch die größere Anzahl diagnostischer und therapeutischer Interventionen bei Risikopatienten, die zunehmende Zahl immunsupprimierter Patienten auch infolge des Einsatzes potenter Immunsuppressiva und nicht zuletzt durch die breite, unkritische Anwendung von Antibiotika mit daraus resultierender Entwicklung multiresistenter Mikroorganismen. Desweiteren sind Tumorleiden, Diabetes mellitus, Nierenerkrankungen, Lebererkrankungen, sowie Polytraumen und Verbrennungen prädisponierend für die Entwicklung einer Sepsis.

Der Begriff Sepsis geht auf eine infektiologische Definition von Schottmüller aus dem Jahr 1914 zurück: „Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem kontinuierlich oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen und zwar derart, daß durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden“ (Schottmüller, 1914). Die Bedeutung des Begriffs Sepsis wandelte sich allerdings im Laufe der Jahre jeweils in Abhängigkeit vom wissenschaftlichen Erkenntnisstand. Abweichend von Schottmüllers Definition führte vor allem die Beobachtung, daß auch ohne das Vorliegen einer primär mikrobiellen Infektion ein ähnliches Krankheitsbild wie die bakterielle Sepsis vorliegen kann, zu einer Uneinheitlichkeit der Begriffe und einer Vielzahl unterschiedlich gebrauchter Synonyme.

Um diesen Zustand zu beenden und einheitliche, klar umrissene Fachbegriffe festzulegen, wurden 1991 durch eine amerikanische Konsensuskonferenz der Gesellschaft für Thoraxchirurgie und der Gesellschaft für Intensivmedizin die Begriffe Sepsis und SIRS anhand einfacher klinischer Parameter definiert (Bone et al., 1992):

Beim SIRS (systemic inflammatory response syndrome) müssen zwei oder mehr der folgenden Bedingungen erfüllt werden:

- Temperatur $> 38^{\circ}\text{C}$ oder $< 36^{\circ}\text{C}$
- Pulsfrequenz > 90 Schläge/min
- Atemfrequenz > 20 Atemzüge/min oder $\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg
- Leukocyten $> 12000/\text{mm}^3$ oder $< 4000/\text{mm}^3$

Zum Vorliegen einer Sepsis müssen ebenfalls mindestens zwei der oben genannten Bedingungen erfüllt sein; allerdings ist zusätzlich noch der Nachweis der Infektion zwingend erforderlich.

Im Rahmen der Sepsis / des SIRS führt die Invasion von Bakterien oder Toxinen zur Beeinträchtigung der Organfunktionen. Ein besonders von der Sepsis / SIRS betroffenes Organ ist neben Niere, Leber, Darm und Herz die Lunge. Es ist heute weitgehend akzeptiert, dass Sepsis/SIRS infolge der intensiven Stimulation körpereigener Abwehrmechanismen durch eindringende Mikroorganismen und insbesondere deren Produkte und Bestandteile entsteht. Eine Übersichtsarbeit hierzu findet sich bei Aird (2003). Buttenschoen et al. (2009) weisen auf die Bedeutung von Endotoxin und α -Hämolyysin von *Staphylococcus aureus* für die Entstehung und auch die Prognose von „acute respiratory distress syndrome“ (ARDS) und „acute lung injury“ (ALI) hin.

Da der gesamte kardiale Auswurf das Gefäßsystem der Lunge durchströmt, kommt es durch die Teilnahme an der systemischen inflammatorischen Kaskade zur massiven Schädigung der Lunge. Diese Lungenschädigung zeigt sich nicht zuletzt in der Entwicklung eines mit der Sepsis assoziierten ARDS. 25-42% der Patienten mit Sepsis entwickeln ein ARDS und somit ist die Sepsis eine der Hauptursachen für das ARDS. In Anbetracht der enormen Bedeutung des Krankheitsbildes ARDS ist die weitere Klärung der ätiologischen, pathologischen sowie therapeutischen Sachverhalte dringend notwendig.

3.2 Das Krankheitsbild „acute respiratory distress syndrome“

Der Begriff „acute respiratory distress syndrome“ (ARDS) beschreibt das Syndrom einer Lungenschädigung, die durch Dyspnoe, schwere Hypoxie, verringerte Compliance der Lunge und diffuse, bilateral-pulmonale Infiltrate charakterisiert ist. Vergleichbar mit den Schwierigkeiten bei der Sepsisdefinition haben auch seit der Erstbeschreibung im Jahre 1967 die Definitionen für das Krankheitsbild ARDS erheblich variiert.

Vor 1992 repräsentierte das Acronym ARDS das „adult respiratory distress syndrome“. Da ARDS jedoch in allen Alterstufen auftritt, wurde vom „The American-European Consensus Committee“ 1994 der Begriff „adult“ durch „acute“ ersetzt und eine einheitliche Definition geschaffen. Gleichzeitig wurde der Begriff „ALI“ eingeführt und definiert: Ein Syndrom bestehend aus Entzündung und gesteigerter Permeabilität, das mit klinischen, radiologischen und physiologischen Abweichungen einhergeht, die zwar nicht mit linksatrialer oder pulmonaler kapillärer Hypertension erklärt werden aber dennoch koexistieren können (Udobi et al., 2003). In Tabelle 1 werden die Kriterien für ARDS bzw. ALI aufgelistet. Hieraus ist ersichtlich, daß der Unterschied zwischen ARDS und ALI der Grad der Hypoxämie ist. Dieser Grad ist bestimmt durch das Verhältnis der arteriellen Sauerstoffspannung zur fraktioniert eingeatmeten Sauerstoffkonzentration.

Definitionskriterien für ALI und ARDS	
Kriterien für ALI	Kriterien für ARDS
akutes Auftreten	akutes Auftreten
Sauerstoffsättigung: arterieller Sauerstoffpartialdruck	
bilaterale pulmonale Infiltrate im Thoraxröntgenbild	bilaterale pulmonale Infiltrate im Thoraxröntgenbild
pulmonalarterieller Wedge-Druck < 18 mmHg oder kein klinisches Zeichen von linksatrialer Hypertension	pulmonalarterieller Wedge-Druck < 18 mmHg oder kein klinisches Zeichen von linksatrialer Hypertension

Tabelle 1: Definitionskriterien für „acute lung injury“ (ALI) und „acute respiratory distress syndrome“ (ARDS).

Zur Abgrenzung der Krankheitsbilder „ALI“ und „ARDS“ voneinander und weiteren ähnlichen Krankheiten wurden vom „American-European Consensus Committee“ im Jahre 1994 eindeutige Definitionskriterien festgelegt. Der Grad der Hypoxämie ist das entscheidende Unterscheidungsmerkmal.

Im Rahmen des ARDS durchläuft die geschädigte Lunge drei Phasen: In der exsudativen Phase entsteht durch die Schädigung des alveolären Epithels und/oder des vaskulären Endothels ein Einstrom von Flüssigkeit, Proteinen, Entzündungszellen und Erythrozyten in das Interstitium und den Alveolarraum. Diese Veränderungen werden durch das komplexe Zusammenspiel von proinflammatorischen und antiinflammatorischen Mediatoren induziert.

Alveolarzellen vom Typ I werden irreversibel geschädigt und gehen zugrunde. An ihrer Stelle sammeln sich Proteine, Fibrin und Zelltrümmer an, wodurch es zur Bildung hyaliner Membranen kommt. Die hierdurch verursachte Schädigung der Surfactant-produzierenden Alveolarzellen vom Typ II verursacht den „Kollaps“ der Alveolen. Die Permeabilitätssteigerung, das Lungenödem und die Proteinverlagerung verhindern die Rückführung der Ödemflüssigkeit in die Gefäße. Desweiteren erfährt die Lunge aufgrund der interstitiell eingelagerten Flüssigkeit eine massive Veränderung ihrer mechanischen Eigenschaften. Der vermehrte Flüssigkeitsgehalt in den Alveolen führt zu einer reflektorischen Hyperventilation mit Abfall des arteriellen pCO₂-Wertes. Die durch Mikrothromben verursachte Störung der Mikrozirkulation verursacht eine erhöhte Totraumventilation und die Ausbildung von Shunts. Als Konsequenz wird ein Großteil des Herzzeitvolumens nicht mehr am Gasaustausch beteiligt (Pugin et al., 1999; Orfanos et al., 2004; Ware, 2006).

In der Proliferationsphase kommt es unter Epithelzellregeneration, fibroblastischer Reaktion und „remodeling“ zu einer Proliferation der Typ II-Alveolarzellen. In einigen Fällen schreitet dieser Prozess fort, und es kommt zu einer irreversiblen Phase mit Kollagen-Ablagerungen im Alveolarraum und den Gefäßen, sowie im Interstitium einer Bildung von Microcysten. Durch die Fibrotisierung des Interstitiums kommt es zum Surfactantverlust mit Verminderung der Compliance und der funktionellen Residualkapazität (Bersten et al., 1998; Chen et al., 2003).

Das klinische Bild des ARDS stellt sich folgendermaßen dar: Initial zeigen die Patienten Tachypnoe und Dyspnoe, wobei die Auskultation des Thorax keine von der Norm abweichende Befunde liefert. Einige ältere Patienten können verwirrt erscheinen. Im weiteren Verlauf der Krankheit entwickeln die Patienten eine Tachykardie mit einer milden Zyanose und leichter Dyspnoe. Später kommt es dann zur akuten Atemnot mit diffusen, rasselnden Atemgeräuschen.

Der Abfall des alveolären Sauerstoffpartialdruckes führt im Rahmen des Von-Euler-Liljestrand-Mechanismus zur Kontraktion der präkapillären Pulmonalgefäße. Der Druckanstieg in den Alveolen führt zur Kompression von Gefäßen und steigert mechanisch den pulmonalen Gefäßwiderstand. Die Reizung oder Schädigung der Bronchialwand führt über einen Reflexbogen zu einer reflektorischen Bronchokonstriktion. Der erwähnte Reflexbogen verläuft von Rezeptoren unterhalb des Bronchialepithels zum zentralen Nervensystem und über vegetative efferente Nervenfasern zur glatten Bronchialmuskulatur (Munro, 2000; Contant et al., 2001).

Nach der initialen Schädigungsphase kommt es beim ARDS zur Entwicklung eines diffusen pulmonalen Zellschadens, eines interstitiellen und alveolären Ödems sowie einer ausgeprägten Entzündungsreaktion.

3.3 Inflammatorische Mediatoren im „acute respiratory distress syndrome“

Unabhängig vom auslösenden Agens des ARDS kommt der Aktivierung von Entzündungszellen sowie der Freisetzung von Mediatoren eine maßgebliche Rolle bei der Pathogenese des Lungenversagens zu. Im Rahmen des in dieser Arbeit untersuchten septischen Lungenversagens kommt der Aktivierung inflammatorischer Mediatoren durch Bakterientoxine große Bedeutung zu:

Endotoxine und deren Wirkung auf den Organismus

Endotoxine sind Lipopolysaccharide, die auf der äußersten Hülle Gram-negativer Bakterien lokalisiert sind. Ihre toxische Wirkung entfalten Lipopolysaccharide jedoch erst nach ihrer Freisetzung, wie beispielsweise beim Zerfall der Bakterien. Lipopolysaccharide bestehen aus drei verschiedenen Anteilen: die aus Oligosaccharideinheiten bestehende O-spezifische Seitenkette, welche die Hauptantigenkomponente darstellt, dem Kernpolysaccharid und dem Lipid A. Das Lipid A ist fest in der äußeren Membran der Bakterienwand verankert (Rietschel et al, 1991; 1993; 1994a; 1994b; Rietschel, 1992).

Der strukturell variabelste Teil der Lipopolysaccharide sind die O-spezifischen Seitenketten. Als Bestandteil der äußeren Bakterienwand wirken sie als Antigene, welche die Bildung von Antikörpern hervorrufen und somit eine spezifische Immunantwort auslösen. Da das Kernpolysaccharid weniger variabel ist, kommt ihm eine weitaus

geringere Bedeutung für die Immunantwort zu als den O-spezifischen Seitenketten. Über das Lipid A, das für die pathophysiologischen Effekte mit Aktivierung des Immunsystems verantwortlich ist, wird die eigentliche toxische Wirkung verursacht. Endotoxine verursachen pathophysiologische Veränderungen, die im Rahmen des septischen Schocks, bzw. Endotoxinschocks, zu Zirkulationsstörungen und Organveränderungen führen können. Entzündungszellen, wie Makrophagen, Monozyten, B-Lymphozyten, Granulozyten sowie Thrombozyten, Fibroblasten oder Endothelzellen werden von den Lipopolysacchariden aktiviert. Hierdurch kommt es zur Freisetzung verschiedener Mediatoren, wie den proinflammatorischen Zytokinen IL-1, IL-6 und TNF_{α} , den Lipiden wie Arachidonsäuremetaboliten (Eikosanoide) und plättchenaktivierender Faktor (PAF) sowie oxidativer Metabolite wie Stickstoffmonoxid (NO) (Olson et al., 1990 & 1995; Schletter et al.; 1995, Ndengele et al., 2005).

Im Rahmen einer lokalen Infektion mit Gram-negativen Keimen kommt es zu einer nur geringen Ausschüttung von Endotoxinen. Dieser Stimulus bewirkt eine lokal begrenzte Immunantwort, die zu einer unspezifischen und spezifischen Aktivierung des Immunsystems führt. Im Rahmen dieser Immunantwort kommt es zu einem leichten Temperaturanstieg, der Infektionsherd wird eingedämmt und der Erreger schließlich abgetötet.

Bleibt es allerdings nicht bei einer lokalen Eingrenzung der Infektion und kommt es durch Überwindung der natürlichen Endothelbarriere zu einem Eindringen Gram-negativer Erreger in die Blutbahn, so werden hierdurch auch massiv Endotoxine in die Blutbahn eingeschwemmt. Haupteintrittspforte solcher Keiminvasionen sind der Gastrointestinaltrakt, der Urogenitaltrakt sowie insbesondere die Lunge. Als Antwort auf den Erreger- und Endotoxineintritt in die Blutbahn kommt es zu einer überschießenden Immunantwort des Organismus mit massiver Produktion von inflammatorischen Mediatoren durch Entzündungszellen.

Das in großen Mengen freigesetzte $\text{IL-1}\alpha$ aktiviert die Phospholipase A2 und setzt aus der Arachidonsäure die Lipoxygenaseprodukte Leukotriene und Hydroxyperoxide sowie die Zyklooxygenaseprodukte Thromboxan und Prostaglandine frei. Als endogene Pyrogene verursachen $\text{IL-1}\beta$ und TNF_{α} Temperaturerhöhung und Schüttelfrost, da sie zu einer Sollwertverstellung der Körperkern-Temperatur auf Ebene des Hypothalamus

führen. Desweiteren kommt es durch IL-1 und TNF_{alpha} zur Aktivierung der Kinin-, Gerinnungs-, Komplement-, und Fibrinolysekaskade. (Ward, 1996; Furuichi et al. 2006; Sharma et al., 2007)

Die NO-Synthase im Gefäßendothel wird ebenso durch Zytokine stimuliert, woraus eine Vasodilatation resultiert. Metabolische Störungen, periphere Gefäßerweiterungen und erhöhte Kapillardurchlässigkeit durch Endothelschäden sowie disseminierte, intravasale Gerinnung mit Mikrozirkulationsstörungen und Mikrothrombosen sind die Folgen. Diese nicht mehr kontrollierte, überschießende Reaktion des Organismus führt zum oben beschriebenen Krankheitsbild der Sepsis.

Die isolierte Rattenlunge als Modell des ARDS

Die pathophysiologischen Veränderungen des ARDS können durch die Verabreichung von Endotoxinen im Experiment reproduziert werden. Als Versuchsmodell dienen sowohl anästhesierte als auch wache Versuchstiere. Je nach Fragestellung wird mit Ratten, Schweinen oder Schafen, aber auch Meerschweinchen und Hunden als Versuchstier gearbeitet (Simons et al., 1991; Ullrich et al., 2001; Davidson et al., 2002; Hanaoka et al., 2002).

Eine weitere, anerkannte Methode zur Erforschung der biochemischen und pathophysiologischen Effekte des ARDS ist das Modell der isolierten Tierlunge. Hierbei können Wechselwirkungen mit anderen Organen und deren Produkten ausgeschlossen werden (Moxley et al., 1977; Glauser et al., 1978; Fisher et al., 1979; Wolf und Seeger, 1982). Das Modell der isolierten, blutfrei perfundierten und ventilierten Lunge des Kaninchens ist ein seit mehreren Jahren in der Arbeitsgruppe Seeger und Mitarbeiter etabliertes und bewährtes Modell (Seeger et al., 1984, 1985, 1987, 1994). Seit 1995 wird in dieser Arbeitsgruppe das von Ermert etablierte Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Rattenlunge eingesetzt (Ermert et al., 1998, 2000, 2002). Das Modell der isoliert perfundierten Lunge erlaubt Untersuchungen am gesamten Organ unter Miteinbeziehung der unterschiedlichen, in der Lunge vorkommenden Zellen. Wichtige physiologische Parameter wie der pulmonalarterielle Druck (PAP), der Beatmungsdruck (VP) oder das Gewicht lassen sich mit geeigneten Messinstrumenten kontinuierlich aufzeichnen. Desweiteren können durch die Analyse des Perfusats metabolische und biochemische Veränderungen gemessen werden (Seeger et al., 1994). Das Modell der isoliert perfundierten Tierlunge kann nicht exakt die gleichen physiologischen

Bedingungen wie *in vivo* simulieren und es kann keine eindeutige Zuordnung der gemessenen physiologischen und biochemischen Veränderungen zu den einzelnen Zelltypen des isolierten Organs erfolgen.

„priming“ durch Endotoxine

Die Zugabe von Arachidonsäure (AA) in das Perfusat von über zwei Stunden isoliert perfundierten Rattenlungen führte zu einer geringen Reaktion des isolierten Organs über vaso- und bronchoreaktive Arachidonsäuremetaboliten, was sich in einem kurzzeitigen, leichten Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks manifestierte. Die weiteren kontinuierlich gemessenen Parameter wie linksventrikulärer Druck (LVP), Beatmungsdruck (VP) und Gewicht (W) wiesen nach der Zugabe der Arachidonsäure keine oder nur sehr geringe Veränderungen auf. Die alleinige Zugabe von Endotoxinen Gram-negativer Bakterien (LPS) in der verwendeten Dosierung von 10 µg/ml in das Perfusat isoliert perfundierter Rattenlungen führte nicht zu einer Veränderung der kontinuierlich gemessenen Parameter (PAP, LVP, VP, W) (Seeger et al., 1994; Ermert et al., 1998, 2000, 2002).

Durch die Gabe von Arachidonsäure nach vorangegangener, zweistündiger Inkubation der isolierten Rattenlunge mit LPS kam es allerdings eindrucksvoll zu einer vielfach erhöhten Reaktion der Lunge mit erhöhter Vaso- und Bronchoreaktivität sowie Perfusions-Ventilationsverteilungsstörungen. Diese erhöhte Reaktivität der isoliert perfundierten Lunge nach Vorstimulation mit beispielsweise bakteriellen Endotoxinen wird als „priming“-Effekt bezeichnet. Walmrath et al. (1994) beschrieben, daß neben der Arachidonsäure auch die Zugabe anderer sekundärer Stimuli, wie bakterielle Exotoxine oder platelet-activating-factor diese Reaktion verursacht. Die Arbeit von Schütte et al. (1997) zeigte, daß die gleichzeitige Gabe von LPS und eines sekundären Stimulus keine erhöhte Reaktion auslöste. Zum Erreichen des beschriebenen Effekts mußte die Lunge einige Zeit vor Zugabe des sekundären Stimulus mit LPS inkubiert werden. In dieser Arbeit wurde Hämolyisin A, ein bakterielles Exotoxin, als sekundärer Stimulus verwendet. Schütte führte die beobachtete, erhöhte Permeabilität der Lungengefäße auf die durch LPS stark erhöhte Aktivität von an der Gefäßwand anhaftenden, neutrophilen Granulozyten und die synergistische Wirkung von Hämolyisin A und LPS auf die Lungenendothelzellen zurück. Diese Mechanismen wurden in zahlreichen Arbeiten, unter anderem von Watkins et al. (1997) und Ermert et al. (2000b, 2000c, 2002), untersucht und beschrieben.

Diese Vorstimulation der Lunge durch LPS mit nachfolgend erhöhter Reaktivität auf einen zweiten Stimulus wird als „priming-Effekt“ bezeichnet. Dieser erhöhten Reaktivität liegt eine gesteigerte Expression verschiedener Enzymsysteme wie Lipoxygenaseenzyme, Zyklooxygenaseenzyme oder NO-Synthasen zugrunde. Steudel et al. (1997) beschrieben in ihrer Arbeit den durch Inkubation mit Lipopolysacchariden verursachten Anstieg der Zyklooxygenaseaktivität. Arachidonsäure steht als zentrales Substrat der Zyklooxygenase in großer Menge zur Verfügung. Die Zugabe von AA in das System des isoliert perfundierten Organs bewirkt zusätzlich eine weitere endogene Freisetzung von AA.

Wie von Tobias et al. (1995) dargestellt, sind das Akute-Phase-Protein (Plasmaprotein) LBP sowie der Membranrezeptor CD14 von wesentlicher Bedeutung für die von Lipopolysacchariden auf den Organismus vermittelten Effekte. CD14 ist ein 55 kDa großes, Glycophosphatidylinositol-verankertes Membranprotein und besitzt eine Erkennungsstruktur für den Komplex aus LPS und LBP. LBP ist ein 58 kDa großes Serum-Glycoprotein, welches überwiegend in den Hepatozyten synthetisiert wird. CD14-Rezeptoren finden sich bevorzugt an den Membranen von Monozyten, Makrophagen sowie Granulozyten (Kato et al., 2004; Ohnishi et al., 2007; Erridge et al., 2008). Immunhistochemische Untersuchungen der Rattenlunge belegten, daß ebenso Bronchialepithelzellen, Alveolar-Makrophagen, perivaskuläre Leukozyten sowie einzelne Zellen in den Alveolarsepten und glatte Gefäßmuskelzellen kleinerer Gefäße CD14-Rezeptoren exprimieren. In Epithelzellen der kleinen Bronchiolen, glatten Muskelzellen der Bronchien, Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen der Arterien konnten Ermert et al. (2000b) im Gegensatz dazu allerdings keine Expression von CD14-Rezeptoren nachweisen. Desweiteren existieren den Arbeiten von Frey et al. (1992), Pugin et al. (1993) und Tobias et al. (1995) zufolge allerdings auch im Plasma gelöste CD14-Rezeptoren, die nicht an eine Membran gebunden sind und einen Komplex mit LPS und LBP bilden. Diese löslichen CD14-Rezeptoren werden von Zellen, die keinen CD14-Rezeptor exprimieren, benötigt, um die LPS-Wirksamkeit zu vermitteln (Loppnow et al., 1995).

Neben den über den CD14-Rezeptor und das LBP vermittelten Effekten des LPS sind allerdings auch CD14-Rezeptor-unabhängige Signalübertragungen erwähnt. Weitere

Membranproteine, die LPS binden können sind beispielsweise der CD55-Rezeptor oder die β 2-Integrine CD11b/CD18 und CD11c/CD18.

Eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion spielten laut den Arbeiten von Wright et al. (1991a), Lynn et al. (1993), Cohen et al. (1995), Ingalls et al. (1995) und El Samalouti (1999) die Toll-like Rezeptoren, da der CD14-Rezeptor keine intrazelluläre Signaltransduktionsdomäne besitzt. Daher ist der CD14-Rezeptor lediglich ein Teil des LPS-Rezeptorkomplexes, der durch Toll-like Rezeptoren vervollständigt wird, um das Signal in das Zellinnere zu leiten. Die „Toll-like Rezeptoren“ (TLRs) der Säugetiere sind Homologe des Transmembranrezeptors Toll der Fruchtfliege *Drosophila*. Dieser Rezeptor kontrolliert bei *Drosophila* die dorsoventrale Achsenformation des Fruchtfliegenembryos (Hashimoto et al., 1988; Anderson, 2000) und spielt eine Rolle bei der Pilzabwehr adulter Fruchtfliegen (Meng et al., 1999, Rutschmann et al., 2000). Die TLRs der Säugetiere dienen der Erkennung von „pathogen associated molecular patterns“ (PAMPs); dies sind Strukturen, die auf oder in Krankheitserregern vorkommen (Rock et al., 1998). Die „Toll-like Rezeptoren“ beinhalten eine Familie von Typ I Transmembranrezeptoren, die durch eine extrazelluläre „leucine-rich repeat“-Domäne (LLR-Domäne) und eine intrazelluläre Domäne charakterisiert sind. Die intrazelluläre Domäne ist homolog zum menschlichen IL-1-Rezeptor und wird daher als TOLL/IL-1-Rezeptor-Domäne (TIR-Domäne) bezeichnet. (Hashimoto et al., 1988; Medzhitov et al., 1997; Rock et al., 1998). Bis heute wurden für Säugetiere 13 verschiedene Rezeptoren entdeckt, die zur TLR-Gruppe zählen (Beutler, 2004; Tabeta et al., 2004). Der „Toll-like Rezeptor 4“ (TLR4) interagiert direkt mit LPS und vermittelt die intrazelluläre Signaltransduktion. Wie von Togbe et al. (2007) dargestellt, war die TLR4 vermittelte Bronchokonstriktion und die akute inflammatorische Reaktion der Lunge nach LPS-Kontakt abhängig von der Expression von TLR4, CD14 und MD2. Entscheidend gesteuert wurde diese Signalübertragung durch die Adapterproteine „Toll/Interleukin-1 receptor (TIR)-domain-containing adaptor protein“ (TIRAP) und „myeloid differentiation factor 88“ (MyD88). Mäuse, denen die Proteine TIRAP und MyD88 fehlen, zeigten keinerlei Anzeichen einer Lungenschädigung nach Kontakt mit LPS (Nagai et al., 2003; Schnyder-Candrian, 2005; Zughaier et al., 2005; Jeyaseelan et al., 2005; Togbe et al., 2006; Piao et al., 2009).

Arachidonsäure und ihre Metaboliten

Die Arachidonsäure ist Bestandteil eines in der Plasmamembran vorkommenden Glycerophospholipids. Die Freisetzung der Arachidonsäure wird durch Hydrolyse über Phospholipase A₂ katalysiert. Die Substanzen, die aus dem Arachidonsäuremetabolismus entstehen, werden gemäß ihrer biochemischen Nomenklatur Eicosanoide genannt. Die ersten dieser Substanzen wurden im Sekret der Prostata gefunden und dementsprechend Prostaglandine genannt (von Euler, 1973). Zur Zeit sind zwei Synthesewege für die Hauptsubstanzgruppen bekannt: Der Zyklooxygenaseweg und der Lipoxygenaseweg. Die Produkte des Zyklooxygenaseweges fallen unter den Oberbegriff Prostanoiden.

Über den Lipoxygenaseweg wird zunächst die 5-Hydroperoxyeicosatetraensäure (5-HPETE) gebildet, die das Intermediärprodukt für die 5-Hydroeicosatetraensäure (5-HETE) und die Leukotriene A₄, B₄, C₄, D₄ sowie E₄ darstellt. Das Subskript der Lipoxygenaseprodukte kennzeichnet die Anzahl der Doppelbindungen in diesen Molekülen. Die Eicosanoide werden *in vivo* schnell abgebaut und entfalten folglich parakrin ihre größte Wirkung.

Die Produkte des Lipoxygenaseweges haben ein komplexes Aktionsmuster und wirken teils synergistisch, teils antagonistisch. Nach intraarterieller oder intravenöser Gabe von LTC₄ und LTD₄ wird nach einem initialen Blutdruckanstieg eine anhaltende Hypotension beobachtet (Drazen et al., 1980). Noonan et al. (1986, 1988) beschrieben, daß die Leukotriene, insbesondere das LTB₄ im Bereich des Kapillarbettes eine Plasmaexsudation hervorriefen. Darüber hinaus hatte LTB₄ eine chemotaktische Wirkung auf polymorphkernige Neutrophile mit nachfolgender Freisetzung weiterer Entzündungsmediatoren (Noonan et al., 1986; Ramos et al., 2005). Auf die Bronchialmuskulatur wirken die Leukotriene konstriktorisch. Während LTC₄ und LTD₄ eine direkte Wirkung auf die glatten Muskelzellen des Tracheobronchialsystems haben, steht dieser Effekt beim LTD₄ in Zusammenhang mit der Synthese von Thromboxan A₂ (Noonan et al., 1986). LTC₄ und LTD₄ besitzen eine vergleichbare biologische Aktivität, wohingegen LTE₄ in den meisten biologischen Systemen weniger aktiv ist. Aufgrund der potenten gefäßkonstringierenden Wirkung können Leukotriene eine kardiale Ischämie hervorrufen (Roth et al., 1985). Die Lipoxygenaseprodukte werden in zahlreichen Zelltypen produziert. Zahlreiche Autoren (Samuelsson et al., 1980, 1987; Bertram et al., 1988; Amrani et al., 2003; Holgate et al., 2003; Parameswaran et al., 2007) beschrieben

das Auftreten der Lipoxygenaseprodukte in Parenchymzellen der Lunge, Makrophagen, Mastzellen, Leukozyten sowie glatten Muskelzellen. In der Regel ist ein Antigen oder eine proinflammatorische Substanz (z.B. PAF) zur Bildung signifikanter Mengen von Leukotrienen notwendig.

Erhöhte Konzentrationen der Lipoxygenaseprodukte inklusive 5-HETE wurden von Ogletree et al. (1981), Olson (1990, 1990) und Maniatis et al. (2008) im Rahmen des endotoxininduzierten ARDS nachgewiesen.

Ziele der Arbeit

Sepsis ist die Hauptursache für das endotoxininduzierte ARDS. Infolge der intensiven Stimulation körpereigener Abwehrmechanismen durch eindringende Mikroorganismen und insbesondere durch deren Produkte und Bestandteile kommt es zur Beeinträchtigung von Organfunktionen. Da das Gefäßsystem der Lunge vom gesamten kardialen Auswurf durchströmt wird, ist die Lunge ganz besonders von der systemischen inflammatorischen Kaskade betroffen. In Anbetracht der enormen Bedeutung des Krankheitsbildes ARDS ist die weitere Aufklärung der Signaltransduktion beim durch Gram-negative Erreger verursachten Lungenversagen wichtig für ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Veränderungen und zur Entwicklung neuer therapeutischer Interventionsmöglichkeiten.

Im Rahmen dieser Arbeit am etablierten Modell der isoliert perfundierten Rattenlunge sollten insbesondere folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Sind die Produkte des Lipoxygenaseweges (Leukotriene) an der intrazellulären Signaltransduktion beim Gram-negativen „priming“ durch Lipopolysaccharid beteiligt?
2. Welche Rolle spielen die Isoenzyme der Lipoxygenase beim Gram-negativen „priming“?
3. Welche Wechselwirkungen finden zwischen dem Lipoxygenaseweg und dem Zyklooxygenaseweg im Rahmen des Gram-negativen „priming“ statt?
4. Spielen im Plasma gelöste Faktoren eine Rolle beim Gram-positiven „priming“ durch Peptidoglykan G und Lipoteichonsäure?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden isoliert ventilierte und blutfrei perfundierte Rattenlungen mittels Bestandteilen der Bakterienwand Gram-negativer Bakterien stimuliert. Sodann wurden bei den stimulierten Rattenlungen die Isoenzyme der Lipoxygenase sowie das 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) und der Cys LT₁-Rezeptor/ Cys LT₂-Rezeptor durch spezifische Inhibitoren gehemmt. Die Reaktion der isolierten Rattenlunge auf die Stimulation und die Inhibitoren wurde durch kontinuierliche Messung des pulmonalarteriellen Drucks, des Beatmungsdrucks und des Lungengewichts aufgezeichnet. Das Perfusat wurde mittels ELISA-Technik untersucht und die Konzentrationen der Arachidonsäuremetaboliten Thromboxan (TXB₂), Prostaglandin E₂, 6-keto-Prostaglandin F_{1α}, Leukotrien C₄ und Leukotrien E₄ gemessen. Die ermittelten Messwerte wurden statistisch ausgewertet.

4 Material und Methodik

4.1 Material

4.1.1 Tiere

Als Versuchstiere wurden männliche CD-Ratten (Sprague Dawley) mit einem Körpergewicht von 350-400 g verwendet. Die Tiere wurden von Charles River (D-Sulzfeld) bezogen. Die durchgeführten Versuche wurden als anzeigepflichtige Experimente beim Regierungspräsidium Gießen angezeigt und von diesem genehmigt. Die Haltung sowie alle experimentellen Verfahren wurden in Übereinstimmung mit dem Deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Die Haltung der Ratten erfolgte auf Labortiereinstreu aus Hobelspänen in Hoch-Temperatur-Polysulfon-Käfigen mit einer Grundfläche von 1500 cm². Es wurden jeweils maximal 5 Tiere in einem Käfig gehalten. Leitungswasser und Nagetierfutter standen *ad libitum* zur Verfügung. Die Raumtemperatur des Versuchstierstalls betrug 22 - 24 °C, die Luftfeuchtigkeit 55 - 60 %. Die Hell-Dunkel-Periode lag bei jeweils zwölf Stunden.

4.1.2 Pharmaka

Pentobarbital (Narcoren[®]) wurde in einer Dosierung von 107 mg/kg KGW verwendet, um die Versuchstiere zu narkotisieren. Die Applikation erfolgte intraperitoneal. Mit 1,5 ml Lidocain (Xylocain[®] 2%) subcutan erfolgte die Lokalanästhesie im prätrachealen Bereich. Zur Koagulationsprophylaxe wurde Heparin (Liquemin[®]) in einer Dosierung von 2700 I.E./kg KGW intravenös injiziert. Zur Desinfektion des Präparationsfeldes wurde eine Jod-PVP-Lösung (Braunol[®]) verwendet. Als Perfusionslösung für die isoliert perfundierte Rattenlunge wurde eine Krebs-Henseleit-Pufferlösung (Elektrolytlösung I/3; Serag-Wiessner, D-Naila) verwendet mit der folgenden Zusammensetzung: NaCl (125 mM), Glucose (13,32 mM), KCl (4,3 mM), CaCl₂*2H₂O (2,4 mM), MgCl₂*6H₂O (1,3 mM), KH₂PO₄ (1,1 mM). Die verwendete Pufferlösung wurde steril und pyrogenfrei geliefert.

4.1.3 Lipopolysaccharid

Zur Auslösung des Gram-negativen „priming“ wurde ein Lipopolysaccharid (LPS, Cytogen, D-Bodenheim) von *Salmonella abortus equi* (S-Form) verwendet. Das

Bakterientoxin wurde in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und in allen Versuchen mit Gram-negativem „priming“ in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt.

4.1.4 Lipoteichonsäure und Peptidoglykan

Für die Versuchsreihen mit Gram-positivem „priming“ wurde Lipoteichonsäure (LTA) von *Staphylococcus aureus* (Sigma, D-Deisenhofen) und Peptidoglykan (PepG) von *Staphylococcus aureus* (Fluka, CH-Buchs) verwendet. Zum Einsatz kamen Konzentrationen von 20 µg/ml LTA und 20 µg/ml PepG. Die Lösung der Lipoteichonsäure (LTA) und des Peptidoglykans (PepG) erfolgte in *Aqua ad injectabilia*. Das Lösungsmittel wurde vom Hersteller auf Pyrogenfreiheit getestet.

4.1.5 Inhibitoren der Lipoxygenase

4.1.5.1 CDC

CDC (Cinnamyl-3,4-Dihydroxy- α -Cyanocinnamat) ist ein Inhibitor der 12-, 15- und der 5-Lipoxygenase. CDC wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und in Konzentrationen von 1 µM/L, 5 µM/L und 20 µM/L verwendet.

In geringer Dosierung ist CDC ein selektiver Hemmstoff der 12-Lipoxygenase (Cho et al., 1991). Die bei den hier vorgestellten Untersuchungen verwendeten Konzentrationen wurden jedoch so gewählt, das alle Isoenzyme der Lipoxygenase gehemmt wurden. CDC wurde von Oxford Biomedical Research (USA-Oxford, Michigan) bezogen.

In vorhergehenden Untersuchungen wurde festgestellt, daß die alleinige Zugabe des Lösungsmittels DMSO keinen Einfluß auf den pulmonalarteriellen Druck, den Beatmungsdruck und das Gewicht hat.

4.1.5.2 Gossypol

Gossypol hemmt selektiv die 12-Lipoxygenase und die 15-Lipoxygenase. Die Lösung erfolgte in Ethanol und es wurden Konzentrationen von 0,5 µM/L und 1 µM/L eingesetzt. Gossypol wurde von Oxford Biomedical Research (USA-Oxford, Michigan) bezogen.

Das Lösungsmittel Ethanol wurde auf seine Wirkung auf pulmonalarteriellen Druck, Beatmungsdruck und Gewicht untersucht. Hierbei ergab sich, daß die alleinige Zugabe von Ethanol in das Perfusat die gemessenen Parameter nicht beeinflusste.

4.1.5.3 Kaffeesäure

Kaffeesäure (3-4-Dihydroxycinnamat) ist ein selektiver Inhibitor der 5-Lipoxygenase. Sie wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und in Konzentrationen von 1 µM/L, 10 µM/L und 20 µM/L verwendet. Kaffeesäure wurde von Oxford Biomedical Research (USA-Oxford, Michigan) bezogen.

4.1.5.4 Baicalein

Baicalein (5,6,7-Trihydroxyflavon) ist ein selektiver Hemmstoff der 12-Lipoxygenase. Gelöst wurde Baicalein in Dimethylsulfoxid (DMSO) und fand in einer Konzentration von 5 µM/L Anwendung. Baicalein wurde von Oxford Biomedical Research (USA-Oxford, Michigan) bezogen.

4.1.5.5 MK-886

MK-886 (L-663,536) ist ein selektiver Inhibitor des 5-Lipoxygenase aktivierenden Proteins (FLAP) und unterbindet so die Aktivierung der 5-Lipoxygenase. Die Lösung erfolgte in Dimethylsulfoxid (DMSO) und es wurde eine Konzentration von 5 µM/L verwendet. MK-886 wurde von Biomol (USA-Plymouth Meeting, Pennsylvania) bezogen.

4.1.5.6 L-655,238

L-655,238 (REV-5901 para isomer / α -Pentyl-3-(2-Quinolinylmethoxy)-Benzomethanol) hemmt ebenfalls das 5-Lipoxygenase aktivierende Protein (FLAP). Gelöst wurde L-655,238 in Dimethylsulfoxid (DMSO) und es wurde in einer Konzentration von 30 µM/L eingesetzt. L-655,238 wurde von Biomol (USA-Plymouth Meeting, Pennsylvania) bezogen.

4.1.5.7 Bay-u9773

Bay-u9773 ist ein Antagonist der Leukotrien-Rezeptoren Cys LT₁ und Cys LT₂. Die Lösung erfolgte in Dimethylsulfoxid (DMSO) und Bay-u9773 kam in einer Konzentration von 1 µM/L zur Anwendung. Bay-u9773 wurde von Biomol (USA-Plymouth Meeting, Pennsylvania) bezogen.

Tabelle 2 enthält eine Übersicht über die verwendeten Inhibitoren, sowie deren Zielenzyme.

Inhibitor	5-LOX	12-LOX	15-LOX	FLAP	Cys LT ₁ /LT ₂
CDC	X	X	X		
Gossypol		X	X		
Kaffeensäure	X				
Baicalein		X			
L-655,238				X	
MK-886				X	
Bay-u9773					X

Tabelle 2: Verwendete Inhibitoren und deren Zielenzyme beziehungsweise Rezeptorproteine.

Im Rahmen der durchgeführten Hemmstoffversuche wurden verschiedene Hemmstoffe der Lipoxygenase eingesetzt. Einige davon hemmen alle drei Isoenzyme der Lipoxygenase, andere wiederum sind spezifische Hemmstoffe für nur ein Isoenzym. Desweiteren wurden auch Inhibitoren verwendet, deren Zielstruktur das FLAP oder Leukotrienrezeptoren (Cys LT₁/LT₂) sind.

4.1.6 Arachidonsäure

Arachidonsäure (AA) ist das zentrale Molekül in der Biosynthese der Eicosanoide mit deren weitreichenden physiologischen und pathologischen Effekten. Aus der Arachidonsäure entstehen vor allem die Prostazykline, Prostaglandine, Thromboxane und die Leukotriene. Die Synthese der Leukotriene wird von den Lipoxygenase-Isoenzymen katalysiert, wobei als Zwischenprodukt die Hydroxyperoxyeicosatetraensäure (HpETE) entsteht, die dann durch verschiedene Enzyme weiter zu den aktiven Mediatoren metabolisiert wird. Die verwendete Arachidonsäure wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und in allen Versuchen in

einer Konzentration von 10 $\mu\text{M/L}$ verwendet. Arachidonsäure wurde als freie Säure bezogen von Sigma, D-Deisenhofen.

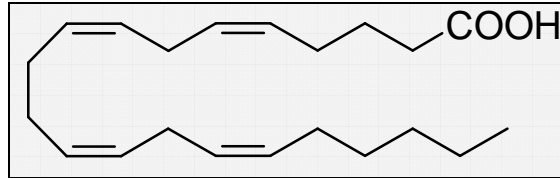


Abbildung 1: Strukturformel der Arachidonsäure.

Die Arachidonsäure ist das zentrale Molekül in der Biosynthese der Leukotriene. Die Entstehung der Leukotriene wird von den Lipoxygenase-Isoenzymen katalysiert.

4.1.7 ELISA

4.1.7.1 Bestimmung von Prostaglandin E_2 , 6-keto-Prostaglandin $F_{1\alpha}$ und Thromboxan B_2

Die Metaboliten des Zyklooxygenaseweges wurden jeweils mit „enzyme-linked immunosorbent assays“ (ELISA) auf Grundlage der kompetitiven Bindungstechnik bestimmt.

Hierbei konkurrierten die jeweils zu messenden Metaboliten des Zyklooxygenaseweges (PGE_2 , 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$, TXB_2) mit einer definierten Menge von mit Alkalischer Phosphatase markierten PGE_2 , 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ und TXB_2 (AP- PGE_2 , AP-6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$, AP- TXB_2) um Bindungsstellen an einem spezifischen Antikörper. Während der Inkubationszeit band dieser spezifische Antikörper an einen Anti-Antikörper, der an die Mikroplatte gebunden ist. Nach der Inkubation wurde in mehreren Waschvorgängen überschüssiges Konjugat und ungebundene Probe entfernt. Daraufhin wurde in die einzelnen Vertiefungen der Mikroplatte p-Nitrophenylphosphat (pNPP) in gepufferter Lösung pipettiert, um die Aktivität der gebundenen Enzyme (mit Alkalischer Phosphatase markiertes PGE_2 , 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$, TXB_2) zu bestimmen. p-Nitrophenylphosphat (pNPP) diente als chromogenes Substrat und wurde von der alkalischen Phosphatase durch Abspaltung eines Phosphatrestes vom farblosen Nitrophenylphosphat in gelbes p-Nitrophenol umgewandelt. Hierbei kam es zu einem Farbumschlag der initial farblosen Substratlösung, wobei die Farbintensität umgekehrt proportional zum Gehalt von PGE_2 , 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ und TXB_2 in der jeweiligen Probe war. Nach einer weiteren Inkubationsphase wurde die Farbentwicklung durch Zugabe von Trinatrium-Phosphat (TSP) abgestoppt und

mit einem Photometer die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Mittels einer Standardkurve wurde der Gehalt an PGE₂, 6-keto-PGF_{1α} und TXB₂ ermittelt. Die „enzyme-linked immunosorbent assays“ (ELISA) zur Bestimmung von PGE₂, 6-keto-PGF_{1α} und TXB₂ wurden von R&D Systems, D-Wiesbaden bezogen. Die Probenvorbereitung und die Messungen wurden nach der Versuchsanleitung des Herstellers durchgeführt.

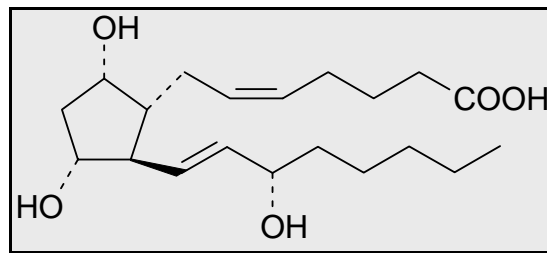


Abbildung 2: Strukturformel von 6-keto-PGF_{1α}.

Das 6-keto-Prostaglandin F_{1α} wird über den Zycklooxygenaseweg aus Prostaglandin H₂ gebildet und steuert zahlreiche physiologische und pathologische Funktionen in seinen Zielorganen .

4.1.7.2 Bestimmung von Leukotrien C₄ und Leukotrien E₄

Die Eicosanoide Leukotrien C₄ und Leukotrien E₄ wurden ebenfalls mit „enzyme-linked immunosorbent assays“ (ELISA) auf Grundlage der kompetitiven Bindungstechnik bestimmt.

Hierbei konkurrierten die jeweils zu messenden Leukotriene (LTC₄/LTE₄) mit einer definierten Menge von mit Acetylcholinesterase markierten Leukotrienen (AChE-LTC₄/AChE-LTE₄) um eine begrenzte Anzahl von Leukotrien-spezifischen Antikörpern. Da die Menge der markierten Leukotriene (AChE-LTC₄/AChE-LTE₄) stets konstant blieb, die Konzentration der zu bestimmenden Leukotriene (LTC₄/LTE₄) aber von Probe zu Probe variierte, war die Menge der an den Leukotrien-spezifischen Antikörper gebundenen markierten Leukotriene (AChE-LTC₄/AChE-LTE₄) umgekehrt proportional zur Konzentration der zu bestimmenden Leukotriene (LTC₄/LTE₄).

Die entstandenen Antikörper-Leukotrien-Komplexe banden während der Inkubationszeit an einen auf der Mikroplatte befindlichen Anti-Antikörper. Nun folgten mehrere Waschvorgänge, um ungebundene Reagenten von der Mikroplatte zu entfernen. Danach wurde Ellman's Reagenz, in die einzelnen Vertiefungen der Mikroplatte pipettiert. Ellmann's Reagenz enthielt Acetylthiocholin und 5,5'-dithio-bis-(2-Nitrobenzolsäure).

Aus Acetylthiocholin entstand Thiocholin durch hydrolytische Spaltung mittels Acetylcholinesterase.

Thiocholin reagierte mit 5,5'-dithio-bis-(2-Nitrobenzolsäure) zu 5-thio-2-Nitrobenzolsäure, die eine spezifische gelbe Farbe aufwies. Deren Absorption wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Die gemessene Farbintensität war umgekehrt proportional zur Menge der in der zu messenden Probe enthaltenen Leukotriene (LTC₄/LTE₄). Die „enzyme-linked immunosorbent assays“ (ELISA) zur Bestimmung von Leukotrien C₄ und Leukotrien E₄ wurden von Cayman Chemical Company, USA-Ann Arbor, MI bezogen. Die Probenvorbereitung und die Messungen wurden nach der Versuchsanleitung des Herstellers durchgeführt.

4.2 Methodik

4.2.1 Schlauchsystem für die Lungenperfusion

Zur Vorbereitung des Versuchsaufbaus wurde das gesamte Schlauchsystem unter sterilen Bedingungen aufgebaut und zu Beginn mit zwei Liter *Aqua ad injectabilia* gespült; dabei wurde die Temperatur auf 4° Celsius eingestellt. Durch Abklopfen der Schläuche in Flußrichtung wurde sichergestellt, daß sich keine Luftblasen im System befanden. *Aqua ad injectabilia* wurde über das doppelwandige Perfusatgefäß entfernt und sodann das System mit einem Liter Elektrolytlösung I/3 (Serag-Wiessner, D-Naila) unter Zugabe von 84 ml 8,4 % Natriumhydrogencarbonatlösung (Serag-Wiessner, D-Naila) gefüllt und gespült. Vor Versuchsbeginn wurde überschüssiges Perfusat verworfen, so daß die vorgegebene Menge von 100 ml im Schlauchsystem zirkulierte.

Die Perfusion der isolierten Rattenlunge wurde mit einem aus zwei voneinander getrennten Kreisläufen bestehenden Schlauchsystem durchgeführt. Ein Kreislauf wurde zur Temperierung des Schlauchsystems genutzt. Ausgehend von der Thermomix-Frigomix-Kombination (B.Braun, D-Melsungen) durchströmte die zur Temperierung genutzte Flüssigkeit hintereinander die äußere Kammer der beiden doppelwandigen Perfusatresevoir, des Minikühlers sowie der Organkammer (alle drei: Glasbläserei der Justus-Liebig-Universität, D-Gießen), um dann wieder in die Thermomix-Frigomix-Kombination zu gelangen.

Der andere Kreislauf wurde für die Zirkulation des Perfusats genutzt (Abb. 3). Ausgehend von der inneren Kammer der beiden, eine kontinuierliche Perfusion auch beim

Perfusatwechsel gewährleistenden, doppelwandigen Perfusatreservoir wurde das Perfusat durch die in das Schlauchsystem integrierte Pumpe (Cole Parmer Instrument Co., USA-Chicago) zur Lunge befördert. Unmittelbar vor Eintritt in die isolierte Lunge durchströmte das Perfusat den Minikühler sowie eine Blasenfalle, um eventuell vorhandene Luftblasen abzufangen, und damit eine Embolisierung des isolierten Organs zu verhindern. Der Zufluß des Perfusats in die isolierte Lunge erfolgte über den an das Schlauchsystem angeschlossenen Pulmonalkatheter (Hugo Sachs Elektronik, D-March-Hugstetten); der Abfluß wurde durch den an das Schlauchsystem angeschlossenen Katheter (Hugo Sachs Elektronik, D-March-Hugstetten) in der linken Herzkammer gewährleistet. Analog zu den Verhältnissen im lebenden Tier konnte also auch das Schlauchsystem zur Organperfusion in einen arteriellen und einen venösen Schenkel unterschieden werden.

Nach Durchströmung des isolierten Organs konnte das Perfusat entweder verworfen werden oder es gelangte im Zirkulationsmodus zurück in das doppelwandige Perfusatreservoir. Im Zirkulationsmodus befanden sich 100 ml Perfusat im Perfusionssystem, davon 30 ml im eigentlichen Schlauchsystem und 70 ml in den Doppelwandgefäßen (Abb. 3).

Zur Messung und kontinuierlichen Aufzeichnung des pulmonalarteriellen und linksventrikulären Druckes wurden blasenfrei mit Perfusatflüssigkeit gefüllte Schläuche in das Schlauchsystem integriert. Diese Innenkatheter verliefen innerhalb des zur Perfusion genutzten Schlauchsystems und endeten im arteriellen Schenkel unmittelbar vor dem Pulmonalkatheter. Im venösen Schenkel endete der Innenkatheter unmittelbar vor dem linksventrikulären Katheter. Beide Innenkatheter waren jeweils an einen Druckaufnehmer (B.Braun, D-Melsungen) angeschlossen und ermöglichten so nach Verstärkung mit einem Brückenverstärker (Fa. WPI, Harry Fein, D-Berlin) eine kontinuierliche Registrierung der Meßwerte. Die verwendeten Schlauchsysteme wurden mit Formaldehyd gassterilisiert und die Doppelwandgefäße wurden hitzesterilisiert. Initial war das zirkulierende Perfusat also frei von Endo- oder Exotoxinen.

Die Beatmung des isolierten Organs erfolgte über die in der Trachea fixierte Trachealkanüle (Hugo Sachs Elektronik, D-March-Hugstetten), die mit einem Beatmungsschlauch mit dem Beatmungsgerät (Hugo Sachs Elektronik, D-March-Hugstetten) verbunden war. In den Beatmungsschlauch war ebenfalls ein Innenkatheter

integriert, der unmittelbar vor der Trachealkanüle endete und mittels eines Druckaufnehmers die kontinuierliche Messung und Aufzeichnung des Beatmungsdruckes ermöglichte. Desweiteren war der Beatmungsschlauch an die CO₂-Quelle (Messer Griesheim, D-Siegen) angeschlossen, wodurch die geregelte und kontinuierliche Beimischung von Kohlendioxid zur Beatmungsluft ermöglicht wurde (Abb. 3).

4.2.2 Die isoliert perfundierte Rattenlunge

Die Ratten wurden zunächst durch intraperitoneale Applikation von Pentobarbital (Narcoren[®], 107mg/kg KGW) narkotisiert und nach Eintritt der Narkose in Rückenlage zur Präparation fixiert. Das Präparationsfeld wurde mit Jod-PVP-Lösung (Braunol[®]) desinfiziert und daraufhin 1,5 ml Lidocain (Xylocain[®] 2%) zur Infiltrationsanästhesie im prätrachealen Bereich subkutan injiziert.

Die Haut sowie die prätracheale Quaddel wurden sodann entfernt und die *ventrale* Halsmuskulatur nach vorsichtiger Präparation der *Thyroidea* freigelegt. Nach Durchtrennung der Muskelschichten wurde die *Trachea* dargestellt und mittels Incision zwischen zwei Trachealspangen eröffnet. Sogleich wurde die Trachealkanüle eingeführt und mit einem Faden fixiert. Die eingeführte Kanüle wurde sofort über ein Schlauchsystem mit dem Beatmungsgerät verbunden.

Sodann wurde durch Entfernung der Haut die Bauchmuskulatur dargestellt, und die Bauchhöhle mittels Scherenschlag unterhalb des *Xyphoids* eröffnet. Daraufhin wurde nach Anbringung seitlicher Entlastungsschnitte entlang des Rippenbogens die Bauchdecke entlang der Medianen bis vor die kraniale Beckenapertur durchtrennt und aufgeklappt.

Zur Koagulationsprophylaxe erfolgte die Injektion von Heparin (Liquemin[®], 2700 I.E./kg KGW) in die *Vena renalis sinistra*. Nun wurde die Pleurahöhle durch Incision des *Diaphragmas* unterhalb des *Xyphoids* eröffnet und das Zwerchfell vorsichtig entlang der Thoraxwand abpräpariert. Unmittelbar nach Eröffnung der Pleurahöhle erfolgte die Beatmung der Lunge mit einem positiven endexpiratorischen Druck (PEEP) von 3 cm Wassersäule. Die Beatmungsluft bestand aus mit CO₂ angereicherter Raumluft (4 % CO₂, 17 % O₂, 79 % N₂). Unter Schonung der Lunge und der parasternal verlaufenden Gefäße wurde midsternal thorakotomiert und sodann der eröffnete *Thorax* unter Zuhilfenahme von zwei Klemmen zu beiden Seiten gespreizt.

Daraufhin erfolgte die Entfernung des *Perikards*, noch vorhandener Pleuraanteile sowie des Thymus. Zur weiteren Präparation wurde das Herz mithilfe einer Klemme an der

Herzspitze fixiert und der Abgang der *Arteria pulmonalis* aus der rechten Herzkammer dargestellt. Um die Gefäßstämme der *Arteria pulmonalis* und der *Aorta ascendens* wurde eine Ligatur gelegt und sodann die rechte Herzkammer im oberen Anteil eröffnet. Unmittelbar danach wurde der an das Schlauchsystem angeschlossene Pulmonalkatheter in die *Arteria pulmonalis* eingeführt und mittels der zuvor angebrachten Ligatur fixiert. Sofort nach der Fixation des Katheters in der Lungenarterie wurden beide Herzkammern durch die Abtrennung der Herzspitze eröffnet, um eine Stauung im pulmonalen Stromgebiet zu vermeiden. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die pulsatile Perfusion der Lunge mit einer Flussgeschwindigkeit von 4 ml/min.

Dann wurde die beatmete und perfundierte Lunge aus dem *Thorax* herauspräpariert und an der Wägezelle (Hottinger Baldwin Messtechnik, D-Darmstadt) aufgehängt. Danach wurde über die eröffnete Herzspitze ein weiterer Katheter in die linke Herzkammer eingeführt und mittels einer Ligatur so fixiert, daß seine Spitze gerade im linken *Atrium* lag. Als nächstes wurde nun der linksventrikuläre Katheter blasenfrei mit dem venösen Schenkel des Schlauchsystems verbunden. Nun konnte das Perfusat im Schlauchsystem zirkulieren und die im System befindliche isolierte Rattenlunge durchströmen.

Sodann wurde die isoliert perfundierte Rattenlunge in die doppelwandige, feuchte Organkammer eingebracht und die Temperatur der die Lunge durchströmenden Perfusatflüssigkeit sowie die Temperatur in der Organkammer kontinuierlich von initial 4° Celsius auf 37° Celsius gesteigert. Zeitgleich erfolgte die kontinuierliche Steigerung der pulsatile Perfusion von 4 ml/min auf 13ml/min. Während dieser Phase wurde ständig neues Perfusat in das System gegeben und nach Durchströmung der Lunge verworfen. Hierdurch wurde sichergestellt, daß unerwünschte Blutbestandteile aus dem Gefäßsystem der Lunge ausgewaschen wurden.

Nach Erreichen der vorgegebenen Werte für Temperatur, Durchflußgeschwindigkeit und Wasserstoffionenkonzentration wurde das Perfusionssystem auf Zirkulation gestellt, so daß ab diesem Zeitpunkt weder Perfusat in das System gegeben, noch aus dem System entfernt wurde. Von nun an wurde die isolierte Lunge kontinuierlich mit einer Perfusatmenge von 100 ml perfundiert. Vor dem Beginn der nun folgenden 30-minütigen Vorlaufphase wurde die Lunge noch durch zweimaligen Verschluß des Expirationsschlauches für die Dauer von zwei Atemzügen gebläht, um eventuell vorhandene Atelektasen zu öffnen.

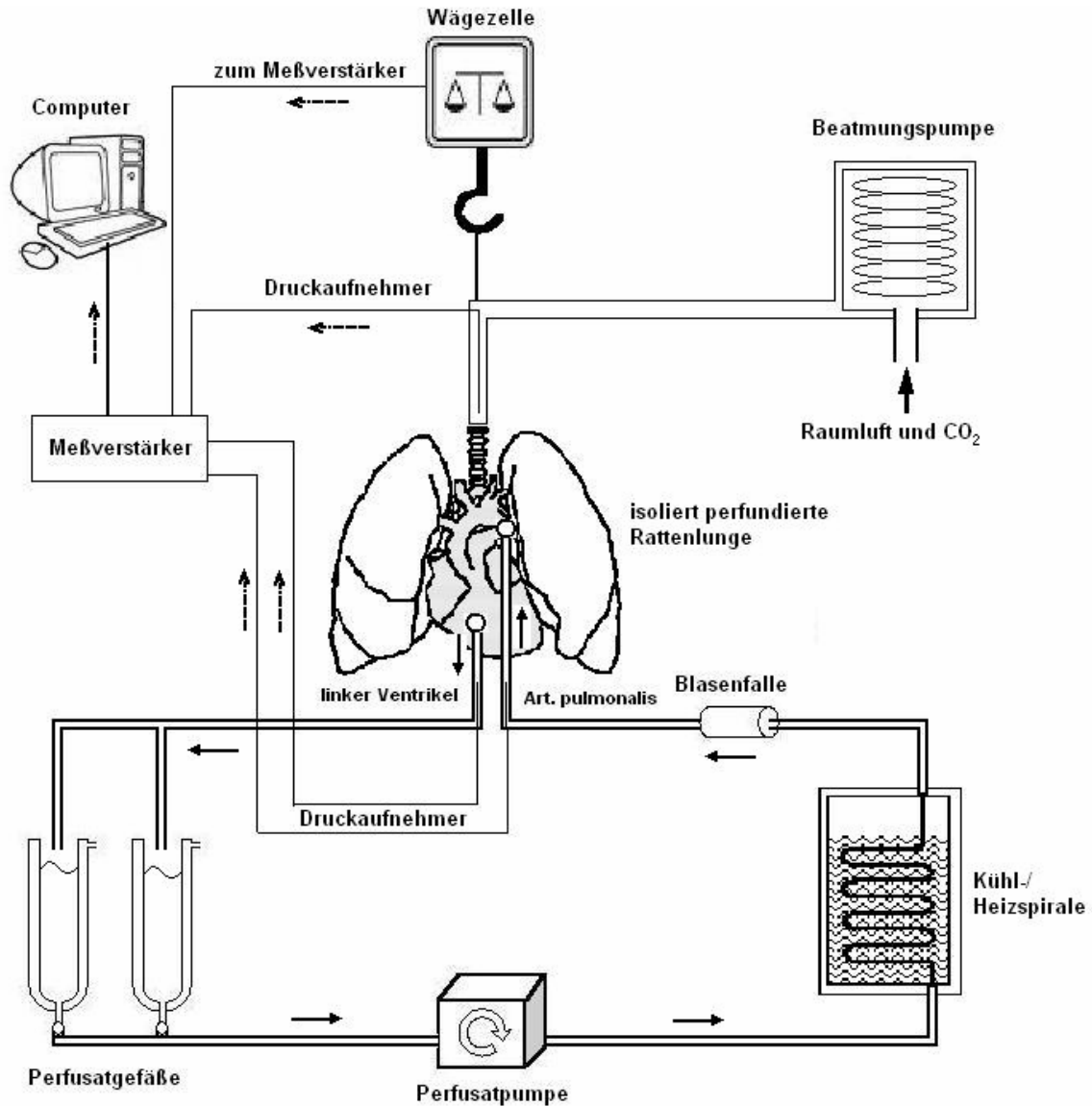


Abbildung 3: Schemazeichnung des Versuchsaufbaus der isoliert ventilierten und blutfrei perfundierten Rattenlunge.

Im Zentrum des Versuchsaufbaus befindet sich die isolierte Rattenlunge. Unterhalb des Organs sind die zur blutfreien Perfusion verwendeten Geräte schematisch dargestellt. Die Pfeile symbolisieren die Flußrichtung des Perfusats. Oberhalb des isolierten Organs ist die Beatmungspumpe zur Ventilation, sowie die verwendeten Meßinstrumente dargestellt. Die gestrichelten Pfeile symbolisieren den Datenfluß.

Der pH-Wert des Perfusats wurde sowohl während des Einstellens der Perfusatemperatur und der Flussgeschwindigkeit als auch während der Vorlaufphase und der eigentlichen Versuchszeit mit Hilfe des Blutgasmeßgerätes (Radiometer, NL-Copenhagen) in regelmäßigen Abständen kontrolliert. Unmittelbar nach der Lungenpräparation lag der pH-Wert um 7,1. Beim Erreichen des Temperaturoptimums und der korrekten Durchflußgeschwindigkeit erreichte auch der pH-Wert sein Optimum von 7,35. Zur Erhaltung eines optimalen Milieus für die isolierte Lunge wurde der pH-Wert konstant auf Werte zwischen 7,32 und 7,37 eingestellt. Eventuell auftretende Abweichungen des pH-Wertes wurden durch Steigerung beziehungsweise Drosselung der CO₂-Zufuhr zur Beatmungsluft korrigiert.

Eine genaue Auflistung und Bezeichnung der für den Versuchsaufbau „Isoliert perfundierte Rattenlunge“ verwendeten Geräte und Materialien befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

4.2.3 „priming“ mit LPS und LTA/PepG

Zum Gram-negativen „priming“ der isoliert perfundierten Rattenlunge wurde zum Zeitpunkt $t=0$ 10 µg/ml gelöstes Lipopolysaccharid in das doppelwandige Perfusatreservoir verabreicht (Abb. 4a). Der Zeitpunkt und die verabreichte Menge an LPS war bei allen Versuchen einheitlich.

Lipoteichonsäure (LTA) und Peptidoglykan (PepG) wurden zum Zweck des Gram-positiven „priming“ gleichfalls immer zum Zeitpunkt $t=0$ in das Perfusat gegeben. Die Kombinationen von LTA und PepG wurden bei den unterschiedlichen Versuchsgruppen variiert. Einen Überblick über die verwendeten Konzentrationen gibt Tabelle 4. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 4b schematisch dargestellt.

4.2.4 Verabreichung von LOX-Inhibitoren

Die verwendeten Inhibitoren der Lipoxygenase-Isoenzyme wurden in den jeweiligen Konzentrationen zu genau definierten Zeitpunkten in das doppelwandige Perfusatreservoir gegeben. Hierdurch wurde eine gleichmäßige Verteilung in der gesamten Perfusatmenge und ein kontrollierter Wirkungseintritt an der isoliert perfundierten Lunge gewährleistet. Entsprechend des Wirkmechanismus der einzelnen Substanzen wurden verschiedene

Applikationszeitpunkte gewählt; innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen wurde dieser in Vorversuchen ermittelte Applikationszeitpunkt allerdings nicht variiert. Tabelle 3 beinhaltet einen Überblick über die verwendeten Inhibitorkonzentrationen und den Zeitpunkt der Zugabe in das zirkulierende Perfusat. Weiterhin wird in den Abbildungen 4a und 4b der genaue zeitliche Ablauf der Wirkstoffzugabe im Versuchsaufbau dargestellt.

Inhibitor	Konzentration in $\mu\text{M/L}$	Zeitpunkt in min
CDC	1	110
CDC	5	110
CDC	20	110
Gossypol	0,5	110
Gossypol	1	110
Kaffeensäure	1	90
Kaffeensäure	10	90
Kaffeensäure	20	90
Baicalein	5	90
MK-886	5	90
L-655,238	30	90
Bay-u9773	1	90

Tabelle 3: Einteilung der Versuchsgruppen zum Gram-negativen „priming“.

Die verwendeten Inhibitoren der Lipoxigenase-Isoenzyme wurden in unterschiedlichen Konzentrationen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten eingesetzt. Bei einigen Hemmstoffen ist die selektive Hemmung unterschiedlicher Lipoxigenase-Isoenzyme von der Konzentration des eingesetzten Inhibitors abhängig. Andere Hemmstoff wirken unabhängig von ihrer Konzentration spezifisch auf bestimmte Lipoxigenase-Isoenzyme oder auf Leukotrienrezeptoren.

Tabelle 4 gibt einen Überblick über die verwendeten Substanzen und deren Konzentrationen bei den Versuchen zum „Gram-positiven priming“.

Plasma-konzentration in %	LTA-Konzentration in µg/ml	PepG-Konzentration in µg/ml	Zeitpunkt in min
0,0	/	/	/
1,5	20	/	0
1,5	/	20	0
1,5	20	20	0

Tabelle 4: Einteilung der Versuchsgruppen zum Gram-positiven „priming“.

Beim Gram-positiven „priming“ wurden Versuche mit Plasmazugabe in die Perfusionslösung durchgeführt. Desweiteren wurden unterschiedliche Kombinationen von Lipoteichonsäure (LTA) und Peptidoglykan (PepG) eingesetzt.

4.2.5 Verabreichung von Arachidonsäure

Arachidonsäure wurde zum Zeitpunkt $t=120$ min in das Perfusatgefäß gegeben. Hierbei wurde bei allen Versuchen immer der gleiche Zeitpunkt gewählt. Die Abbildungen 4a und 4b beinhalten sowohl einen Überblick über den Zeitpunkt der Arachidonsäuregabe beim Gram-negativen und Gram-positiven „priming“, als auch eine komplette Übersicht über den zeitlichen Ablauf aller durchgeführten Versuche. In allen Versuchen wurde mit $10 \mu\text{M/L}$ AA eine einheitliche Konzentration verwendet.

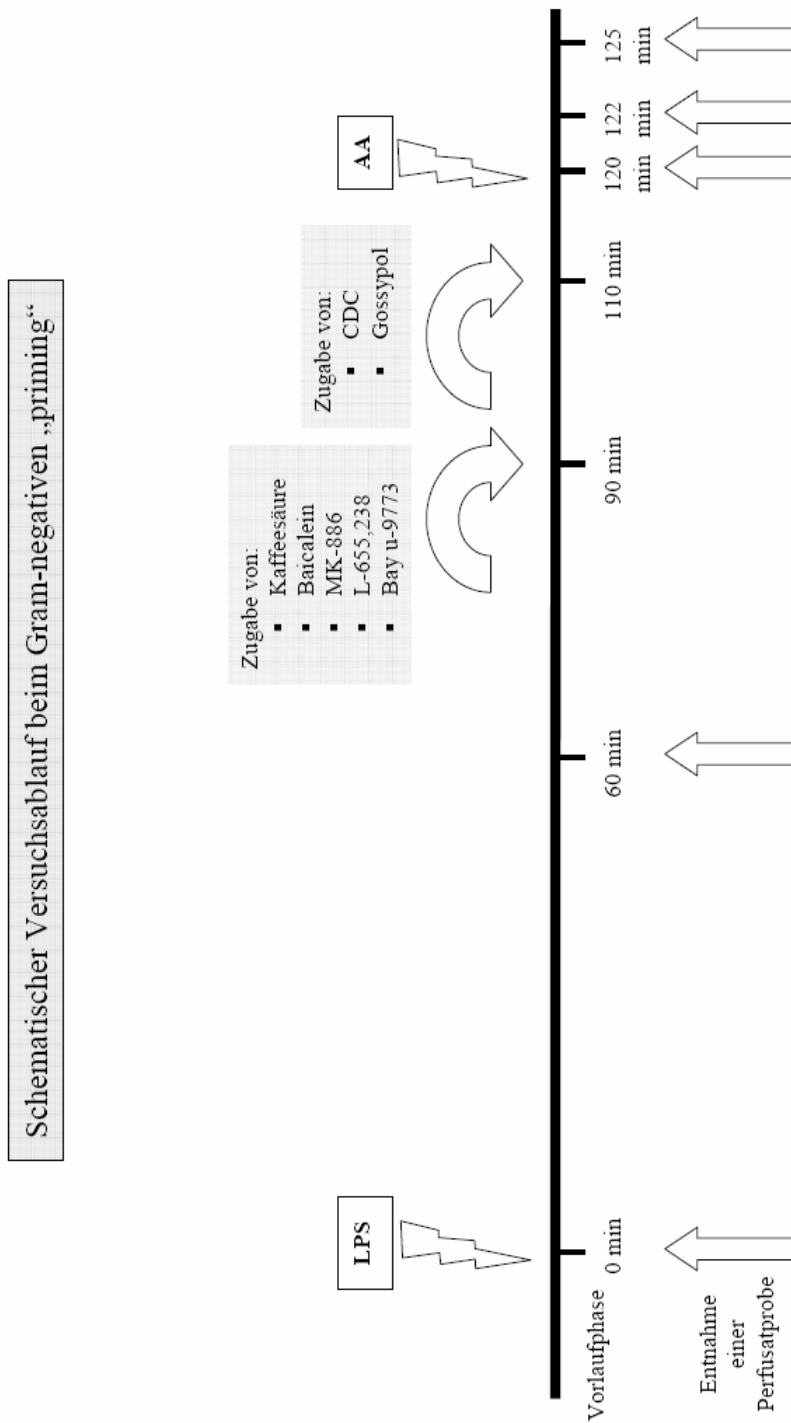


Abbildung 4a: Schematischer Versuchsablauf mit Zeitpunkten der Substanzgabe in das Perfusat beim Gram-negativen „priming“.

Die isoliert perfundierten Rattenlungen wurden ab dem Zeitpunkt 0 min durch die Zugabe von LPS zum Perfusat stimuliert. Zum Zeitpunkt 120 min wurde dem Perfusat Arachidonsäure zugefügt. Die Verabreichung von Kaffeesäure (1 µM/L, 10 µM/L, 20 µM/L) Baicalein (5 µM/L), MK-886 (5 µM/L), L-655,238 (30 µM/L) und Bay u-9773 (1 µM/L) zur Perfusionslösung erfolgte zum Zeitpunkt 90 min. CDC (1 µM/L, 5 µM/L, 20 µM/L) und Gossypol (0,5 µM/L, 1 µM/L) wurden dem Perfusat jeweils zum Zeitpunkt 110 min zugegeben. Zu den Zeitpunkten 0 min, 60 min, 120 min, 122 min und 125 min erfolgte jeweils die Entnahme einer Perfusatsprobe zur Messung der AA-Metabolite mittels ELISA.

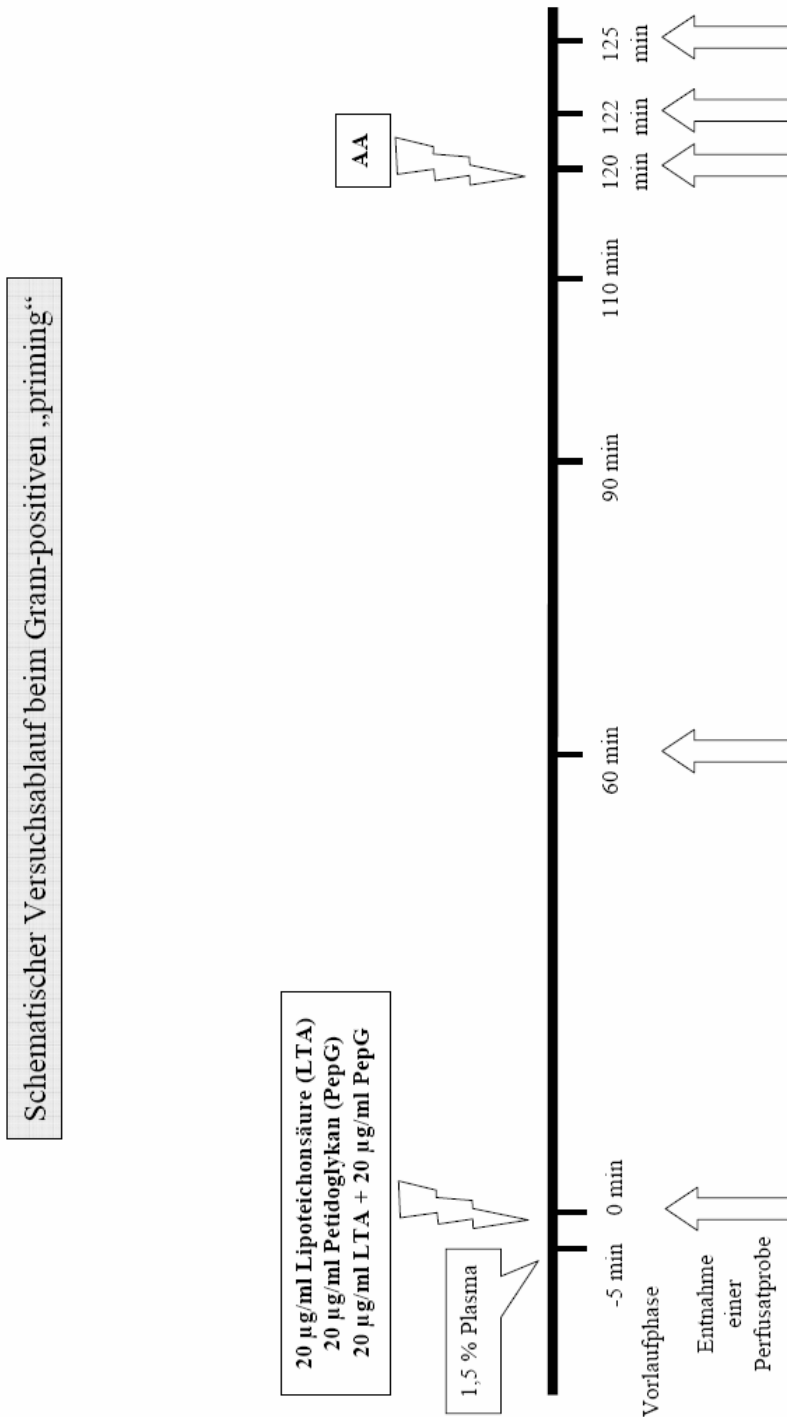


Abbildung 4b: Schematischer Versuchsablauf mit Zeitpunkten der Substanzgabe in das Perfusat beim Gram-positiven „priming“.

Zum Zeitpunkt -5 min wurde dem Perfusat 1,5 ml Plasma zugegeben. Die isoliert perfundierten Rattenlungen wurden ab dem Zeitpunkt 0 min durch die Zugabe von LTA und/oder PepG zum Perfusat stimuliert. Zum Zeitpunkt 120 min wurde dem Perfusat Arachidonsäure zugefügt. Die Verabreichung von Kaffeesäure (10 µM/L) zur Perfusionslösung erfolgte zum Zeitpunkt 90 min. Gossypol (1 µM/L) wurde dem Perfusat zum Zeitpunkt 110 min zugegeben. Zu den Zeitpunkten 0 min, 60 min, 120 min, 122 min und 125 min erfolgte jeweils die Entnahme einer Perfusatprobe zur Messung der AA-Metabolite mittels ELISA.

4.2.6 Probenentnahme und Probenanalyse

Während der Versuche wurde jeweils 1 ml des Perfusats zu den Zeitpunkten 0, 60, 120, 122 und 125 min als Probe gewonnen. Der zeitliche Ablauf der Probennahme ist in den Abbildungen 4a und 4b schematisch dargestellt. Die jeweils entnommene Probe wurde in drei Teilproben à 333 µl aliquotiert und diese Teilproben in flüssigem Stickstoff gefroren. Diese Proben wurden bei einer Temperatur von -80° Celsius, respektive -20° Celsius gelagert. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben dann, wie in Kapitel 4.1.8 beschrieben, mittels ELISA-Technik auf Metabolite der Arachidonsäure untersucht.

4.2.7 Versuchsprotokollierung

Die Parameter pulmonalarterieller Druck (PAP), linksventrikulärer Druck (LVP) und Beatmungsdruck (VP) wurden mittels Combitrans-Transducer gemessen; das Gewicht wurde durch eine elektronische Wägezelle mit nachgeschaltetem Meßverstärker (Hottinger Baldwin Messtechnik, D-Darmstadt) bestimmt. Alle Meßwerte wurden durch einen 4-Kanal-Brückenverstärker (Fa. WPI, Harry Fein, D-Berlin) verstärkt und mithilfe des Aufzeichnungsprogramms „Labtech Notebook-Software“ (Spectra Computersysteme, D-Leinfelden-Echterdingen) kontinuierlich aufgezeichnet. In Abbildung 5 wird exemplarisch das ausgedruckte Meßprotokoll dargestellt; hierbei handelt es sich um einen Kontrollversuch zum Gram-negativen „priming“. Zum Zeitpunkt $t=0$ wurden 10 µg/ml LPS in das Perfusat gegeben und nach zweistündiger Inkubation erfolgte zum Zeitpunkt $t=120$ min die Gabe von 10 µM/L Arachidonsäure. Nach Versuchsende wurden die Meßprotokolle gespeichert und ausgedruckt.

Auf einem zusätzlichen Protokollblatt wurde der genaue Versuchsaufbau mit den jeweils benutzten Substanzen sowie die gemessenen Werte vermerkt.

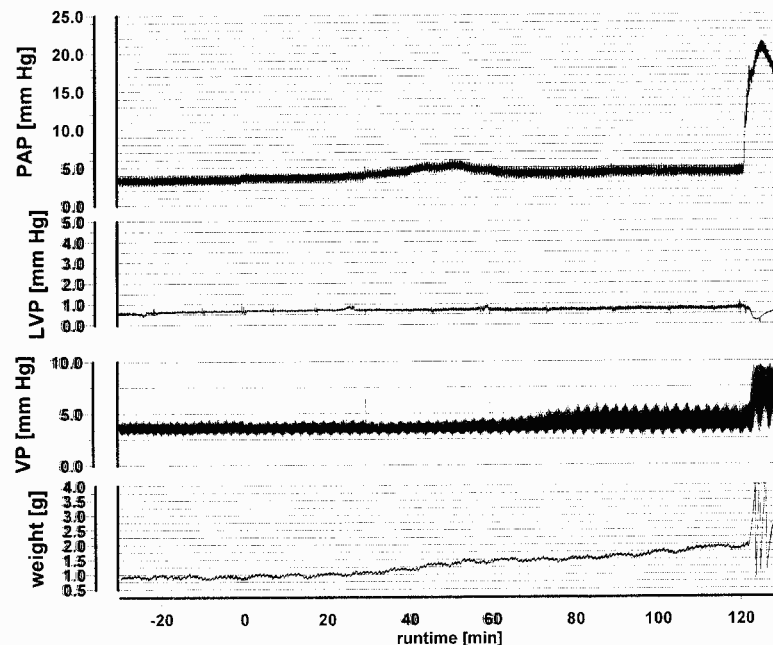


Abbildung 5: Ausdruck des Meßprotokolls.

Das Meßprotokoll gibt Auskunft über den Verlauf des Versuchs; dargestellt ist ein Kontrollversuch. Der Zeitraum von -30 min bis 0 min diente als Vorlaufkontrolle. Die oberste Verlaufskurve stellt die Entwicklung des pulmonalarteriellen Drucks in der Vorlaufphase und im gesamten Versuchszeitraum dar. Darunter ist die Messung des linksventrikulären Drucks protokolliert. Die dritte Verlaufskurve gibt Auskunft über die Entwicklung des Beatmungsdrucks über den gesamten Versuchszeitraum und in der untersten Meßkurve ist die Gewichtsveränderung der isoliert perfundierten Rattenlunge dargestellt. Die Anstiege zum Zeitpunkt $t=120$ min sind durch die Zugabe AA bedingt.

4.2.8 Auswertung und Statistik

Von den ausgedruckten Meßprotokollen wurden für jeden Versuch festgelegte Werte abgelesen. Der Wert des PAP wurde zu den Zeitpunkten $t=0$ min, $t=60$ min und $t=120$ min abgelesen. Etwaige Veränderungen des PAP im Zeitraum von $t=0$ min bis $t=120$ min wurden ebenfalls registriert. Desweiteren wurde die Veränderung (Δ) der Werte PAP, LVP, VP, W im Zeitraum $t=0$ min bis $t=120$ min gemessen, um einen störungsfreien und konstanten Verlauf des Versuches zu verifizieren. Außerdem wurde die Veränderung (Δ) der Werte PAP, LVP, VP und W jeweils vom Zeitpunkt $t=120$ min bis zum dem Zeitpunkt gemessen, an dem der Ausschlag der Meßkurve des pulmonalarteriellen Drucks am höchsten war. Die absoluten Werte des Gewichts der isoliert perfundierten Rattenlunge wurde jeweils zu den Zeitpunkten $t=-30$ min, $t=120$ min, $t=130$ min und zum Zeitpunkt des höchsten Anstiegs der Meßkurve des Wertes W gemessen.

Alle so erhobenen Daten wurden zur besseren Übersicht und zur Archivierung in das Programm „Microsoft Excel“ übertragen.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm „GraphPad Prism“ (Version 2.01). Durchgeführt wurde die Varianzanalyse ANOVA (analysis of variance) mit dem Newman-Keuls-Post-Test.

Alle im Text, Tabellen und Graphiken verwendeten Daten sind berechnete Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Der Stichprobenumfang n bezeichnet die Anzahl der unabhängig voneinander durchgeführten Versuche innerhalb einer Gruppe. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurden wie folgt bewertet:

p-Wert	Bezeichnung	Zusammenfassung
> 0,05	nicht signifikant	
< 0,05	signifikant	*
< 0,01	sehr signifikant	**
< 0,001	hoch signifikant	***

4.2.9 Plasmagewinnung

Das für die Versuchsgruppen mit Gram-positiven „priming“ verwendete Plasma wurde aus während der Präparation gewonnenem, gerinnungsgehemmten Blut hergestellt. Dazu wurde der rechte Ventrikel des Herzens punktiert und ca. 1-2 ml Blut abgezogen. Dieses Blut wurde dann bei 3000 Umdrehungen/min zehn Minuten lang bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das im Überstand befindliche Plasma wurde abpipettiert und in Eppendorfgefäßen bei -20° Celsius gelagert.

Jeweils zwölf der vorhandenen Eppendorfgefäße wurden gepoolt und hierzu ein weiteres Mal für zehn Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und erneut in Eppendorfgefäßen a 1,5 ml aliquotiert. Dieser Plasmapool wurde bis zur Verwendung bei -20° Celsius gelagert.

5 Ergebnisse

5.1 Überblick

Ziel der Untersuchungen war es, die Rolle der verschiedenen Lipoxygenase-Isoenzyme nach Gram-negativem „priming“ auf die durch Arachidonsäure (AA) induzierte Reaktivität des Vaso- und Bronchotonus sowie die erhöhte Gefäßpermeabilität zu charakterisieren. Hierzu wurden verschiedene Inhibitoren eingesetzt, welche die Lipoxygenasen mit unterschiedlicher Selektivität hemmen. Weiterhin wurden Hemmstoffe von in den Metabolismus der Lipoxygenasen involvierter Enzyme (FLAP) und Rezeptorenblocker eingesetzt.

5.2 Ergebnisse der Kontrollversuche

Die Kontrollversuche ohne LPS-„priming“ zeigten während der zweistündigen Laufzeit keine signifikanten Veränderungen des pulmonalarteriellen Drucks, des Beatmungsdrucks sowie des Gewichts der Lunge. Die Gabe von 10 $\mu\text{M/L}$ AA zum Zeitpunkt $t=120$ min verursachte einen Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks um durchschnittlich 3,88 mmHg und eine Gewichtszunahme der Lunge um durchschnittlich 0,63 g. Der Beatmungsdruck nahm um durchschnittlich 0,14 mmHg zu (Tab. 5a).

Auch nach Zugabe von 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS allein zum Zeitpunkt $t=0$ min zeigten sich während der gesamten Laufzeit des Versuches keine signifikanten Veränderungen der untersuchten Parameter. Die Gabe von 10 $\mu\text{M/L}$ AA zum Zeitpunkt $t=120$ min verursachte allerdings eine deutlich erhöhte Reaktion der Lunge im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen. Der pulmonalarterielle Druck stieg um etwa das Doppelte auf durchschnittlich 9,73 mmHg an; das Gewicht der Lunge nahm um durchschnittlich 3,12 g zu. Der Beatmungsdruck stieg auf 1,53 mmHg (Tab. 5d).

5.3 Veränderungen des pulmonalarteriellen Drucks LPS-stimulierter Rattenlungen unter Einfluß von Lipoxygenase-Inhibitoren

Die verwendeten Konzentrationen von CDC hemmen sämtliche Isoenzyme der Lipoxygenase. Eine Konzentration von 1 $\mu\text{M/L}$ zeigte im Versuch keine signifikante Verringerung des pulmonalarteriellen Druckanstiegs nach der Arachidonsäuregabe, wohingegen die Konzentration von 5 $\mu\text{M/L}$ CDC den Anstieg des PAP um die Hälfte

verringerte. Die Konzentration von 20 $\mu\text{M/L}$ CDC im Perfusat verursachte eine Reduktion des unter Kontrollbedingungen induzierten PAP-Anstiegs auf etwa 20 %. Dabei lag dieser Wert mit 1,78 mmHg im arithmetischen Mittel noch unterhalb des durch AA ohne „LPS-priming“ erhaltenen Wertes von 3,88 mmHg. Die in Abbildung 6 dargestellte Dosis-Wirkungsbeziehung zeigt die signifikante Senkung des pulmonalarteriellen Druckanstiegs durch die Gabe von CDC. Erst mit den Dosierungen 5 $\mu\text{M/L}$ und 20 $\mu\text{M/L}$ ergab sich ein signifikant ($p < 0,001$) verringerter Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks.

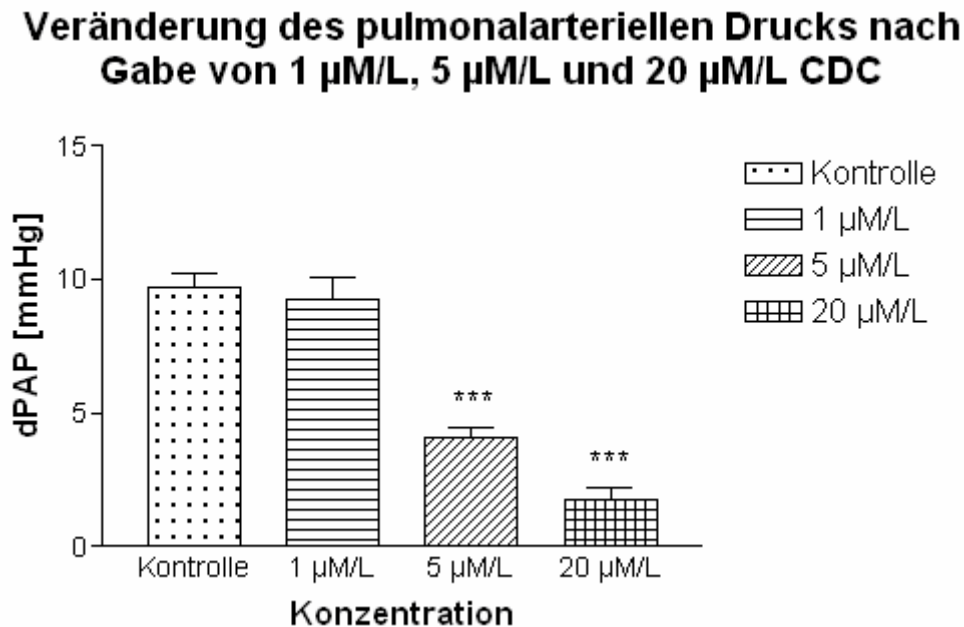


Abbildung 6: Veränderung des pulmonalarteriellen Drucks (dPAP) nach Gabe von 1 $\mu\text{M/L}$, 5 $\mu\text{M/L}$ und 20 $\mu\text{M/L}$ CDC.

Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 $\mu\text{g/ml}$) als Kontrolle und in Anwesenheit von CDC ab dem Zeitpunkt 110 min perfundiert. CDC wurde in den Konzentrationen 1 $\mu\text{M/L}$, 5 $\mu\text{M/L}$ und 20 $\mu\text{M/L}$ eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 $\mu\text{M/L}$ Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. $n = 5$ unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der mit CDC inkubierten Lungen zu den Kontrolllungen: *** $p < 0,001$

Durch die selektive Hemmung der 12-LOX und der 15-LOX mit Gossypol ergaben sich im Vergleich zu den Kontrollversuchen ein um ca. die Hälfte verringerter Anstieg des PAP, der in beiden getesteten Dosierungen jeweils signifikant ($p < 0,001$) war (Abb. 7).

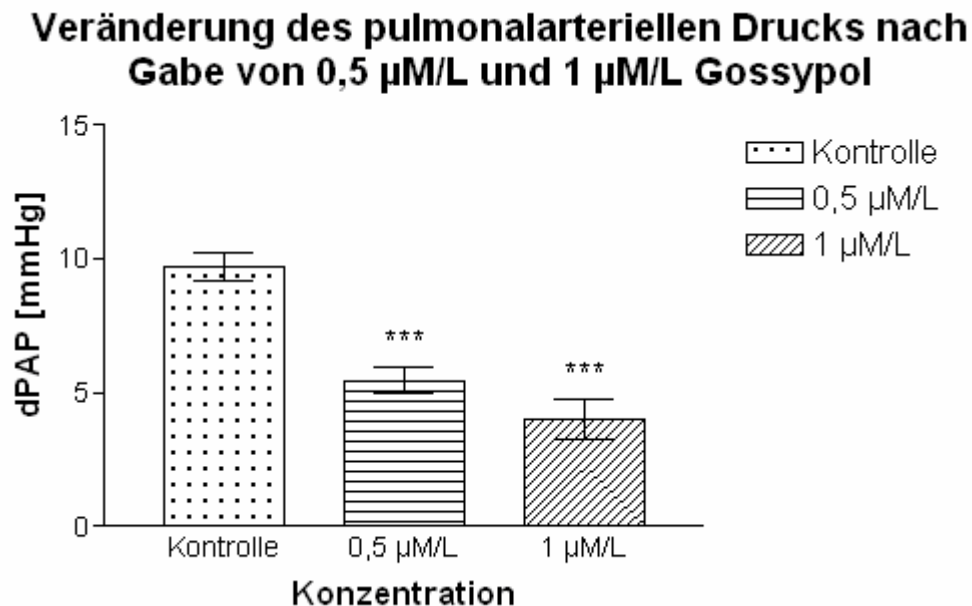


Abbildung 7: Veränderung des pulmonalarteriellen Drucks (dPAP) nach Gabe von 0,5 $\mu\text{M/L}$ und 1 $\mu\text{M/L}$ Gossypol.

Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 $\mu\text{g/ml}$) als Kontrolle und in Anwesenheit von Gossypol ab dem Zeitpunkt 110 min perfundiert. Gossypol wurde in den Konzentrationen 0,5 $\mu\text{M/L}$ und 1 $\mu\text{M/L}$ eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 $\mu\text{M/L}$ Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. $n = 5$ unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der mit Gossypol inkubierten Lungen zu den Kontrolllungen: *** $p < 0,001$

Bei den Versuchen mit Kaffeesäure, einem selektivem Hemmstoff der 5-LOX, wurde ebenfalls eine dosisabhängige Reduktion des PAP-Anstiegs beobachtet. Die durch Zugabe von 1 $\mu\text{M/L}$ Kaffeesäure erreichte Hemmung des pulmonalarteriellen Druckanstiegs war im Vergleich zur Kontrolle ohne Zugabe eines LOX-Hemmstoff nicht signifikant. Die maximale Hemmung wurde mit einer Konzentration von 10 $\mu\text{M/L}$ Kaffeesäure erreicht. Die Verdoppelung der Dosis zeigte keine stärkere Hemmung (Abb. 8). Im Vergleich zur Kontrolle war die Verringerung des PAP-Anstiegs nach Gabe von 10 $\mu\text{M/L}$ und 20 $\mu\text{M/L}$ signifikant ($p < 0,01$).

Baicalein, ein selektiver Hemmstoff der 12-LOX bewirkte in der Konzentration von 5 $\mu\text{M/L}$ eine starke Verringerung des PAP-Anstiegs. Dieser fiel um 6 mmHg signifikant ($p < 0,001$) geringer aus als der Anstieg des PAP in den Kontrollversuchen (Abb. 9).

Veränderung des pulmonalarteriellen Drucks nach Gabe von 1 µM/L, 10 µM/L und 20 µM/L Kaffeesäure

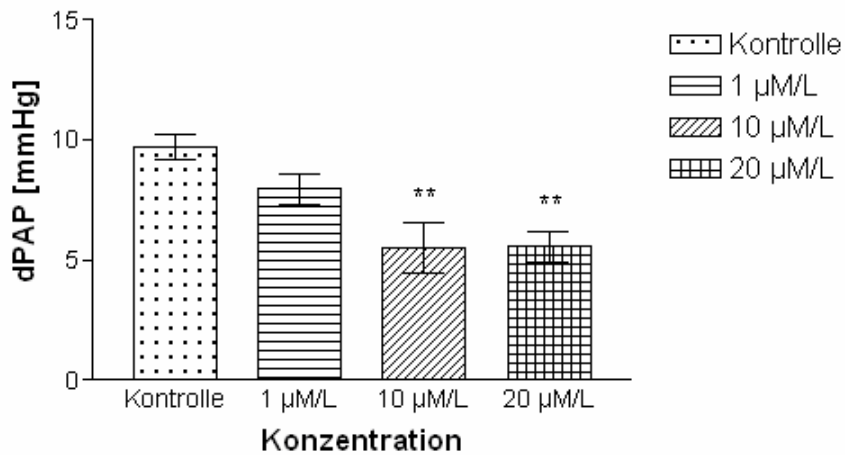


Abbildung 8: Veränderung des pulmonalarteriellen Drucks (dPAP) nach Gabe von 1 µM/L, 10 µM/L und 20 µM/L Kaffeesäure.

Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 µg/ml) als Kontrolle und in Anwesenheit von Kaffeesäure ab dem Zeitpunkt 90 min perfundiert. Kaffeesäure wurde in den Konzentrationen 1 µM/L, 10 µM/L und 20 µM/L eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 µM/L Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der mit Gossypol inkubierten Lungen zu den Kontrolllungen: ** p<0,01

Veränderung des pulmonalarteriellen Drucks nach Gabe von 5 µM/L Baicalein

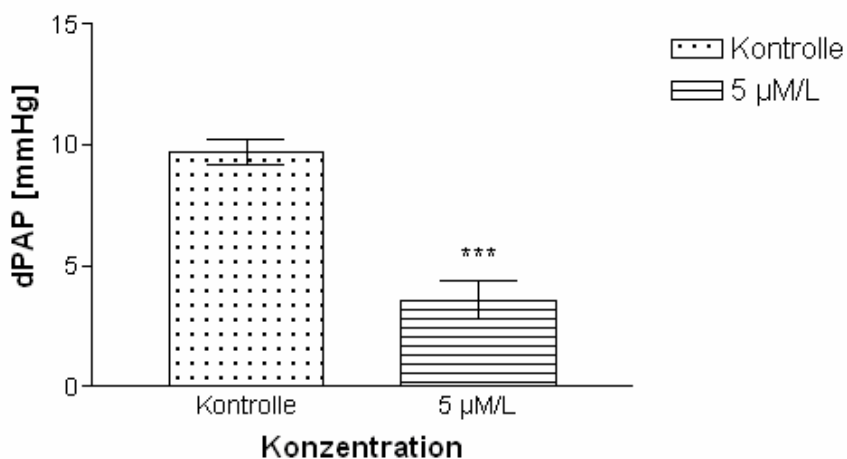


Abbildung 9: Veränderung des pulmonalarteriellen Drucks (dPAP) nach Gabe von 5 µM/L Baicalein.

Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 µg/ml) als Kontrolle und in Anwesenheit von Baicalein ab dem Zeitpunkt 90 min perfundiert. Baicalein wurde in einer Konzentration von 5 µM/L eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 µM/L Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der mit Baicalein inkubierten Lungen zu den Kontrolllungen: *** p<0,001

Die Verwendung von MK-886, einem Inhibitor der FLAP, bewirkte ebenfalls einen dosisabhängigen Abfall des PAP, wobei die mit der Konzentration von 5 $\mu\text{M/L}$ MK-886 erreichte Hemmung 3,52 mmHg, die stärkste erreichbare Hemmung mit Kaffeesäure 5,52 mmHg betrug (Abb.10). Im Vergleich zur Kontrolle ohne Hemmstoff der Lipoxygenase war die Hemmung des PAP in beiden verwendeten Konzentrationen signifikant (1 $\mu\text{M/L}$ MK-886: $p < 0,01$; 5 $\mu\text{M/L}$ MK-886: $p < 0,001$)

Mit einem weiteren Inhibitor der FLAP, L-655,238, wurde bei einer verwendeten Konzentration von 30 $\mu\text{M/L}$ ein signifikant ($p < 0,001$) geringerer Anstieg des PAP nach Arachidonsäuregabe beobachtet. Diese Veränderungen sind in Abbildung 11 dargestellt.

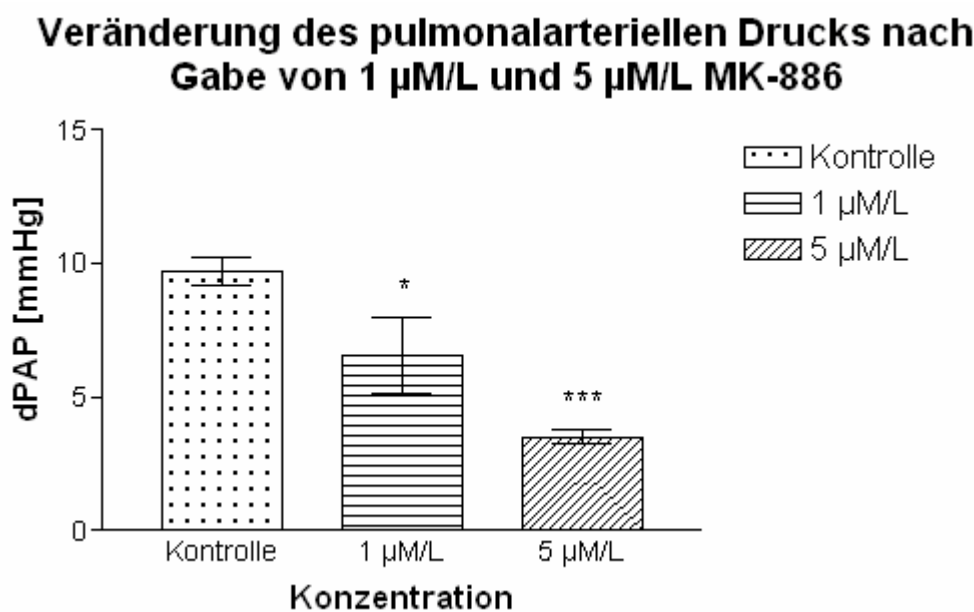


Abbildung 10: Veränderung des pulmonalarteriellen Drucks (dPAP) nach Gabe von 1 $\mu\text{M/L}$ und 5 $\mu\text{M/L}$ MK-886.

Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 $\mu\text{g/ml}$) als Kontrolle und in Anwesenheit von MK-886 ab dem Zeitpunkt 90 min perfundiert. MK-886 wurde in den Konzentrationen 1 $\mu\text{M/L}$ und 5 $\mu\text{M/L}$ eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 $\mu\text{M/L}$ Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. $n = 5$ unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der mit MK-886 inkubierten Lungen zu den Kontrolllungen: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$

Veränderung des pulmonalarteriellen Drucks nach Gabe von 30 $\mu\text{M/L}$ L-655,238

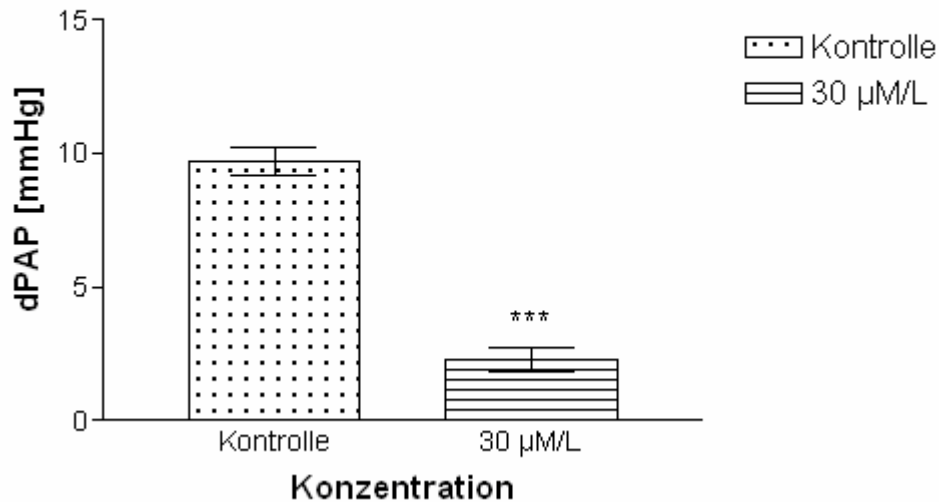


Abbildung 11: Veränderung des pulmonalarteriellen Drucks (dPAP) nach Gabe von 30 $\mu\text{M/L}$ L-655,238.

Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 $\mu\text{g/ml}$) als Kontrolle und in Anwesenheit von L-655,238 ab dem Zeitpunkt 90 min perfundiert. L-655,238 wurde in einer Konzentration von 30 $\mu\text{M/L}$ eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 $\mu\text{M/L}$ Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. $n = 5$ unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der mit L-655,238 inkubierten Lungen zu den Kontrolllungen: *** $p < 0,001$

Nach der Gabe von Bay-u9773, einem Antagonisten des Cys LT_1 - und des Cys LT_2 -Rezeptors zeigte sich bereits bei der geringen Dosierung von 1 $\mu\text{M/L}$ eine signifikante ($p < 0,001$) Verringerung des PAP-Anstiegs (Abb.12). Dieser fiel im Vergleich zu den Kontrollversuchen um 6,5 mm Hg geringer aus.

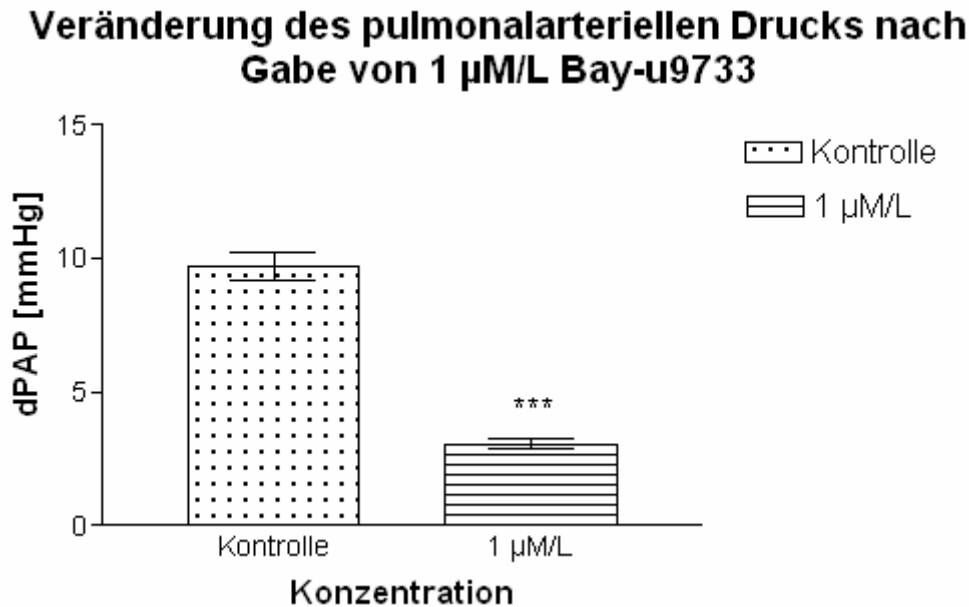


Abbildung 12: Veränderung des pulmonalarteriellen Drucks (dPAP) nach Gabe von 1 μ M/L Bay-u9773.

Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 μ g/ml) als Kontrolle und in Anwesenheit von Bay-u9773 ab dem Zeitpunkt 90 min perfundiert. Bay-u9773 wurde in einer Konzentration von 1 μ M/L eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 μ M/L Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der mit Bay-u9773 inkubierten Lungen zu den Kontrolllungen: *** p<0,001

5.4 Veränderungen des Beatmungsdrucks LPS-stimulierter Rattenlungen unter Einfluß von Lipoxygenase-Inhibitoren

Die Hemmung aller LOX-Isoenzyme durch den Inhibitor CDC verursachte in den mittleren Dosierungen von 1 μ M/L und 5 μ M/L im Vergleich zu den Kontrollversuchen nur geringfügig niedrigere Anstiege des Beatmungsdrucks, ohne Erreichen der Signifikanz-Niveaus. Bei der Verwendung der hohen Dosierung von 20 μ M/L fiel der Anstieg des Beatmungsdruckes allerdings signifikant (p<0,001) niedriger aus als in der Kontrollgruppe (Abb. 13).

Veränderung des Beatmungsdrucks nach Gabe von 1 µM, 5 µM und 20 µM CDC

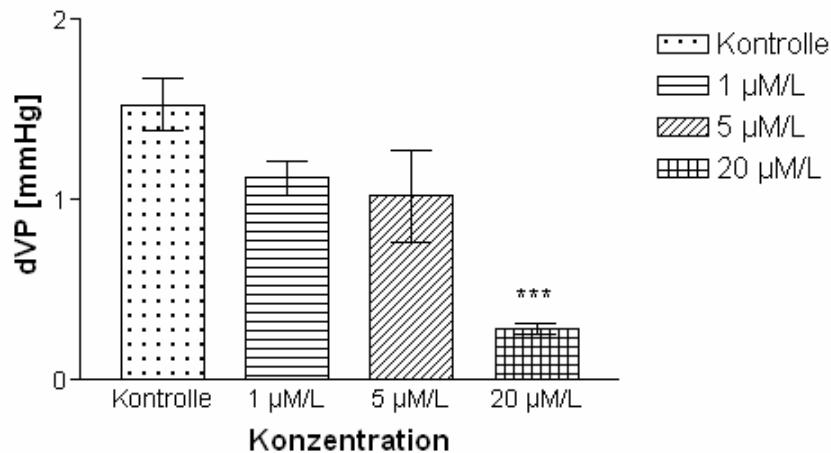


Abbildung 13: Veränderung des Beatmungsdrucks (dVP) nach Gabe von 1 µM/L, 5 µM/L und 20 µM/L CDC.

Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 µg/ml) als Kontrolle und in Anwesenheit von CDC ab dem Zeitpunkt 110 min perfundiert. CDC wurde in den Konzentrationen 1 µM/L, 5 µM/L und 20 µM/L eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 µM/L Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der mit CDC inkubierten Lungen zu den Kontrolllungen: *** p<0,001

Veränderung des Beatmungsdrucks nach Gabe von 0,5 µM/L und 1 µM/L Gossypol

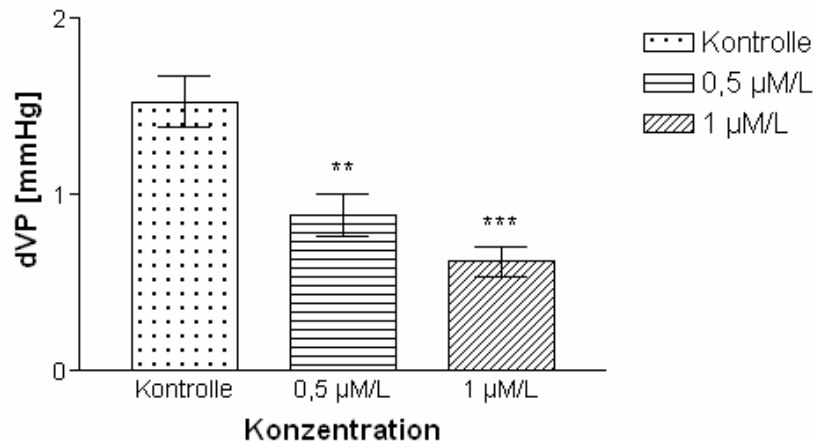


Abbildung 14: Veränderung des Beatmungsdrucks (dVP) nach Gabe von 0,5 µM/L und 1 µM/L Gossypol.

Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 µg/ml) als Kontrolle und in Anwesenheit von Gossypol ab dem Zeitpunkt 110 min perfundiert. Gossypol wurde in den Konzentrationen 0,5µM/L und 1 µM/L eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 µM/L Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der mit Gossypol inkubierten Lungen zu den Kontrolllungen: ** p<0,01, *** p<0,001

Eine vergleichbare, dosisabhängige Verringerung des durch „LPS-priming“ und Arachidonsäureapplikation induzierten Anstiegs des Beatmungsdrucks zeigte sich bei den Versuchen mit Gossypol. Die Verringerung des Anstiegs des Beatmungsdrucks war sowohl mit der Dosierung 0,5 $\mu\text{M/L}$ ($p < 0,01$), als auch mit der Dosierung 1 $\mu\text{M/L}$ ($p < 0,001$) signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 14).

Durch die selektive Hemmung einzelner LOX-Isoenzyme durch Kaffeesäure und Baicalein wurde eine deutliche Senkung des Anstiegs des Beatmungsdrucks erreicht. Der Anstieg des Beatmungsdrucks war bei allen drei verwendeten Dosierungen von Kaffeesäure signifikant ($p < 0,001$) geringer als in der Kontrolle (Abb. 15). Abbildung 16 zeigt, daß der VP-Anstieg nach der Zugabe von 5 $\mu\text{M/L}$ Baicalein um 0,9 mmHg signifikant ($p < 0,001$) geringer ausfällt als in der Kontrolle.

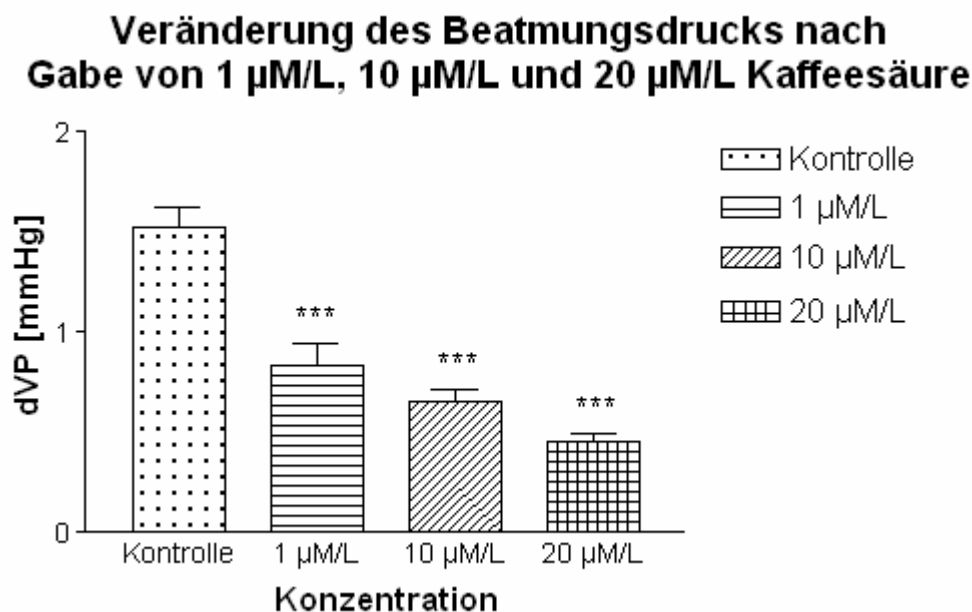


Abbildung 15: Veränderung des Beatmungsdrucks (dVP) nach Gabe von 1 $\mu\text{M/L}$, 10 $\mu\text{M/L}$ und 20 $\mu\text{M/L}$ Kaffeesäure.

Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 $\mu\text{g/ml}$) als Kontrolle und in Anwesenheit von Kaffeesäure ab dem Zeitpunkt 90 min perfundiert. Kaffeesäure wurde in den Konzentrationen 1 $\mu\text{M/L}$, 10 $\mu\text{M/L}$ und 20 $\mu\text{M/L}$ eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 $\mu\text{M/L}$ Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. $n = 5$ unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der mit Gossypol inkubierten Lungen zu den Kontrolllungen: *** $p < 0,001$

Veränderung des Beatmungsdrucks nach Gabe von 5 $\mu\text{M/L}$ Baicalein

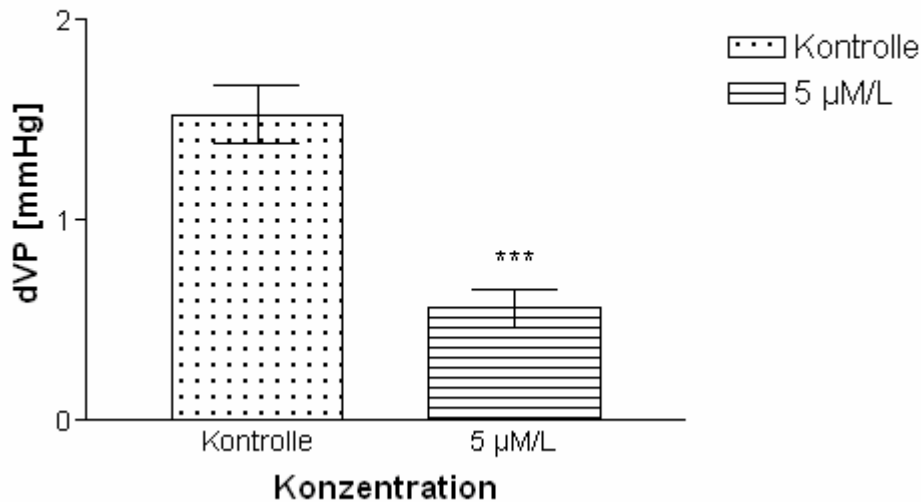


Abbildung 16: Veränderung des Beatmungsdrucks (dVP) nach Gabe von 5 $\mu\text{M/L}$ Baicalein.

Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 $\mu\text{g/ml}$) als Kontrolle und in Anwesenheit von Baicalein ab dem Zeitpunkt 90 min perfundiert. Baicalein wurde in einer Konzentration von 5 $\mu\text{M/L}$ eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 $\mu\text{M/L}$ Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. $n = 5$ unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der mit Baicalein inkubierten Lungen zu den Kontrolllungen: *** $p < 0,001$

Die Zugabe der beiden FLAP-Inhibitoren MK-866 und L-655,238 bewirkte einen signifikant geringeren Anstieg des Beatmungsdrucks im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Wirkung von MK-886 zeigte - wie in Abbildung 17 - dargestellt eine deutliche Abhängigkeit von der Dosis (1 $\mu\text{M/L}$ MK-886: $p < 0,01$; 5 $\mu\text{M/L}$ MK-886: $p < 0,001$). Die nach Literaturangaben und Vorversuchen ermittelte Dosis von L-655,238 führte zu einer markanten, hochsignifikanten ($p < 0,001$) Reduktion des VP-Anstiegs (Abb. 18).

Veränderung des Beatmungsdrucks nach Gabe von 1 $\mu\text{M/L}$ und 5 $\mu\text{M/L}$ MK-886

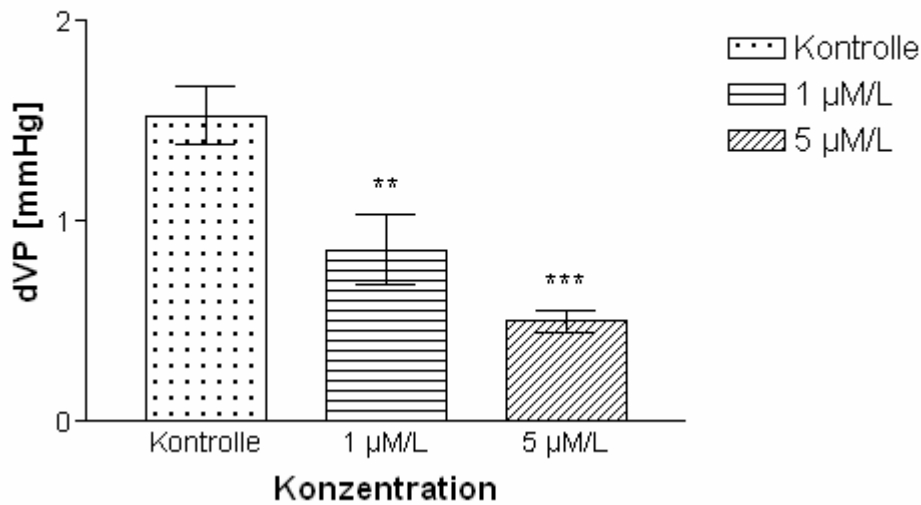


Abbildung 17: Veränderung des Beatmungsdrucks (dVP) nach Gabe von 1 $\mu\text{M/L}$ und 5 $\mu\text{M/L}$ MK-886.

Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 $\mu\text{g/ml}$) als Kontrolle und in Anwesenheit von MK-886 ab dem Zeitpunkt 90 min perfundiert. MK-886 wurde in den Konzentrationen 1 $\mu\text{M/L}$ und 5 $\mu\text{M/L}$ eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 $\mu\text{M/L}$ Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. $n = 5$ unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der mit MK-886 inkubierten Lungen zu den Kontrolllungen: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Veränderung des Beatmungsdrucks nach Gabe von 30 $\mu\text{M/L}$ L-655,238

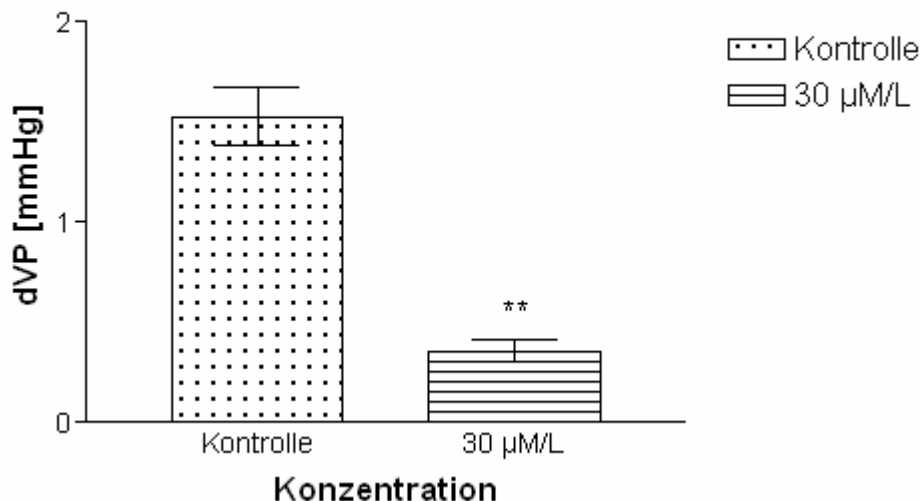


Abbildung 18: Veränderung des Beatmungsdrucks (dVP) nach Gabe von 30 $\mu\text{M/L}$ L-655,238.

Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 $\mu\text{g/ml}$) als Kontrolle und in Anwesenheit von L-655,238 ab dem Zeitpunkt 90 min perfundiert. L-655,238 wurde in einer Konzentration von 30 $\mu\text{M/L}$ eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 $\mu\text{M/L}$ Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. $n = 5$ unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der mit L-655,238 inkubierten Lungen zu den Kontrolllungen: ** $p < 0,01$

Die Zugabe des Cys LT1/LT2-Antagonisten Bay-u9733 ins Perfusat bewirkte einen um den Faktor 3 signifikant geringeren Anstieg ($p < 0,001$) des Beatmungsdrucks im Vergleich zur Kontrollgruppe.

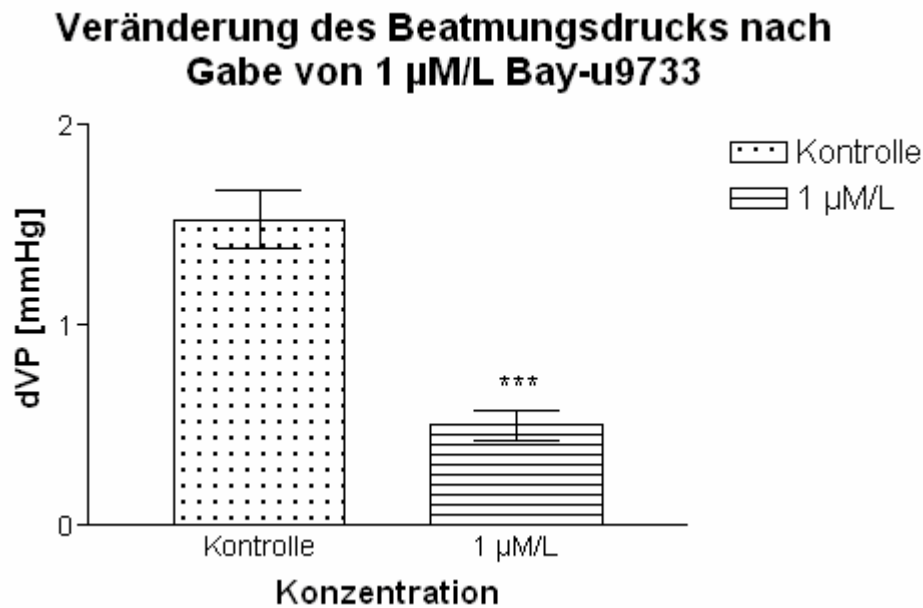


Abbildung 19: Veränderung des Beatmungsdrucks (dVP) nach Gabe von 1 $\mu\text{M/L}$ Bay-u9773.

Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 $\mu\text{g/ml}$) als Kontrolle und in Anwesenheit von Bay-u9773 ab dem Zeitpunkt 90 min perfundiert. Bay-u9773 wurde in einer Konzentration von 1 $\mu\text{M/L}$ eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 $\mu\text{M/L}$ Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. $n = 5$ unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der mit Bay-u9773 inkubierten Lungen zu den Kontrolllungen: *** $p < 0,001$

5.5 Veränderungen des Gewichts LPS- stimulierter Rattenlungen unter Einfluß von Lipoxygenase-Inhibitoren

Die Gabe von 1 $\mu\text{M/L}$ CDC verursachte keine Hemmung, sondern einen im Vergleich zur Kontrollgruppe höheren, nicht signifikanten Gewichtsanstieg des Lungenpräparates. Die Erhöhung der Dosis allerdings resultierte in einer signifikanten ($p < 0,05$) Verminderung der Gewichtszunahme (Abb. 20). Die selektive Hemmung der 12-LOX und der 15-LOX durch Gossypol resultierte bei beiden verwendeten Dosierungen in einer signifikanten ($p < 0,05$) Verringerung der Gewichtszunahme (Abb. 21).

Veränderung des Gewichts nach Gabe von 1 $\mu\text{M/L}$, 5 $\mu\text{M/L}$ und 20 $\mu\text{M/L}$ CDC

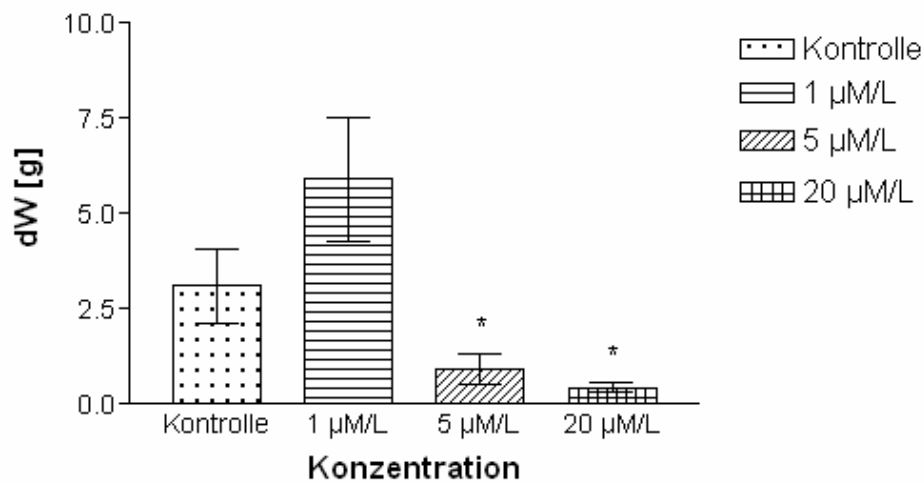


Abbildung 20: Veränderung des Gewichts (dW) nach Gabe von 1 $\mu\text{M/L}$, 5 $\mu\text{M/L}$ und 20 $\mu\text{M/L}$ CDC. Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 $\mu\text{g/ml}$) als Kontrolle und in Anwesenheit von CDC ab dem Zeitpunkt 110 min perfundiert. CDC wurde in den Konzentrationen 1 $\mu\text{M/L}$, 5 $\mu\text{M/L}$ und 20 $\mu\text{M/L}$ eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 $\mu\text{M/L}$ Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. $n = 5$ unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der mit CDC inkubierten Lungen zu den Kontrolllungen: * $p < 0,05$

Veränderung des Gewichts nach Gabe von 0,5 $\mu\text{M/L}$ und 1 $\mu\text{M/L}$ Gossypol

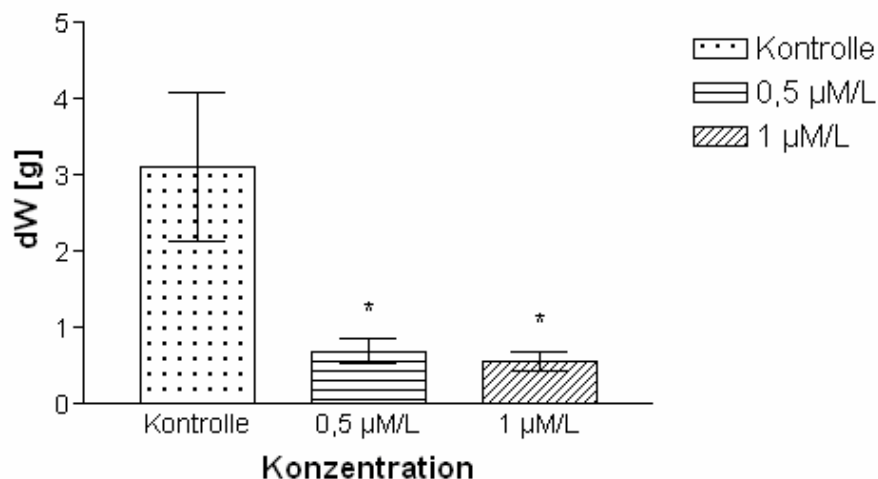


Abbildung 21: Veränderung des Gewichts (dW) nach Gabe von 0,5 $\mu\text{M/L}$ und 1 $\mu\text{M/L}$ Gossypol. Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 $\mu\text{g/ml}$) als Kontrolle und in Anwesenheit von Gossypol ab dem Zeitpunkt 110 min perfundiert. Gossypol wurde in den Konzentrationen 0,5 $\mu\text{M/L}$ und 1 $\mu\text{M/L}$ eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 $\mu\text{M/L}$ Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. $n = 5$ unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der mit Gossypol inkubierten Lungen zu den Kontrolllungen: * $p < 0,05$

Die Hemmung der 5-LOX mittels Kaffeesäure bewirkte - wie in Abbildung 22 dargestellt - in der Dosierung 1 $\mu\text{M/L}$ keine signifikant geringere Gewichtszunahme im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Erhöhung der Dosis auf 10 $\mu\text{M/L}$ und 20 $\mu\text{M/L}$ verringerte die Gewichtszunahme, war aber nicht signifikant im Hinblick auf die Kontrollgruppe. In Abbildung 23 ist dargestellt, daß durch die Gabe von Baicalein ebenfalls keine signifikante Verringerung der Gewichtszunahme erzielt werden konnte.

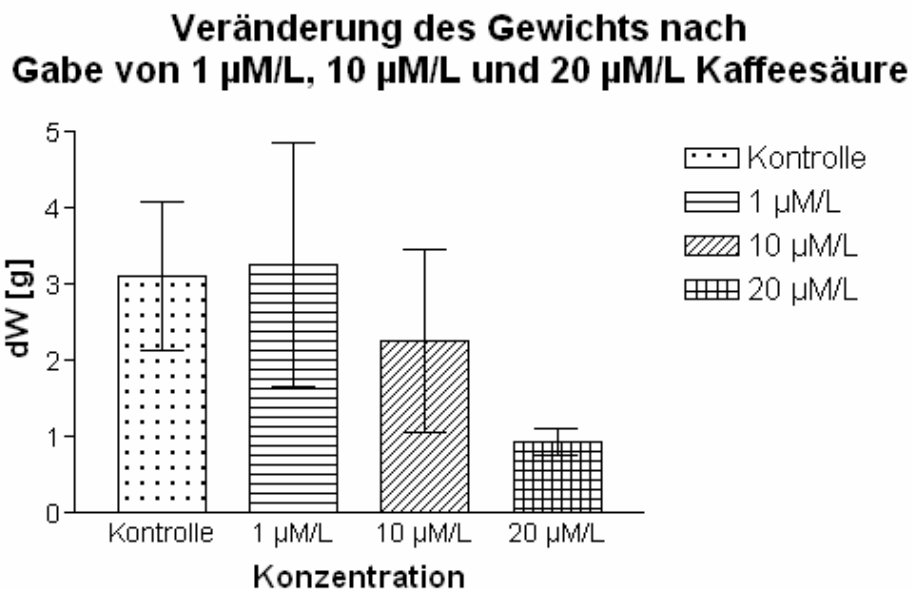


Abbildung 22: Veränderung des Gewichts (dW) nach Gabe von 1 $\mu\text{M/L}$, 10 $\mu\text{M/L}$ und 20 $\mu\text{M/L}$ Kaffeesäure.

Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 $\mu\text{g/ml}$) als Kontrolle und in Anwesenheit von Kaffeesäure ab dem Zeitpunkt 90 min perfundiert. Kaffeesäure wurde in den Konzentrationen 1 $\mu\text{M/L}$, 10 $\mu\text{M/L}$ und 20 $\mu\text{M/L}$ eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 $\mu\text{M/L}$ Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. $n = 5$ unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe.

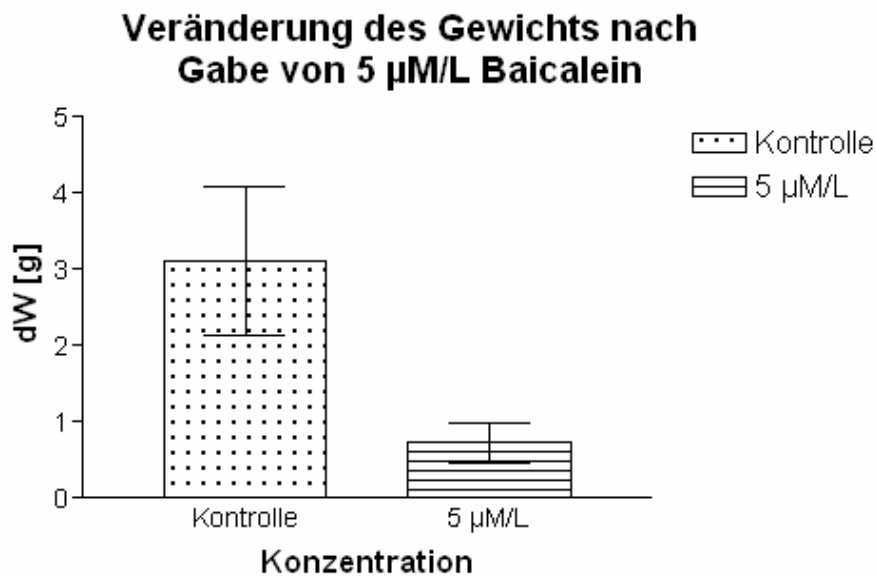


Abbildung 23: Veränderung des Gewichts (dW) nach Gabe von 5 $\mu\text{M/L}$ Baicalein.

Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 $\mu\text{g/ml}$) als Kontrolle und in Anwesenheit von Baicalein ab dem Zeitpunkt 90 min perfundiert. Baicalein wurde in einer Konzentration von 5 $\mu\text{M/L}$ eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 $\mu\text{M/L}$ Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. $n = 5$ unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe.

Durch die Inkubation der isoliert perfundierten Rattenlunge mit den beiden selektiven Hemmstoffen des 5-Lipoxygenase aktivierenden Protein (FLAP) konnte eine wesentlich geringere Gewichtszunahme nach der Gabe der AA erreicht werden. Die Wirksamkeit von MK-886 setzte allerdings erst ab einer Konzentration von 5 $\mu\text{M/L}$ ein; die Inkubation mit 1 $\mu\text{M/L}$ zeigte einen innerhalb des Standardfehlers liegenden Anstieg des Lungengewichts (Abb. 24). Die Verringerung des Gewichtsanstiegs war bei keiner der verwendeten Dosierungen von MK-886 signifikant im Vergleich zu Kontrollgruppe. Dies ist auf die Streuung der Daten in der Kontrollgruppe zurückzuführen. Die Zugabe von 30 $\mu\text{M/L}$ L-655,238 in das Perfusat bewirkte einen signifikant ($p < 0,05$) geringeren Anstieg des Gewichts (Abb. 25).

Veränderung des Gewichts nach Gabe von 1 $\mu\text{M/L}$ und 5 $\mu\text{M/L}$ MK-886

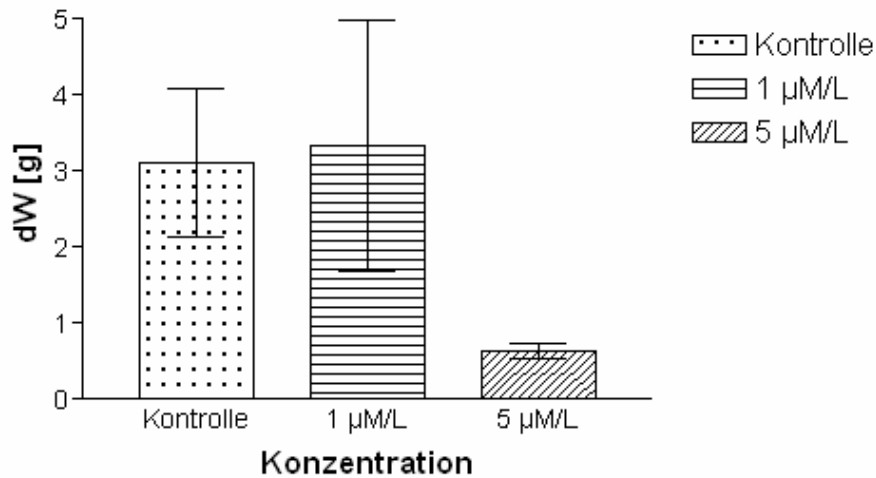


Abbildung 24: Veränderung des Gewichts (dW) nach Gabe von 1 $\mu\text{M/L}$ und 5 $\mu\text{M/L}$ MK-886.

Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 $\mu\text{g/ml}$) als Kontrolle und in Anwesenheit von MK-886 ab dem Zeitpunkt 90 min perfundiert. MK-886 wurde in den Konzentrationen 1 $\mu\text{M/L}$ und 5 $\mu\text{M/L}$ eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 $\mu\text{M/L}$ Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe.

Veränderung des Gewichts nach Gabe von 30 $\mu\text{M/L}$ L-655,238

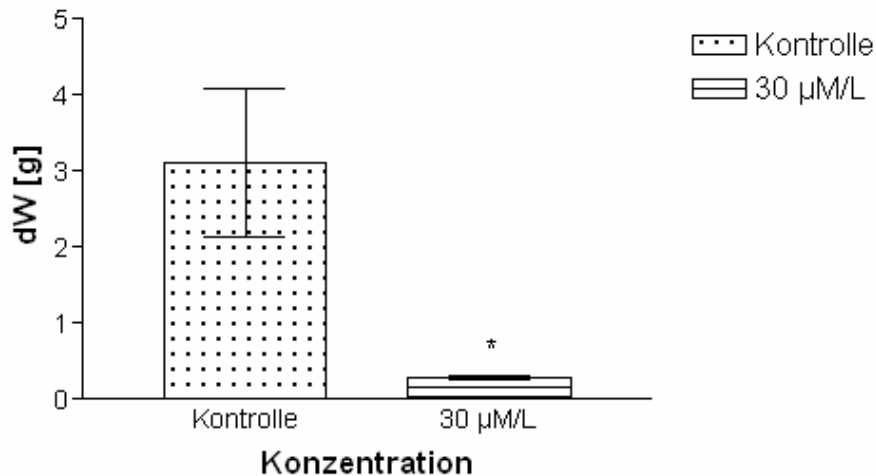


Abbildung 25: Veränderung des Gewichts (dW) nach Gabe von 30 $\mu\text{M/L}$ L-655,238.

Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 $\mu\text{g/ml}$) als Kontrolle und in Anwesenheit von L-655,238 ab dem Zeitpunkt 90 min perfundiert. L-655,238 wurde in einer Konzentration von 30 $\mu\text{M/L}$ eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 $\mu\text{M/L}$ Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der mit L-655,238 inkubierten Lungen zu den Kontrolllungen: * p<0,05

Die Antagonisierung des Cys LT₁- und des Cys LT₂-Rezeptors mittels Bay-u9773 in der Konzentration 1 µM/L bewirkte eine signifikant ($p < 0,05$) geringere Gewichtszunahme nach AA-Gabe als in den Kontrollversuchen (Abb. 26).

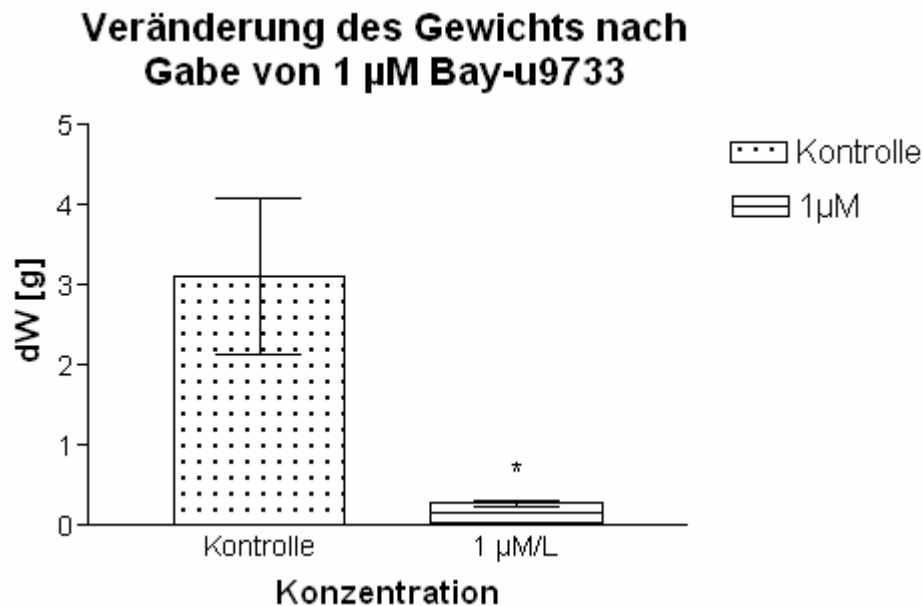


Abbildung 26: Veränderung des Gewichts (dW) nach Gabe von 1 µM/L Bay-u9773.

Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 µg/ml) als Kontrolle und in Anwesenheit von Bay-u9773 ab dem Zeitpunkt 90 min perfundiert. Bay-u9773 wurde in einer Konzentration von 1 µM/L eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 µM/L Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. $n = 5$ unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der mit Bay-u9773 inkubierten Lungen zu den Kontrolllungen: * $p < 0,05$

5.6 Ergebnisse der ELISAs

5.6.1 Thromboxan

Im Verlauf der Kontrollversuche, die ohne die Zugabe von Hemmstoffen der LOX-Isoenzyme bzw. Rezeptorantagonisten erfolgten, war die Thromboxankonzentration im Perfusat während des zweistündigen Verlaufs des Versuchs nur gering. Sie betrug im Mittelwert 218,80 pg/ml (Tab. 5c). Nach der Zugabe von Arachidonsäure kam es zu einem starken Anstieg der Thromboxankonzentration im Perfusat. Zwei Minuten nach der

Zugabe betrug die Thromboxankonzentration beinahe das zehnfache ihres Ausgangswerts (1932 pg/ml). Fünf Minuten nach der AA-Gabe erreichte die Thromboxankonzentration 6637 pg/ml im Mittelwert. Die Versuche mit den LOX-Isoenzym-Hemmstoffen ergaben ein weitgehend einheitliches Bild. Bis zum Zeitpunkt $t=120$ min war die Thromboxankonzentration gering. Sie befand sich mit Werten zwischen 98 pg/ml und 401 pg/ml auf vergleichbarem Niveau mit der Thromboxankonzentration der Kontrollversuche.

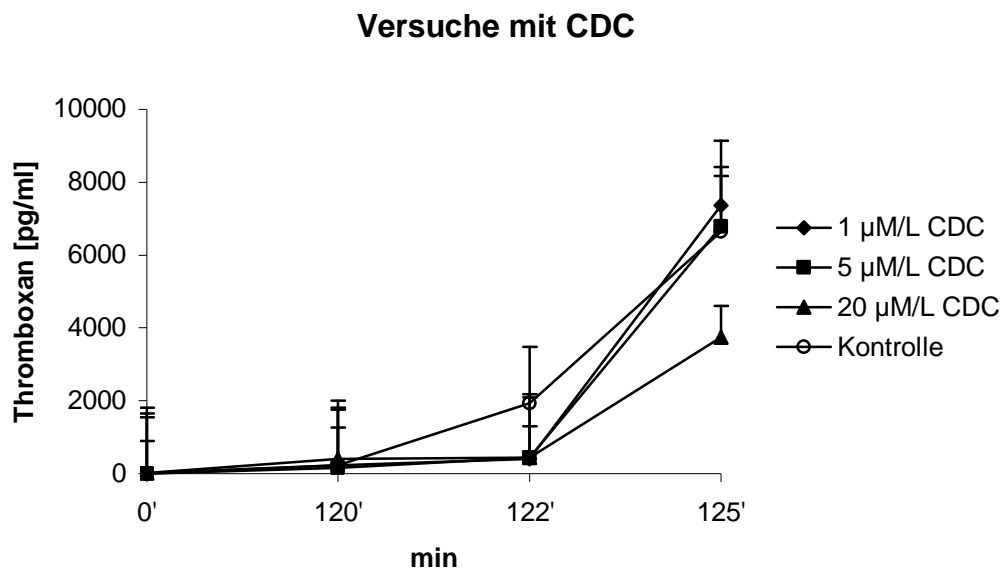


Abbildung 27: Verlauf des Thromboxangehalts im Perfusat in pg/ml nach Gabe von 1 µM/L, 5 µM/L und 20 µM/L CDC.

Der Thromboxangehalt wurde zu den Zeitpunkten 0 min, 120 min, 122 min und 125 min gemessen. Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 µg/ml) als Kontrolle und in Anwesenheit von CDC ab dem Zeitpunkt 90 min perfundiert. CDC wurde in den Konzentrationen 1 µM/L, 5 µM/L und 20 µM/L eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 µM/L Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM des Thromboxangehaltes zum jeweiligen Zeitpunkt der Probenahme. $n = 5$ unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe.

Versuche mit Kaffeesäure

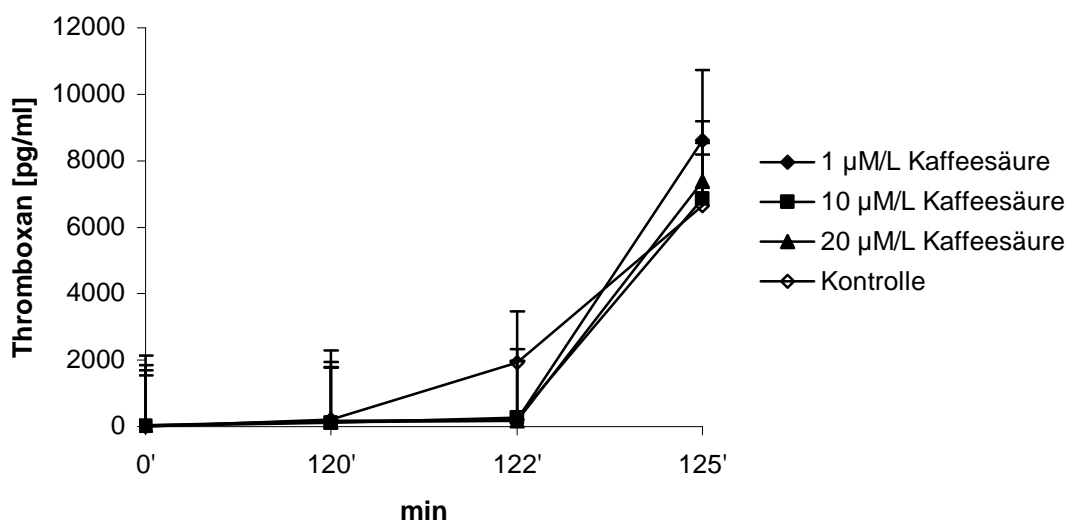


Abbildung 28: Verlauf des Thromboxangehalts im Perfusat in pg/ml nach Gabe von 1 µM/L, 10 µM/L und 20 µM/L Kaffeesäure.

Der Thromboxangehalt wurde zu den Zeitpunkten 0 min, 120 min, 122 min und 125 min gemessen. Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 µg/ml) als Kontrolle und in Anwesenheit von Kaffeesäure ab dem Zeitpunkt 90 min perfundiert. Kaffeesäure wurde in den Konzentrationen 1 µM/L, 10 µM/L und 20 µM/L eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 µM/L Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM des Thromboxangehaltes zum jeweiligen Zeitpunkt der Probenahme. $n = 5$ unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe.

Nach der Zugabe von AA stieg die Thromboxankonzentration zum Zeitpunkt $t=122$ min weniger stark an als bei den Kontrollversuchen. Zum Zeitpunkt $t=125$ min erreichte die Thromboxankonzentration das Niveau der Kontrollversuche und überschritt dieses bei vielen Substanzen (L-655,238, Baicalein, Bay-u9773)(Abb. 29 und 30). Die Veränderungen des Thromboxangehaltes im Perfusat waren bei den untersuchten Lipoxygenase-Inhibitoren CDC (Abb. 27), Gossypol, Kaffeesäure (Abb. 28) und MK-886 nicht signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Thromboxangehalt zum Zeitpunkt $t=125$ min war mit 11920 pg/ml bei den Versuchen mit 5 µM/L Baicalein signifikant ($p<0,05$) höher im Vergleich zu den Kontrollversuchen; hier lag der Thromboxangehalt bei 6637 pg/ml.

Eine Ausnahme im recht einheitlichen Ergebnisbild sind die Versuche mit L-655,238 und Bay-u9773.

In der Versuchsgruppe mit 30 $\mu\text{M/L}$ L-655,238 kam es vor der Zugabe von AA zu einem Anstieg der Thromboxankonzentration im Plasma (1432 pg/ml bei $t=120$ min). Zwei Minuten nach der Zugabe von AA stieg die Konzentration von Thromboxan nur geringgradig auf einen Mittelwert von 1590 pg/ml. Dieser Wert ist vergleichbar mit der Thromboxankonzentration in den Kontrollversuchen zum Zeitpunkt $t=122$ min (1932 pg/ml). Aus der Literatur ergaben sich keine Hinweise auf eine Membran- oder Zellschädigung durch L-655,238. Zum Zeitpunkt $t=125$ erfolgte ein - im Vergleich zur Kontrolle - signifikanter ($p<0,001$) Anstieg des Thromboxangehalts auf 24700 pg/ml (Abb. 29).

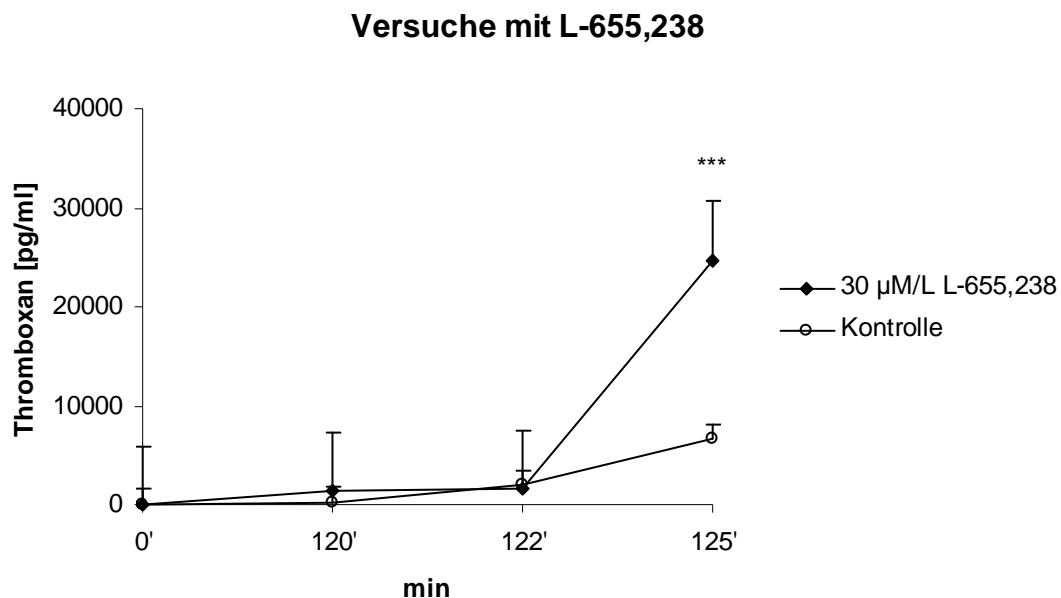


Abbildung 29: Verlauf des Thromboxangehalts im Perfusat in pg/ml nach Gabe von 30 $\mu\text{M/L}$ L-655,238.

Der Thromboxangehalt wurde zu den Zeitpunkten 0 min, 120 min, 122 min und 125 min gemessen. Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 $\mu\text{g/ml}$) als Kontrolle und in Anwesenheit von L-655,238 ab dem Zeitpunkt 90 min perfundiert. L-655,238 wurde in einer Konzentration von 30 $\mu\text{M/L}$ eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 $\mu\text{M/L}$ Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM des Thromboxangehaltes zum jeweiligen Zeitpunkt der Probennahme. $n = 5$ unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der mit L-655,238 inkubierten Lungen zu den Kontrolllungen: *** $p<0,001$

Die Thromboxankonzentration der Versuche mit 1 $\mu\text{M/L}$ Bay-u9773 befand sich zum Zeitpunkt $t=120$ min auf vergleichbarem Niveau wie in den Kontrollversuchen und den Versuchen mit den LOX-Isoenzym-Hemmstoffen. Allerdings zeigte sich nach der Zugabe

von Arachidonsäure in das Perfusat keine Hemmung der Thromboxanfreisetzung. Die Thromboxankonzentration stieg auf vergleichbar hohe Werte wie in den Kontrollversuchen (6637 pg/ml). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollversuchen und den Versuchen mit Bay-u9773 (Abb. 30).

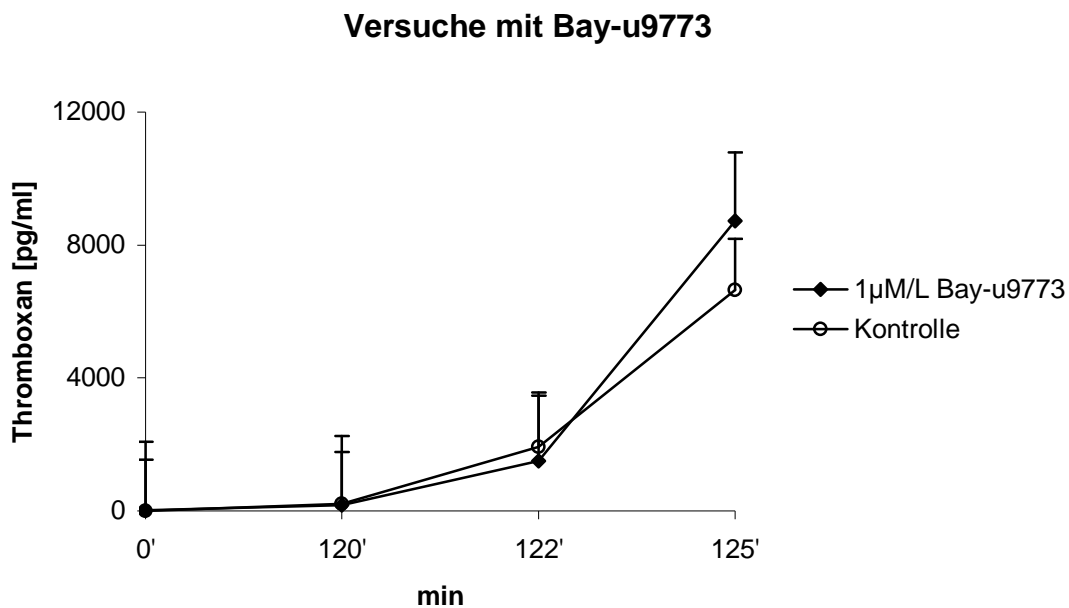


Abbildung 30: Verlauf des Thromboxangehalts im Perfusat in pg/ml nach Gabe von 1 µM/L Bay-u9773.

Der Thromboxangehalt wurde zu den Zeitpunkten 0 min, 120 min, 122 min und 125 min gemessen. Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 µg/ml) als Kontrolle und in Anwesenheit von Bay-u9773 ab dem Zeitpunkt 90 min perfundiert. Bay-u9773 wurde in einer Konzentration von 1 µM/L eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 µM/L Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM des Thromboxangehaltes zum jeweiligen Zeitpunkt der Probennahme. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe.

5.6.2 PGE₂

In Analogie zu den Ergebnissen der Kontrollversuche zur Thromboxankonzentration zeigte auch die ELISA-Messung des Prostaglandins E₂ eine nur geringe Perfusatkonzentration nach der zweistündigen Laufzeit des Versuchs (Mittelwert 430 pg/ml). Das „priming“ der isoliert perfundierten Rattenlunge mit 10 µg/ml LPS ohne Zugabe von 10 µM/L Arachidonsäure zum Zeitpunkt t=120 min führte lediglich zu einem geringen Anstieg der PGE₂-Konzentration (430 pg/ml).

Ebenso erreichten auch die PGE₂-Perfusatkonzentrationen der LOX-Isoenzymhemmstoff-Versuche zum Zeitpunkt t=120 min nur einen geringen Wert (134 pg/ml - 727 pg/ml). Desweiteren fiel der PGE₂-Konzentrationsanstieg im Perfusat zum Zeitpunkt t=122 min wesentlich niedriger aus als in den Kontrollversuchen.

Bei den Versuchen mit 5 µM/L und 20 µM/L CDC zeigte sich, daß der Perfusatgehalt von PGE₂ zum Zeitpunkt t=125 geringer als bei den Kontrollversuchen war. Bei der Konzentration von 1 µM/L CDC war der Gehalt an PGE₂ signifikant (p<0,05) höher als in den Kontrollen (Abb. 31). Die Versuche mit Baicalein (p<0,05), Kaffeesäure (p<0,05) und L 655,238 (p<0,01) zeigten einen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhten Anstieg des Gehalts von PGE₂.

Die Veränderungen des PGE₂-Gehalts waren nicht signifikant bei den Versuchen mit Gossypol (Abb. 32), MK-886 und Bay-u9773.

Versuche mit CDC

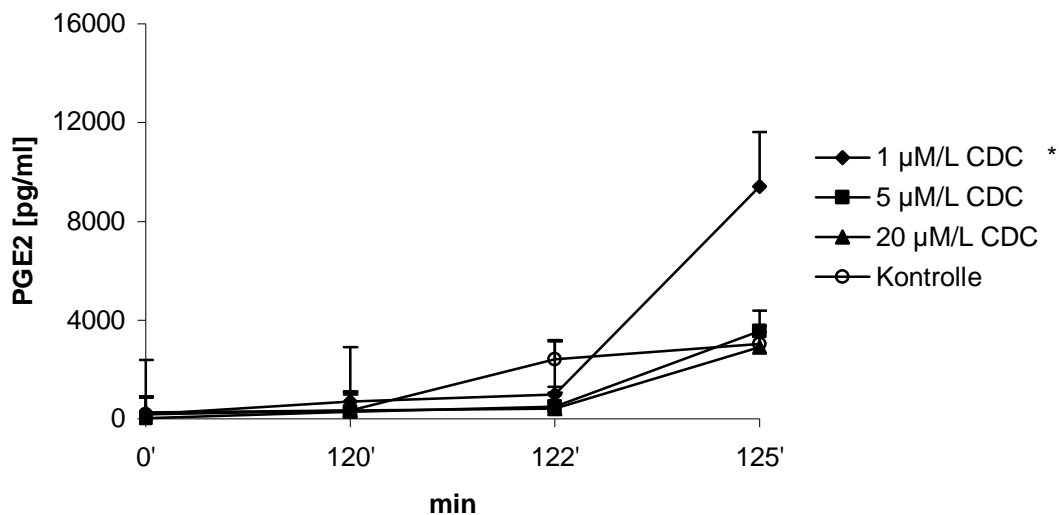


Abbildung 31: Verlauf des Gehalts von Prostaglandin E₂ im Perfusat in pg/ml nach Gabe von 1 µM/L, 5 µM/L und 20 µM/L CDC.

Der Gehalt von Prostaglandin E₂ wurde zu den Zeitpunkten 0 min, 120 min, 122 min und 125 min gemessen. Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 µg/ml) als Kontrolle und in Anwesenheit von CDC ab dem Zeitpunkt 110 min perfundiert. CDC wurde in den Konzentrationen 1 µM/L, 5 µM/L und 20 µM/L eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 µM/L Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM des Gehalts von Prostaglandin E₂ zum jeweiligen Zeitpunkt der Probennahme. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der mit CDC inkubierten Lungen zu den Kontrolllungen: * p<0,05

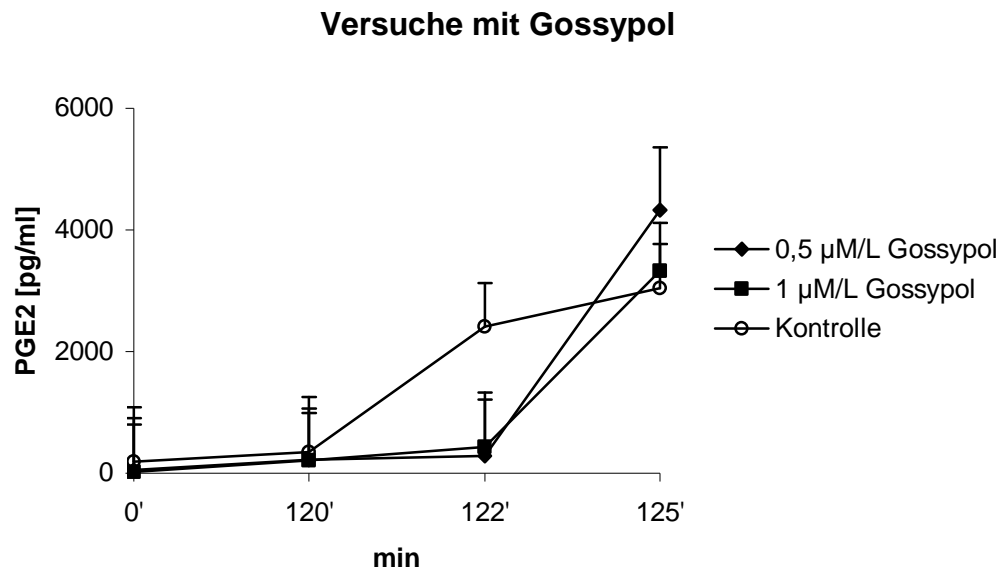


Abbildung 32: Verlauf des Gehalts von Prostaglandin E₂ im Perfusat in pg/ml nach Gabe von 0,5 µM/L und 1 µM/L Gossypol.

Der Gehalt von Prostaglandin E₂ wurde zu den Zeitpunkten 0 min, 120 min, 122 min und 125 min gemessen. Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 µg/ml) als Kontrolle und in Anwesenheit von Gossypol ab dem Zeitpunkt 90 min perfundiert. Gossypol wurde in den Konzentrationen 0,5 µM/L und 1 µM/L eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 µM/L Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM des Gehalts von Prostaglandin E₂ zum jeweiligen Zeitpunkt der Probenahme. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe.

5.6.3 6-keto-PGF_{1α}

Zum Ende der zweistündigen Inkubationsphase betrug die Perfusatkonzentration von 6-keto-PGF_{1α} bei den Kontrollversuchen ohne Gram-negatives „priming“ im Mittelwert 1910 pg/ml. Die Zugabe von LPS verursachte eine Erhöhung der Konzentration auf 5297 pg/ml (Mittelwert). Bis zum Zeitpunkt t=125 min stieg die Perfusatkonzentration von 6-keto-PGF_{1α} bis auf einen Wert von 66630 pg/ml an. Bei den Versuchen mit den Hemmstoffen der LOX-Isoenzyme befand sich am Ende der zweistündigen Inkubationsphase die Konzentration von 6-keto-PGF_{1α} mit Werten zwischen 3069 pg/ml und 7150 pg/ml auf vergleichbarem Niveau in Bezug auf die Kontrollversuche. Durch die Zugabe von AA ins Perfusat kam es hier in Abhängigkeit von der Dosis zu geringeren

Anstiegen der Konzentration von 6-keto-PGF_{1α} (5285 pg/ml-27830 pg/ml) zum Zeitpunkt t=120 min.

Allerdings zeigte sich, daß zum Zeitpunkt t=125 min bei beinahe allen Versuchen der Perfusatgehalt von 6-keto-PGF_{1α} erhöht war: Bei den Versuchen mit 1 µM/L Kaffeesäure (p<0,001), L 655,235 (p<0,001) und MK-886 (p<0,05) war dieser Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant (Abb. 33 und Abb. 34); bei den Versuchen mit Baicalein (Abb. 35), Bay-u9773, 20 µM/L Kaffeesäure, 1 µM/L CDC, 5 µM/L CDC und Gossypol war der Anstieg des Gehaltes von 6-keto-PGF_{1α} im Perfusat nicht signifikant.

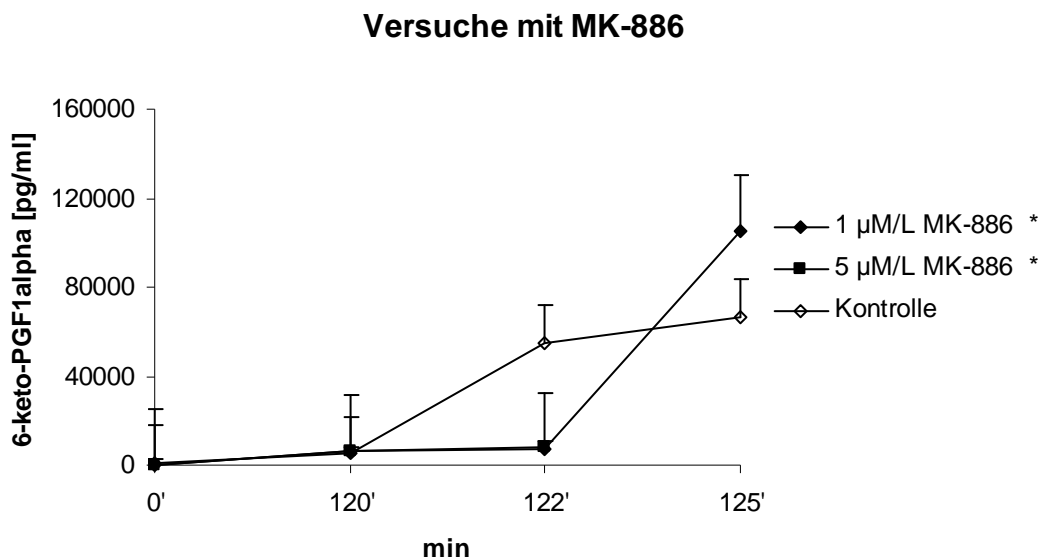


Abbildung 33: Verlauf des Gehalts von 6-keto-PGF_{1α} im Perfusat in pg/ml nach Gabe von 1 µM/L und 5 µM/L MK-886.

Der Gehalt von 6-keto-PGF_{1α} wurde zu den Zeitpunkten 0 min, 120 min, 122 min und 125 min gemessen. Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 µg/ml) als Kontrolle und in Anwesenheit von MK-886 ab dem Zeitpunkt 90 min perfundiert. MK-886 wurde in den Konzentrationen 1 µM/L und 5 µM/L eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 µM/L Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM des Gehalts von 6-keto-PGF_{1α} zum jeweiligen Zeitpunkt der Probenahme. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der mit MK-886 inkubierten Lungen zu den Kontrolllungen: * p<0,05

Versuche mit L-655,238

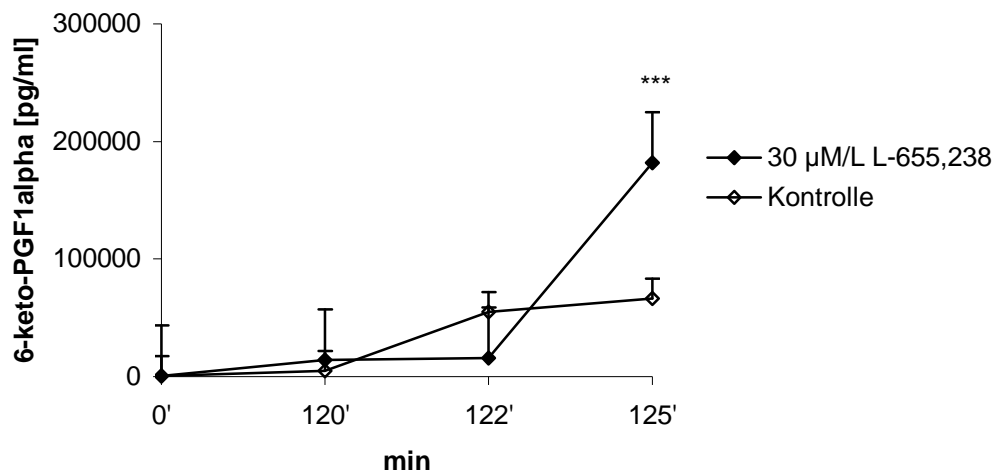


Abbildung 34: Verlauf des Gehalts von 6-keto-PGF_{1α} im Perfusat in pg/ml nach Gabe von 30 µM/L L-655,238.

Der Gehalt von 6-keto-PGF_{1α} wurde zu den Zeitpunkten 0 min, 120 min, 122 min und 125 min gemessen. Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 µg/ml) als Kontrolle und in Anwesenheit von L-655,238 ab dem Zeitpunkt 90 min perfundiert. L-655,238 wurde in einer Konzentration von 30 µM/L eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 µM/L Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM des Gehalts von 6-keto-PGF_{1α} zum jeweiligen Zeitpunkt der Probenahme. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der mit L-655,238 inkubierten Lungen zu den Kontrolllungen: *** p<0,001

Versuche mit Baicalein

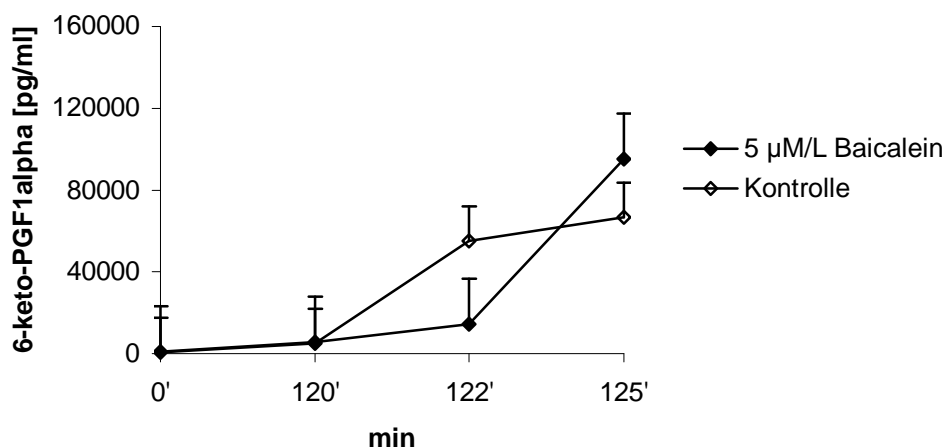


Abbildung 35: Verlauf des Gehalts von 6-keto-PGF_{1α} im Perfusat in pg/ml nach Gabe von 5 µM/L Baicalein.

Der Gehalt von 6-keto-PGF_{1α} wurde zu den Zeitpunkten 0 min, 120 min, 122 min und 125 min gemessen. Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 µg/ml) als Kontrolle und in Anwesenheit von Baicalein ab dem Zeitpunkt 90 min perfundiert. Baicalein wurde in einer Konzentration von 5 µM/L eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 µM/L Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM des Gehalts von 6-keto-PGF_{1α} zum jeweiligen Zeitpunkt der Probenahme. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe.

Lediglich bei den Versuchen mit 10 $\mu\text{M/L}$ Kaffeesäure und 20 $\mu\text{M/L}$ CDC erwies sich der Perfusatgehalt von 6-keto-PGF_{1 α} ohne signifikanten Unterschied verringert im Vergleich zur Kontrollgruppe.

5.6.4 LTC₄

Die Messung der LTC₄-Perfusatkonzentration in den Kontrollversuchen zeigte keine messbaren Gehalte von LTC₄. Auch nach der Zugabe von Arachidonsäure wurde zum Zeitpunkt t=125 min kein Anstieg der LTC₄-Konzentration gemessen. Das gleiche Ergebnis fand sich bei den Versuchen mit 20 $\mu\text{M/L}$ CDC. Hier lagen zu keinem Zeitpunkt meßbare LTC₄-Konzentrationen vor.

Ein weitgehend einheitliches Bild zeigte sich bei den anderen untersuchten Substanzen. Bei Inkubation mit Gossypol, Kaffeesäure und Bay-u9773 (Abb. 36) war die LTC₄-Perfusatkonzentration mit Werten zwischen 0 pg/ml und 74 pg/ml nur sehr gering. Die Zugabe der Arachidonsäure verursachte einen Anstieg der LTC₄-Perfusatkonzentration auf Werte zwischen 497 pg/ml und 1763 pg/ml zum Zeitpunkt t=125 min.

Nach der Inkubation mit MK-886 und Baicalein war bereits zum Zeitpunkt t=120 min ein Anstieg der LTC₄-Konzentration auf Werte von 100 pg/ml bis 164 pg/ml zu verzeichnen. Die Zugabe von Arachidonsäure löste sodann einen weiteren Anstieg des LTC₄-Gehaltes aus (204 pg/ml - 371 pg/ml) (Abb. 37).

Gehalt von LTC₄ in pg/ml nach Gabe von 1 µM/L Bay-u9773

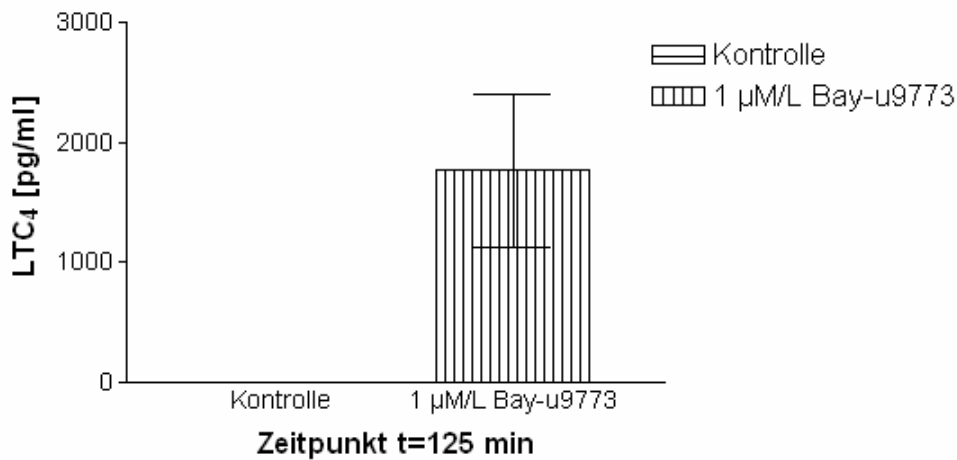


Abbildung 36: Veränderung des Gehalts von LTC₄ im Perfusat in pg/ml nach Gabe von 1 µM/L Bay-u9773.

Der Gehalt von LTC₄ wurde zum Zeitpunkt 125 min gemessen. Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 µg/ml) als Kontrolle und in Anwesenheit von Bay-u9773 ab dem Zeitpunkt 90 min perfundiert. Bay-u9773 wurde in einer Konzentration von 1 µM/L eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 µM/L Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM des Gehalts von LTC₄ zum jeweiligen Zeitpunkt der Probennahme. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe.

Gehalt von LTC₄ in pg/ml nach Gabe von 5 µM/L MK-886

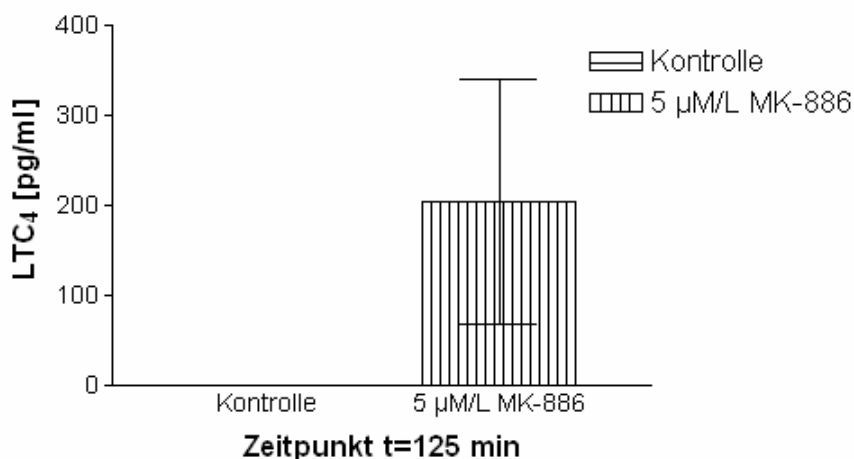


Abbildung 37: Veränderung des Gehalts von LTC₄ im Perfusat in pg/ml nach Gabe von 5 µM/L MK-886.

Der Gehalt von LTC₄ wurde zum Zeitpunkt 125 min gemessen. Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 µg/ml) als Kontrolle und in Anwesenheit von MK-886 ab dem Zeitpunkt 90 min perfundiert. MK-886 wurde in einer Konzentration von 5 µM/L eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 µM/L Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM des Gehalts von LTC₄ zum jeweiligen Zeitpunkt der Probennahme. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe.

5.6.5 LTE₄

Im Rahmen der Kontrollversuche wurde zum Zeitpunkt t=120 min eine LTE₄-Konzentration von 864 pg/ml (Mittelwert) gemessen. Nach der Zugabe der Arachidonsäure stieg der Gehalt von LTE₄ auf 1575 pg/ml im Mittelwert (Abb. 38).

Gehalt von LTE₄ in pg/ml in den Kontrollversuchen zum Zeitpunkt t=120 min und t=125 min

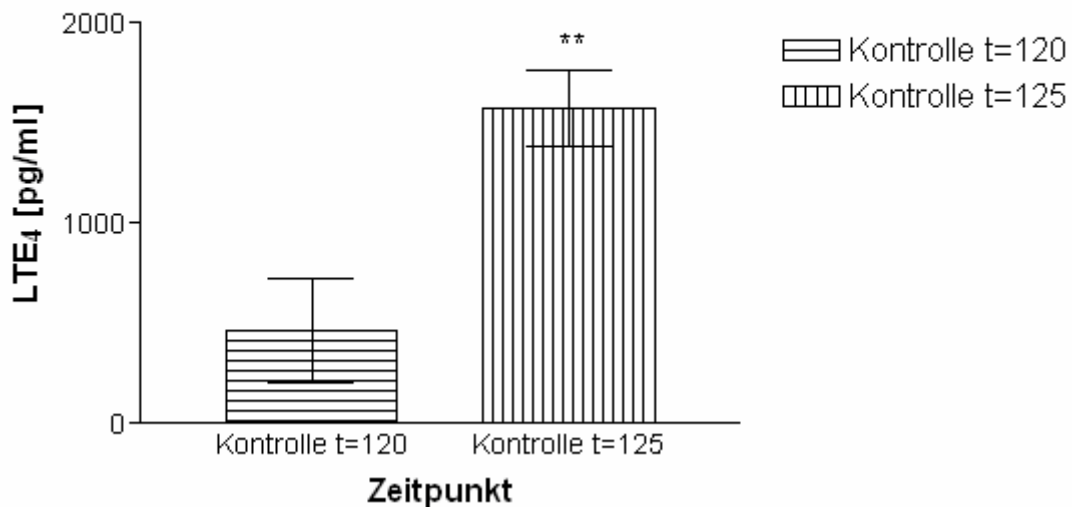


Abbildung 38: Veränderung des Gehalts von LTE₄ im Perfusat in pg/ml nach Gabe von 10 µM/L Arachidonsäure.

Der Gehalt von LTE₄ wurde zum Zeitpunkt 120 min und 125 min gemessen. Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 µg/ml) als Kontrolle perfundiert. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 µM/L Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM des Gehalts von LTE₄ zum jeweiligen Zeitpunkt der Probenahme. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der Lungen ohne Zugabe von Arachidonsäure zu den Lungen nach Arachidonsäuregabe: ** p<0,01

Bei den Versuchen mit 20 µM/L CDC zeigte sich zum Zeitpunkt t=125 ein signifikant (p<0,01) geringerer Gehalt von LTE₄ im Perfusat. Dies ist in Abbildung 39 dargestellt. Zu einer Steigerung der LTE₄-Konzentration nach Zugabe der Arachidonsäure kam es wie in den Kontrollversuchen bei den Versuchen mit Gossypol und Bay-u9773. Die LTE₄-Perfusatkonzentration zum Zeitpunkt t=120 min lag allerdings bei den mit CDC (Abb. 39) und Gossypol inkubierten Versuchen unter dem Wert der Kontrollversuche. Die Perfusatkonzentration des LTE₄ zum Zeitpunkt t=125 min fiel in der Versuchsgruppe mit 1 µM/L Gossypol signifikant (p<0,01) geringer aus, als in den Kontrollversuchen.

Bei den Versuchen mit Bay-u9773 zeigte sich zum Ende der zweistündigen Inkubationszeit ein außerordentlich hoher Gehalt von LTE_4 im Perfusat (24373 pg/ml). Dieser erfuhr nach der Zugabe von Arachidonsäure eine weitere signifikante ($p < 0,001$) Steigerung auf 37210 pg/ml (Abb. 40).

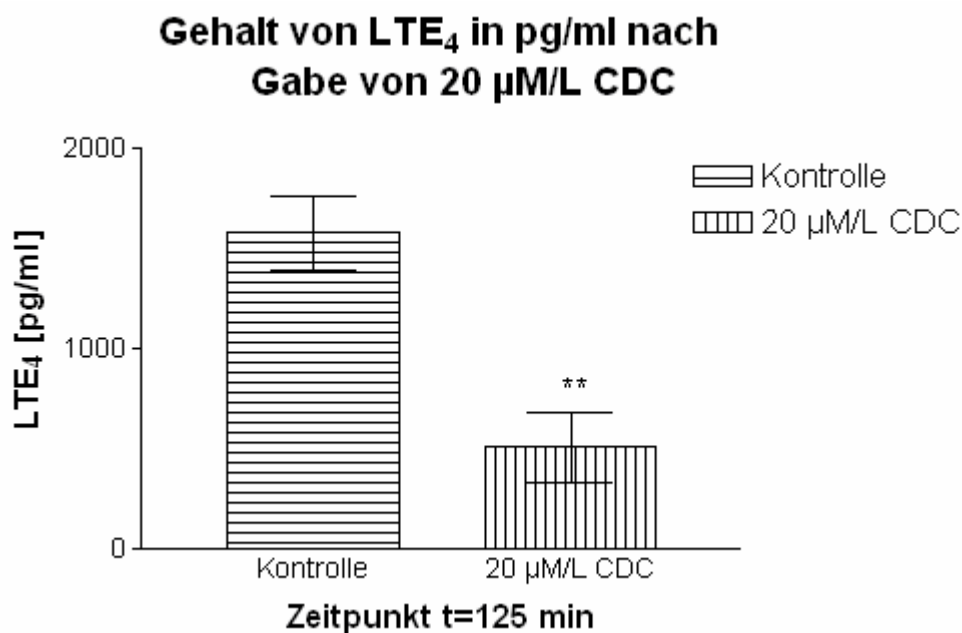


Abbildung 39: Veränderung des Gehalts von LTE_4 im Perfusat in pg/ml nach Gabe von 20 $\mu\text{M/L}$ CDC.

Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 $\mu\text{g/ml}$) als Kontrolle und in Anwesenheit von CDC ab dem Zeitpunkt 110 min perfundiert. CDC wurde in einer Konzentration von 20 $\mu\text{M/L}$ eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 $\mu\text{M/L}$ Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. $n = 5$ unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der mit CDC inkubierten Lungen zu den Kontrolllungen: ** $p < 0,01$

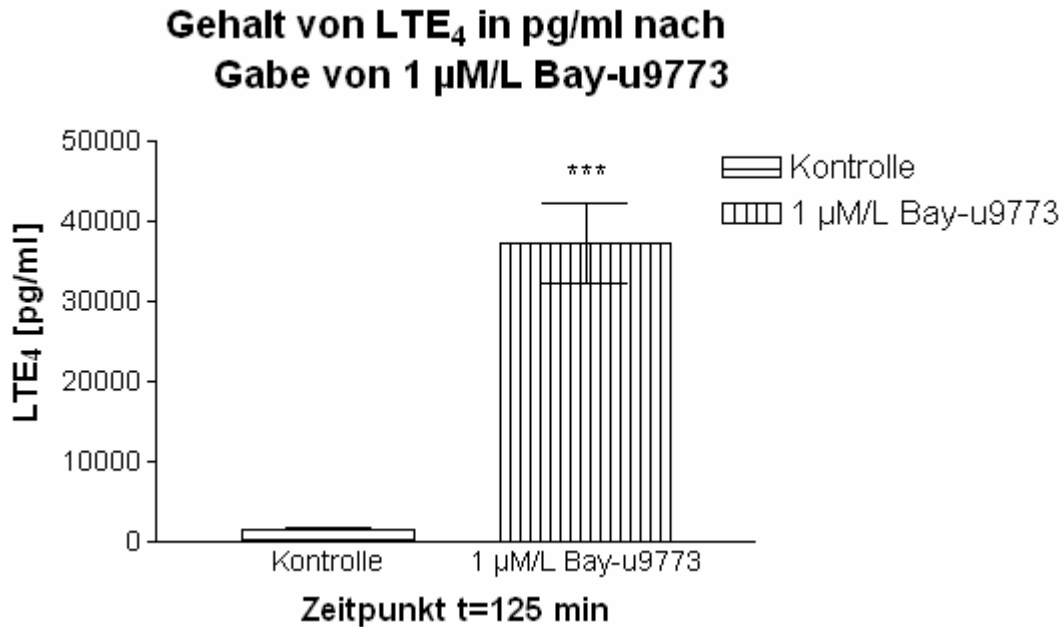


Abbildung 40: Veränderung des Gehalts von LTE₄ im Perfusat in pg/ml nach Gabe von 1 µM/L Bay-u9773.

Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 µg/ml) als Kontrolle und in Anwesenheit von Bay-u9773 ab dem Zeitpunkt 90 min perfundiert. Bay-u9773 wurde in einer Konzentration von 1 µM/L eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 µM/L Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der mit Bay-u9773 inkubierten Lungen zu den Kontrolllungen: *** p<0,001

Nach der Inkubation mit Kaffeesäure, Baicalein und MK-886 befand sich der LTE₄-Gehalt im Perfusat zum Zeitpunkt t=120 auf einem vergleichbarem Niveau mit den Kontrollversuchen und den anderen Hemmstoffversuchen.

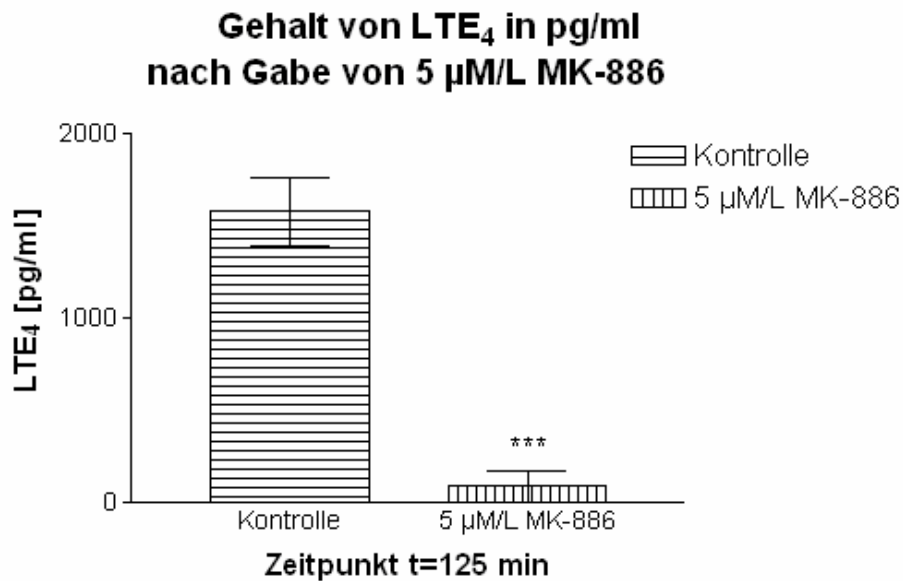


Abbildung 41a: Veränderung des Gehalts von LTE₄ im Perfusat in pg/ml nach Gabe von 5 µM/L MK-886.

Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 µg/ml) als Kontrolle und in Anwesenheit von MK-886 ab dem Zeitpunkt 90 min perfundiert. MK-886 wurde in einer Konzentration von 5 µM/L eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 µM/L Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der mit MK-886 inkubierten Lungen zu den Kontrolllungen: *** p<0,001

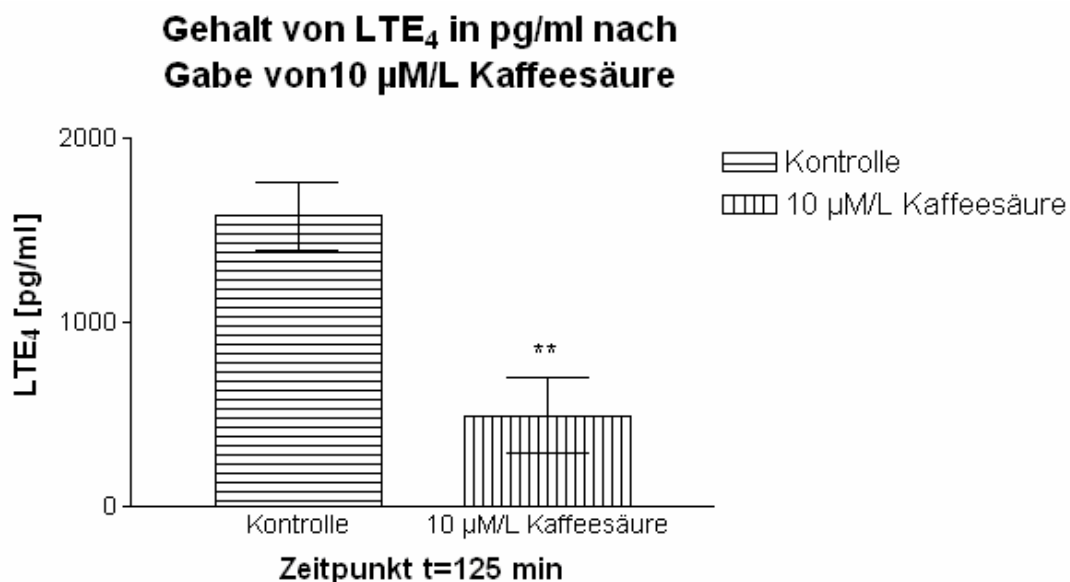


Abbildung 41b: Veränderung des Gehalts von LTE₄ im Perfusat in pg/ml nach Gabe von 10 µM/L Kaffeesäure.

Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 µg/ml) als Kontrolle und in Anwesenheit von Kaffeesäure ab dem Zeitpunkt 90 min perfundiert. Kaffeesäure wurde in einer Konzentration von 10 µM/L eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 µM/L Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der mit Kaffeesäure inkubierten Lungen zu den Kontrolllungen: ** p<0,01

Gehalt von LTE₄ in pg/ml nach Gabe von 5 µM/L Baicalein

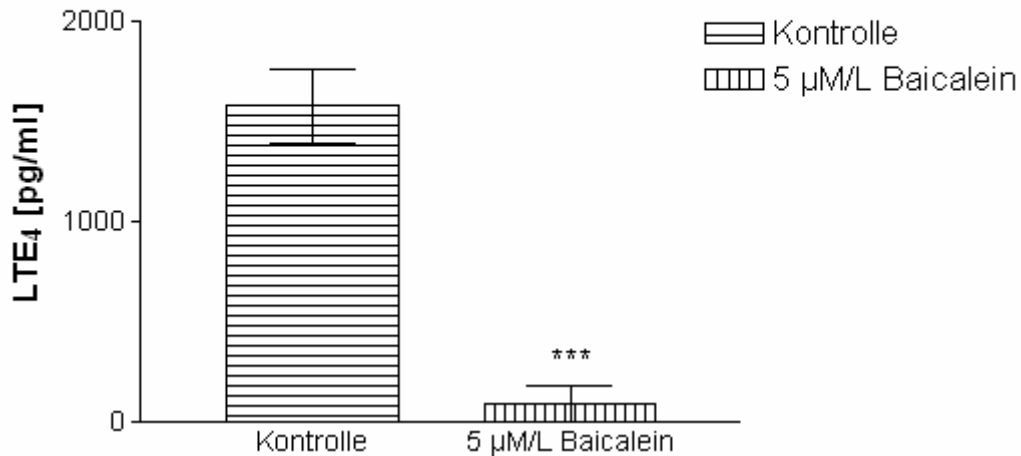


Abbildung 41c: Veränderung des Gehalts von LTE₄ im Perfusat in pg/ml nach Gabe von 5 µM/L Baicalein.

Die Lungen wurden mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (10 µg/ml) als Kontrolle und in Anwesenheit von Baicalein ab dem Zeitpunkt 90 min perfundiert. Baicalein wurde in einer Konzentration von 5 µM/L eingesetzt. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 µM/L Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der mit Baicalein inkubierten Lungen zu den Kontrolllungen: *** p<0,001

Hier wurden Werte zwischen 410 pg/ml und 868 pg/ml gemessen. Im Gegensatz zu den anderen Versuchen zeigte sich allerdings nach der Zugabe von AA zu den mit Kaffeesäure, Baicalein und MK-886 inkubierten Versuchen eine Abnahme der LTE₄-Perfusatkonzentration auf Werte zwischen 86 pg/ml und 493 pg/ml zum Zeitpunkt t=125 min (Tab. 6c und Tab. 7c). In den Abbildung 41a, 41b und 41c ist die signifikante Abnahme des LTE₄-Gehalts im Vergleich zu den Kontrollversuchen für die Applikation von MK-886, Kaffeesäure und Baicalein dargestellt.

5.7 Ergebnisse der Kontrollversuche zum Gram-positiven „priming“ ohne Zugabe von Plasma und mit Zugabe von Plasma

Die Kontrollversuche ohne Zugabe von Plasma und ohne „priming“ mit Petidoglykan G (PepG) und Lipoteichonsäure (LTA) zeigten während der zweistündigen Laufzeit keine signifikanten Veränderungen des pulmonalarteriellen Drucks, des Beatmungsdrucks sowie des Gewichts der Lunge. Die Gabe von 10 $\mu\text{M/L}$ Arachidonsäure zum Zeitpunkt $t=120$ min verursachte einen Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks um durchschnittlich 3,88 mmHg. Der Beatmungsdruck nahm um durchschnittlich 0,14 mmHg, das Gewicht um 0,63g zu (Tab. 5d).

Bei den Kontrollversuchen mit Zugabe von Plasma wurde 5 Minuten vor Versuchsbeginn (Zeitpunkt $t=-5$ min) 1,5 ml Rattenplasma in das Perfusat gegeben, um eine 1,5 % Plasmakonzentration zu erhalten. Während der zweistündigen Versuchslaufzeit zeigten sich weder beim pulmonalarteriellen Druck, beim Beatmungsdruck noch beim Gewicht signifikante Veränderungen. Nach der Gabe von 10 $\mu\text{M/L}$ Arachidonsäure zum Zeitpunkt $t=120$ min kam es zu einem Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks um durchschnittlich 3,93 mmHg. Der Beatmungsdruck nahm um 0,13 mmHg und das Lungengewicht um 0,16 g zu (Tab. 5d). Zwischen den Ergebnissen der Kontrollversuche mit Zugabe von Plasma und ohne Zugabe von Plasma bestanden keine signifikanten Unterschiede. Die Ergebnisse der Kontrollversuche in in den Abbildungen 42, 42a und 42b dargestellt.

Veränderung des pulmonalarteriellen Drucks nach Gabe von 1,5 % Plasma

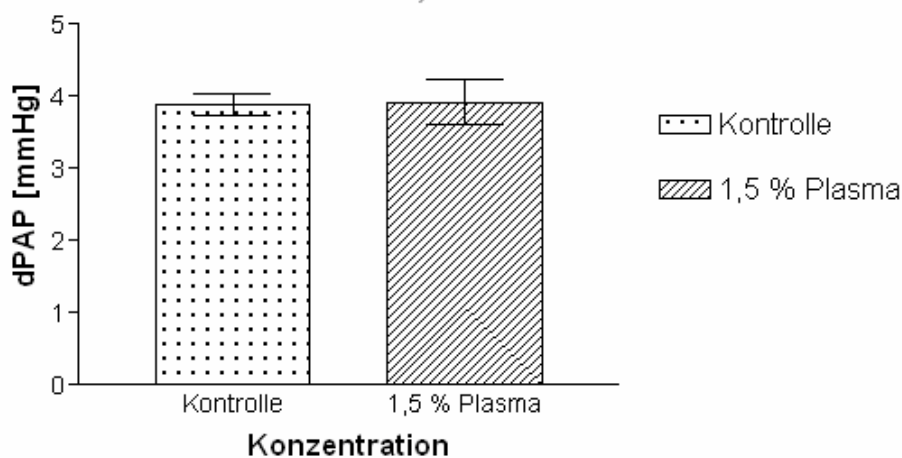


Abbildung 42: Veränderung des pulmonalarteriellen Drucks (dPAP) nach Zugabe von 1,5% Plasma. Der Perfusionslösung wurden zum Zeitpunkt -5 min 1,5 ml Plasma zugegeben. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 $\mu\text{M/L}$ Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. $n = 5$ unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe.

Veränderung des Beatmungsdrucks nach Gabe von 1,5 % Plasma

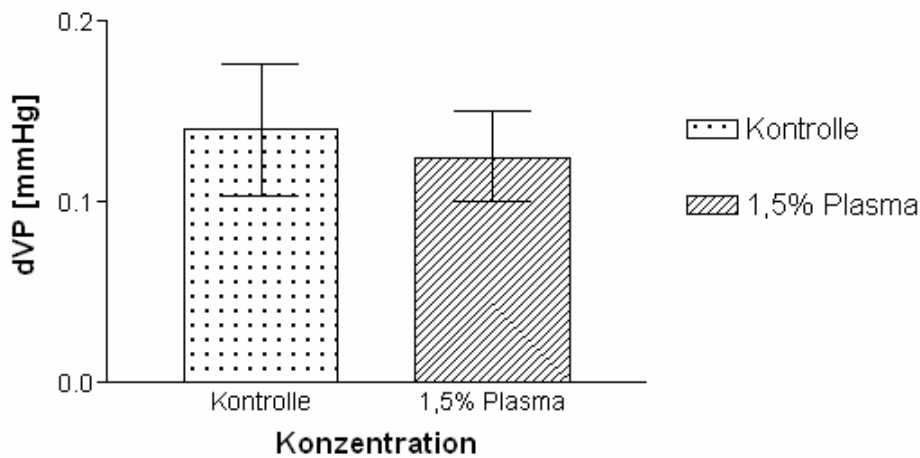


Abbildung 42a: Veränderung des Beatmungsdrucks (dVP) nach Zugabe von 1,5% Plasma.

Der Perfusionslösung wurden zum Zeitpunkt -5 min 1,5 ml Plasma zugegeben. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 μ M/L Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe.

Veränderung des Gewichts nach Gabe von 1,5 % Plasma

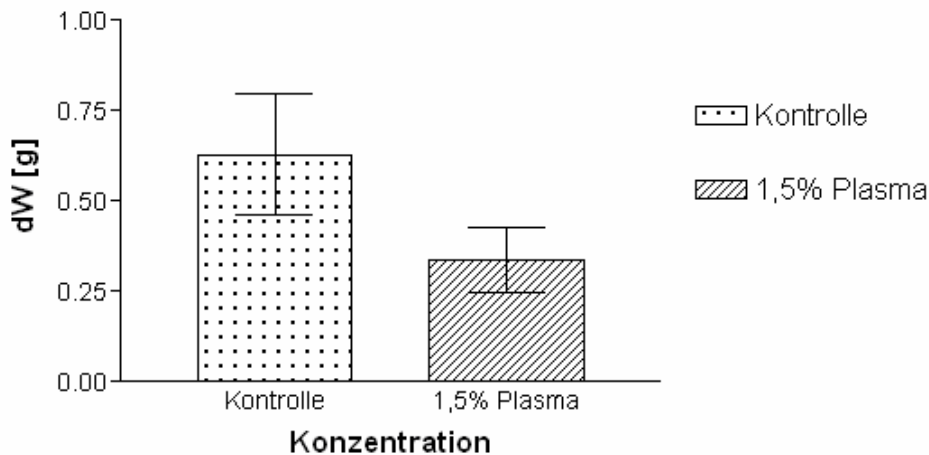


Abbildung 42b: Veränderung des Gewichts (dW) nach Zugabe von 1,5% Plasma.

Der Perfusionslösung wurden zum Zeitpunkt -5 min 1,5 ml Plasma zugegeben. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 μ M/L Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe.

5.8 Veränderungen des pulmonalarteriellen Druckes, Beatmungsdruckes und des Gewichts „LTA/PepG-stimulierter“-Rattenlungen mit Plasma

Verschiedene Konzentrationen und Kombinationen von PepG und LTA bewirkten unterschiedliche Reaktionen der stimulierten Lungen. Bei allen Versuchen mit variierten Gehalten von Peptidoglykan G und Lipoteichonsäure wurden der Perfusionslösung 1,5 ml Plasma zugefügt. Das Plasma wurde wie in den Kontrollversuchen zum Zeitpunkt $t=-5$ min in das Perfusat gegeben, während PepG und LTA zum Zeitpunkt $t=0$ min in das Perfusat gegeben wurden.

Die ausschließliche Zugabe von 20 $\mu\text{g/ml}$ Lipoteichonsäure bewirkte einen Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes der AA-Applikation um 3,60 mmHg. Nach zweistündiger Inkubation der isoliert perfundierten Rattenlunge mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Peptidoglykan G stieg der pulmonalarterielle Druck nach der Arachidonsäuregabe um 4,42 mmHg an. Die Unterschiede des Druckerhöhung zwischen den Kontrollversuchen ohne 1,5 % Plasma, den Kontrollversuchen mit 1,5 % Plasma, den Versuchen mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Peptidoglykan G und den Versuchen mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Lipoteichonsäure waren nicht signifikant. (Abb. 43).

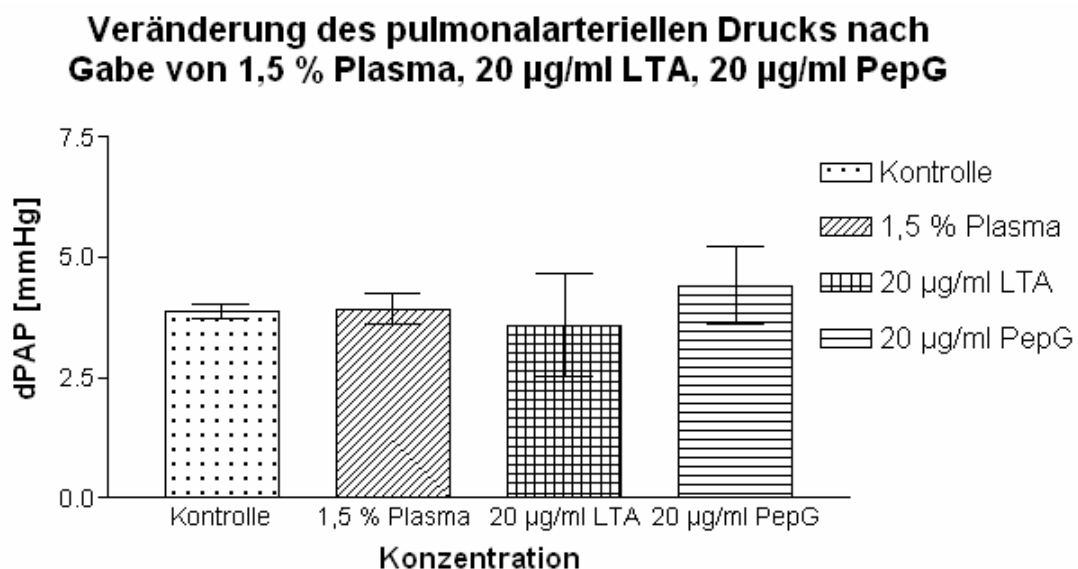


Abbildung 43: Veränderung des pulmonalarteriellen Druckes (dPAP) nach Zugabe von 1,5% Plasma und „priming“ mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Lipoteichonsäure oder 20 $\mu\text{g/ml}$ Peptidoglykan G.

Der Perfusionslösung wurden zum Zeitpunkt -5 min 1,5 ml Plasma zugegeben. Die Lungen wurden mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Lipoteichonsäure oder 20 $\mu\text{g/ml}$ Peptidoglykan G ab dem Zeitpunkt 0 min inkubiert. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 $\mu\text{M/L}$ Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. $n = 5$ unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe.

Im Hinblick auf die Veränderungen des Beatmungsdrucks nach der Gabe von Arachidonsäure in das Perfusat ließ sich feststellen, daß die zweistündige Inkubation mit 20 µg/ml Lipoteichonsäure einen Anstieg des Beatmungsdrucks um 0,44 mmHg bewirkte. Nach Inkubation mit 20 µg/ml Peptidoglykan G stieg der Beatmungsdruck um 0,48 mmHg an. Die Unterschiede des Druckanstiegs zwischen den Kontrollversuchen ohne 1,5 % Plasma, den Kontrollversuchen mit 1,5 % Plasma, den Versuchen mit 20 µg/ml Peptidoglykan G und den Versuchen mit 20 µg/ml Lipoteichonsäure waren nicht signifikant. (Abb. 43a).

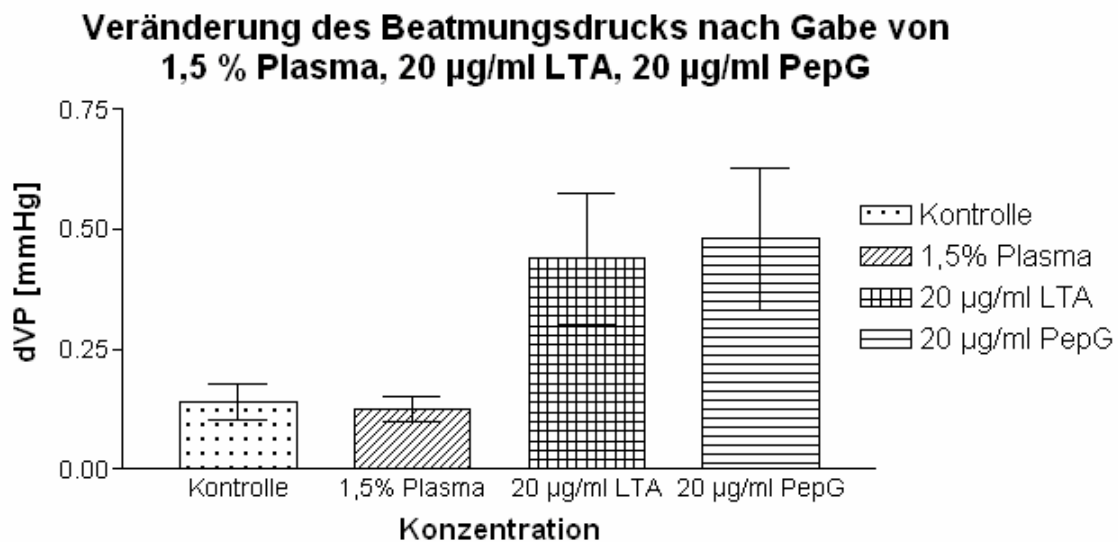


Abbildung 43a: Veränderung des Beatmungsdrucks (dVP) nach Zugabe von 1,5% Plasma und „priming“ mit 20 µg/ml Lipoteichonsäure oder 20 µg/ml Peptidoglykan G.

Der Perfusionslösung wurden zum Zeitpunkt -5 min 1,5 ml Plasma zugegeben. Die Lungen wurden mit 20 µg/ml Lipoteichonsäure oder 20 µg/ml Peptidoglykan G ab dem Zeitpunkt 0 min inkubiert. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 µM/L Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe.

Die Gewichtsveränderungen nach der Zugabe von 10 $\mu\text{M/L}$ Arachidonsäure in das Perfusat zum Zeitpunkt $t=120$ min stellten sich wie folgt dar: Nach der zweistündigen Inkubation mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Lipoteichonsäure nahm das Gewicht um 0,13 g zu. Das Gewicht der isoliert perfundierten Rattenlunge nahm nach zweistündiger Inkubation mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Peptidoglykan G um 0,76 g zu. Die Unterschiede des Druckanstiegs zwischen den Kontrollversuchen ohne 1,5 % Plasma, den Kontrollversuchen mit 1,5 % Plasma, den Versuchen mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Peptidoglykan G und den Versuchen mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Lipoteichonsäure waren nicht signifikant. (Abb. 43b).

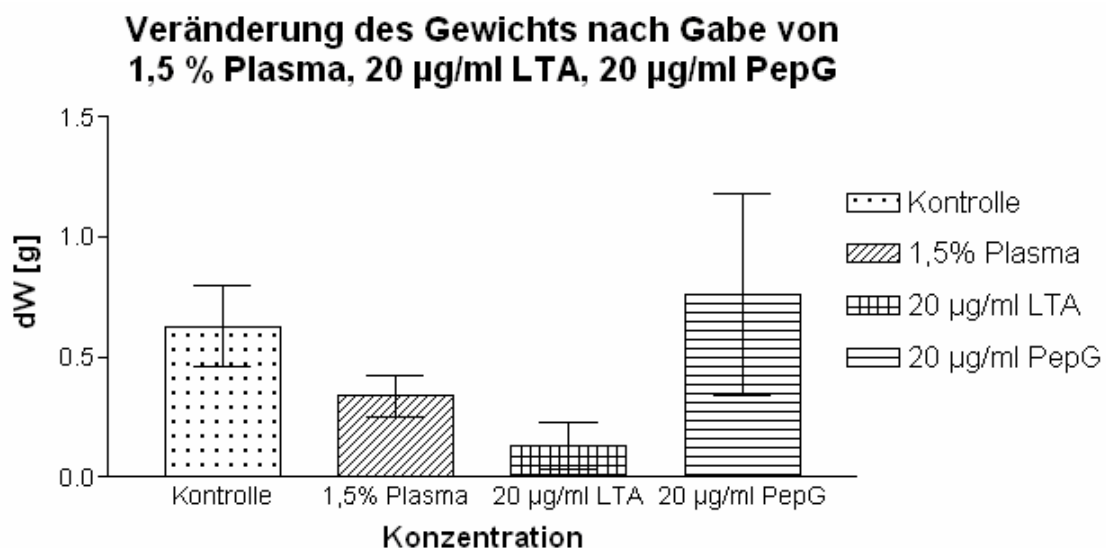


Abbildung 43b: Veränderung des Gewichts (dW) nach Zugabe von 1,5% Plasma und „priming“ mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Lipoteichonsäure oder 20 $\mu\text{g/ml}$ Peptidoglykan G.

Der Perfusionslösung wurden zum Zeitpunkt -5 min 1,5 ml Plasma zugegeben. Die Lungen wurden mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Lipoteichonsäure oder 20 $\mu\text{g/ml}$ Peptidoglykan G ab dem Zeitpunkt 0 min inkubiert. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 $\mu\text{M/L}$ Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. $n = 5$ unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe.

Weiterhin wurden die isoliert perfundierten Rattenlungen nach der Gabe von 1,5 ml Plasma zum Zeitpunkt $t=-5$ min mit der Kombination von $20 \mu\text{g/ml}$ Lipoteichonsäure und $20 \mu\text{g/ml}$ Peptidoglykan G inkubiert. Lipoteichonsäure und Peptidoglykan G wurden dem Perfusat zum Zeitpunkt $t=0$ min zugegeben. Nach der Zugabe von $10 \mu\text{M/L}$ Arachidonsäure stieg der pulmonalarterielle Druck um $8,86 \text{ mmHg}$ an. Dieser Anstieg war sowohl im Vergleich mit den Kontrollversuchen ohne Plasma, als auch im Vergleich mit den Kontrollversuchen mit Plasma signifikant höher ($p<0,05$). Die Veränderungen sind in Abbildung 44 dargestellt. Im Hinblick auf den Beatmungsdruck ergab sich ein hochsignifikanter ($p<0,001$) Anstieg auf $1,40 \text{ mmHg}$ im Vergleich zu den Kontrollen ohne Plasma und mit Plasma (Abb. 44a). Die gemessene Gewichtszunahme nach zweistündiger Inkubation mit $20 \mu\text{g/ml}$ Lipoteichonsäure und $20 \mu\text{g/ml}$ Peptidoglykan G um $2,67 \text{ g}$ war im Vergleich mit den Kontrollen ohne Plasma und den Kontrollen mit Plasma nicht signifikant (Abb. 44b)

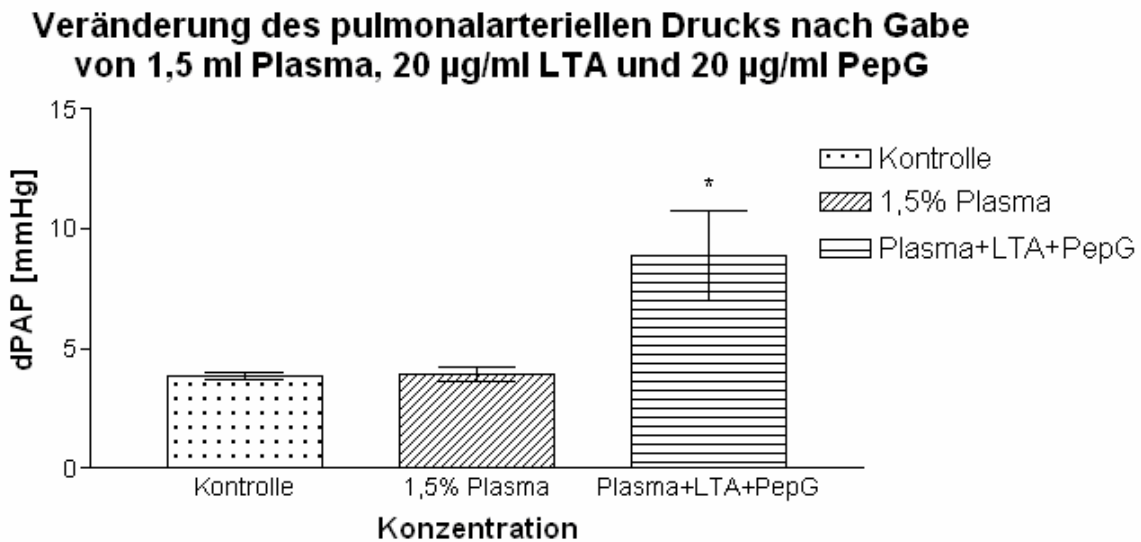


Abbildung 44: Veränderung des pulmonalarteriellen Drucks (dPAP) nach Zugabe von 1,5% Plasma und „priming“ mit $20 \mu\text{g/ml}$ Lipoteichonsäure und $20 \mu\text{g/ml}$ Peptidoglykan G.

Der Perfusionslösung wurden zum Zeitpunkt -5 min $1,5 \text{ ml}$ Plasma zugegeben. Die Lungen wurden mit $20 \mu\text{g/ml}$ Lipoteichonsäure und $20 \mu\text{g/ml}$ Peptidoglykan G ab dem Zeitpunkt 0 min inkubiert. Nach 120 min wurden dem Perfusat $10 \mu\text{M/L}$ Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. $n = 5$ unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der mit LTA/PepG inkubierten Lungen zu den Kontrolllungen mit Zugabe von Plasma und ohne Zugabe von Plasma: * $p<0,05$.

Veränderung des Beatmungsdrucks nach Gabe von 1,5 ml Plasma, 20 µg/ml LTA und 20 µg/ml PepG

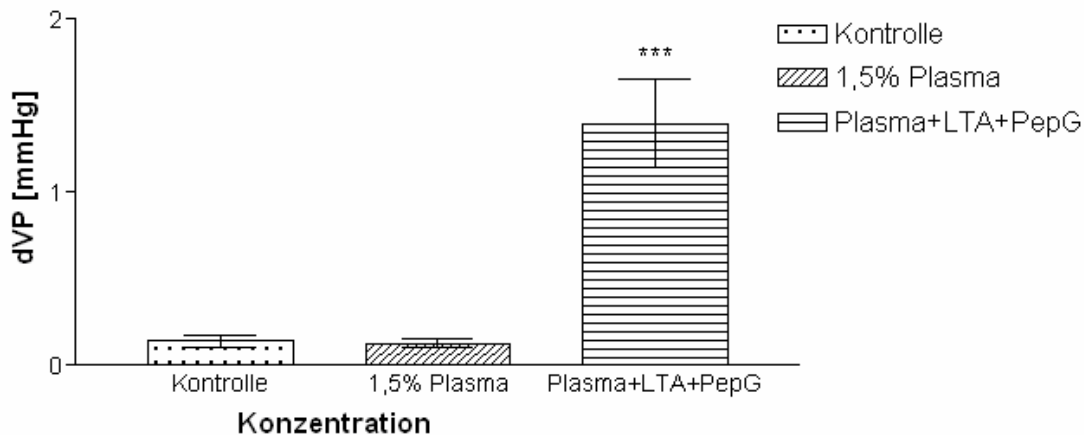


Abbildung 44a: Veränderung des Beatmungsdrucks (dVP) nach Zugabe von 1,5% Plasma und „priming“ mit 20 µg/ml Lipoteichonsäure und 20 µg/ml Peptidoglykan G.

Der Perfusionslösung wurden zum Zeitpunkt -5 min 1,5 ml Plasma zugegeben. Die Lungen wurden mit 20 µg/ml Lipoteichonsäure und 20 µg/ml Peptidoglykan G ab dem Zeitpunkt 0 min inkubiert. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 µM/L Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der mit LTA/PepG inkubierten Lungen zu den Kontrolllungen mit Zugabe von Plasma und ohne Zugabe von Plasma: *** p<0,001.

Veränderung des Gewichts nach Gabe von 1,5 ml Plasma, 20 µg/ml LTA und 20 µg/ml PepG

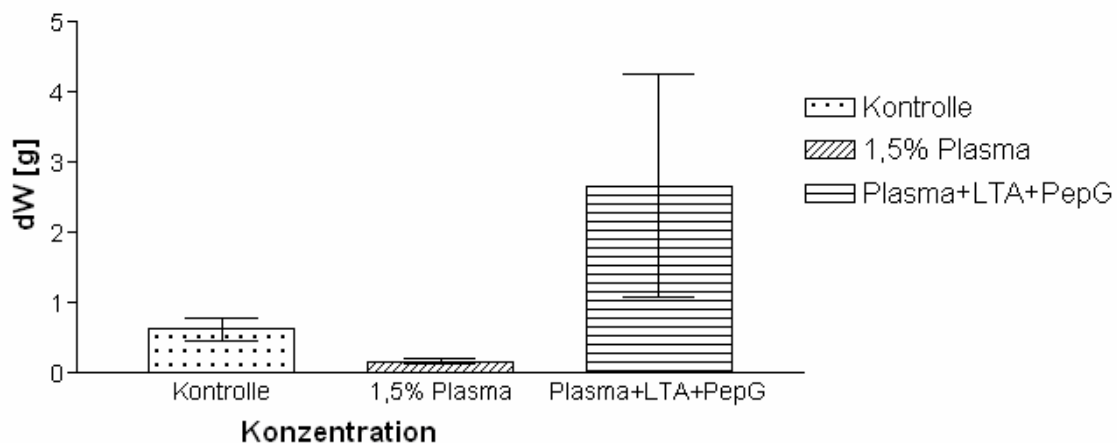


Abbildung 44b: Veränderung des Gewichts (dW) nach Zugabe von 1,5% Plasma und „priming“ mit 20 µg/ml Lipoteichonsäure und 20 µg/ml Peptidoglykan G.

Der Perfusionslösung wurden zum Zeitpunkt -5 min 1,5 ml Plasma zugegeben. Die Lungen wurden mit 20 µg/ml Lipoteichonsäure und 20 µg/ml Peptidoglykan G ab dem Zeitpunkt 0 min inkubiert. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 µM/L Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe.

5.9 Veränderungen des Perfusatgehalts von Thromboxan, Prostaglandin E₂ und Prostaglandin F_{1α} im Perfusat „LTA/PegG-stimulierter“-Rattenlungen mit Plasma

5.9.1 Thromboxan

Der Thromboxangehalt im Perfusat veränderte sich während der zweistündigen Versuchslaufzeit nicht. Nach Zugabe von 10 µM/L Arachidonsäure stieg die Thromboxankonzentration im Perfusat an. Fünf Minuten nach der Arachidonsäuregabe betrug der Thromboxangehalt bei den Kontrollversuchen ohne Plasma durchschnittlich 2220 pg/ml und bei den Kontrollversuchen mit Zugabe von 1,5 ml Plasma 3299 pg/ml (Tab. 5e). Zwischen diesen beiden Werten fanden sich keine signifikanten Unterschiede. Das „priming“ mit 20 µg/ml LTA bewirkte eine Zunahme des Thromboxangehalts auf 4805 pg/ml. Nach „priming“ mit 20 µg/ml Pep G betrug die Thromboxankonzentration im Plasma 5155 pg/ml (Tab. 5e). Die Zunahme des Thromboxangehalts nach Priming mit 20 µg/ml Lipoteichonsäure oder 20 µg/ml Peptidoglykan G war signifikant ($p < 0,05$) höher im Vergleich zu den Kontrollversuchen ohne Plasma. Im Vergleich mit den Kontrollversuchen mit Zugabe von 1,5 ml Plasma konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 45).

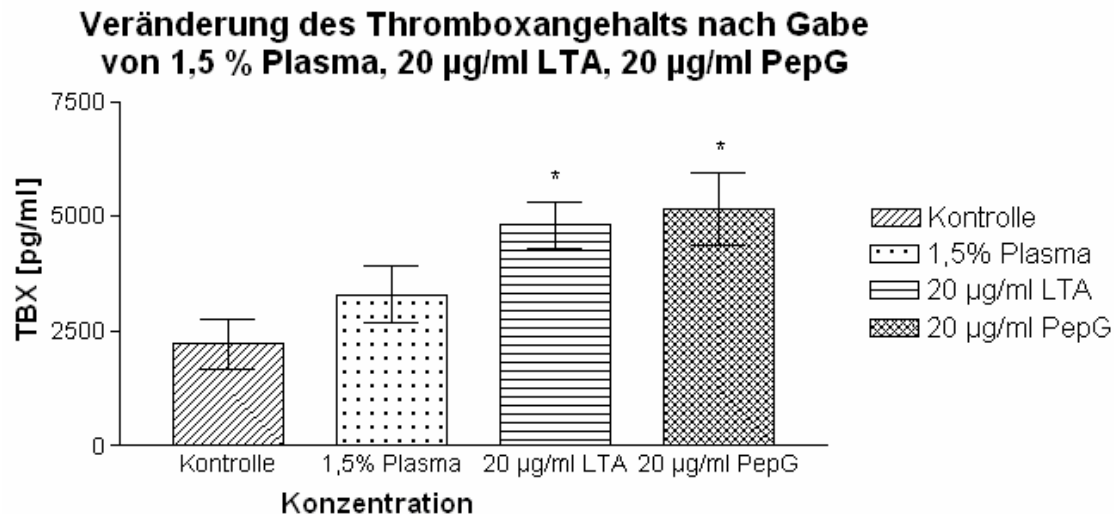


Abbildung 45: Veränderung des Thromboxangehalts ohne Zugabe von Plasma, nach Zugabe von 1,5% Plasma und nach „priming“ mit 20 µg/ml Lipoteichonsäure oder 20 µg/ml Peptidoglykan G.

Der Perfusionslösung wurden zum Zeitpunkt -5 min 1,5 ml Plasma zugegeben. Die Lungen wurden mit 20 µg/ml Lipoteichonsäure oder 20 µg/ml Peptidoglykan G ab dem Zeitpunkt 0 min inkubiert. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 µM/L Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der mit LTA oder PepG inkubierten Lungen zu den Kontrolllungen ohne Plasmazugabe: * $p < 0,05$

Das „priming“ der isoliert perfundierten Rattenlunge mittels Zugabe von 20 µg/ml Lipoteichonsäure und 20 µg/ml Peptidoglykan G in das Perfusat zum Zeitpunkt t=0 min bewirkte ein Zunahme der Thromboxankonzentration zum Zeitpunkt t=125 min auf 7121 pg/ml (Tab. 5e). Diese Veränderung war signifikant ($p < 0,05$) im Vergleich zu den Kontrollversuchen ohne Plasma; im Vergleich zu den Kontrollversuchen mit Zugabe von Plasma konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 45a).

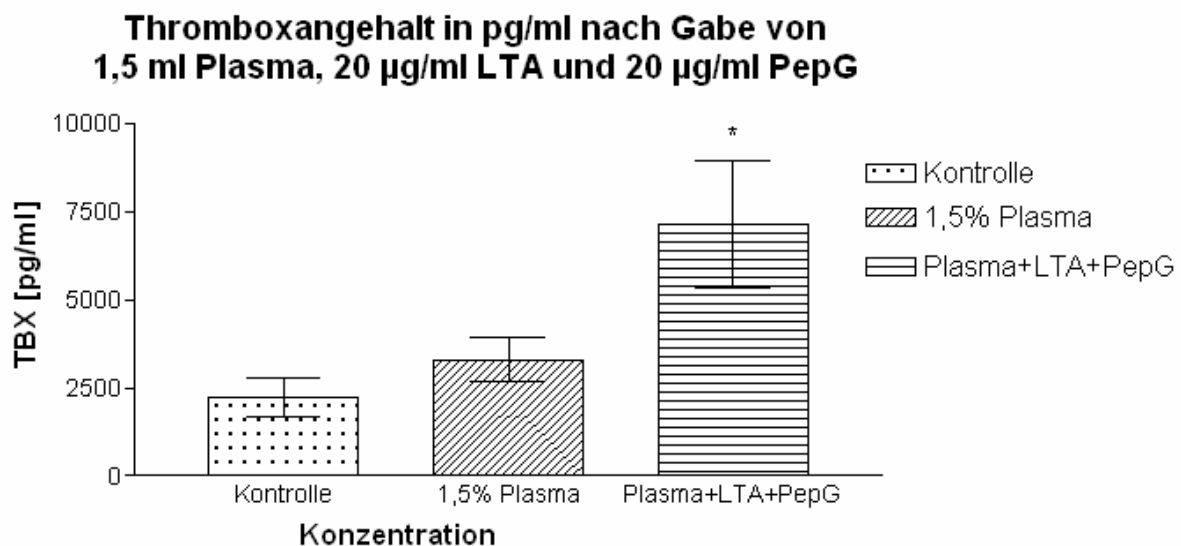


Abbildung 45a: Veränderung des Thromboxangehalts ohne Zugabe von Plasma, nach Zugabe von 1,5% Plasma und nach „priming“ mit 20 µg/ml Lipoteichonsäure und 20 µg/ml Peptidoglykan G.

Der Perfusionslösung wurden zum Zeitpunkt -5 min 1,5 ml Plasma zugegeben. Die Lungen wurden mit 20 µg/ml Lipoteichonsäure und 20 µg/ml Peptidoglykan G ab dem Zeitpunkt 0 min inkubiert. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 µM/L Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. $n = 5$ unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der mit LTA und PepG inkubierten Lungen zu den Kontrolllungen ohne Plasmazugabe: * $p < 0,05$

5.9.2 Prostaglandin E₂

Der Prostaglandin E₂-Gehalt im Perfusat veränderte sich während der zweistündigen Versuchslaufzeit nicht. Nach Zugabe von 10 µM/L Arachidonsäure stieg die Prostaglandin E₂-Konzentration im Perfusat an. Fünf Minuten nach der Arachidonsäuregabe betrug der Prostaglandin E₂-Gehalt bei den Kontrollversuchen ohne Plasma durchschnittlich 871 pg/ml und bei den Kontrollversuchen mit Zugabe von 1,5 ml Plasma 2089 pg/ml (Tab. 5e). Zwischen diesen beiden Werten fanden sich keine signifikanten Unterschiede. Das „priming“ mit 20 µg/ml LTA bewirkte eine Zunahme des Prostaglandin E₂-Gehalts auf 3354 pg/ml. Nach „priming“ mit 20 µg/ml Pep G betrug die Prostaglandin E₂-Konzentration im Plasma 2614 pg/ml (Tab. 5e). Die Zunahme des Prostaglandin E₂-Gehalts nach Priming mit 20 µg/ml Lipoteichonsäure war signifikant (p<0,01) höher im Vergleich zu den Kontrollversuchen ohne Plasma. Ebenso war auch die Zunahme der Prostaglandin E₂-Konzentration nach „priming“ mit 20 µg/ml Peptidoglykan G signifikant (p<0,05) höher im Vergleich zu den Kontrollversuchen ohne Plasma. Im Vergleich mit den Kontrollversuchen mit Zugabe von 1,5 ml Plasma konnten sowohl nach „priming“ mit LTA als auch nach „priming“ mit PepG keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 46).

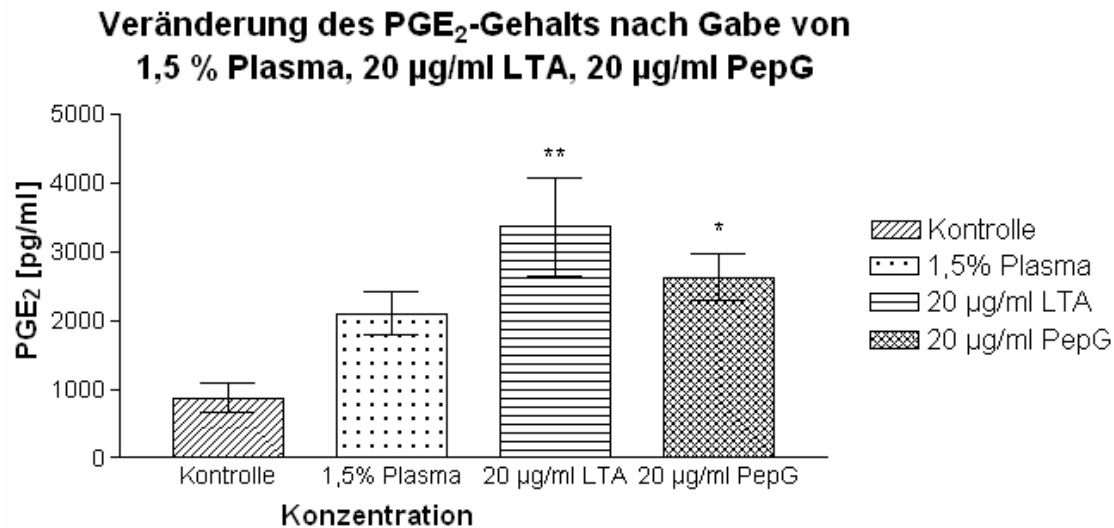


Abbildung 46: Veränderung des Prostaglandin E₂-Gehalts ohne Zugabe von Plasma, nach Zugabe von 1,5% Plasma und nach „priming“ mit 20 µg/ml Lipoteichonsäure oder 20 µg/ml Peptidoglykan G. Der Perfusionslösung wurden zum Zeitpunkt -5 min 1,5 ml Plasma zugegeben. Die Lungen wurden mit 20 µg/ml Lipoteichonsäure oder 20 µg/ml Peptidoglykan G ab dem Zeitpunkt 0 min inkubiert. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 µM/L Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der mit LTA oder PepG inkubierten Lungen zu den Kontrolllungen ohne Plasmazugabe: * p<0,05, ** p<0,01

Die Prostaglandin E₂-Konzentration stieg nach dem „priming“ der isoliert perfundierten Rattenlunge mittels Zugabe von 20 µg/ml Lipoteichonsäure und 20 µg/ml Peptidoglykan G auf 6613 pg/ml zum Zeitpunkt t=125 min an (Tab. 5e). Diese Veränderung war signifikant (p<0,05) im Vergleich zu den Kontrollversuchen ohne Plasma; im Vergleich zu den Kontrollversuchen mit Zugabe von Plasma konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 46a).

Gehalt von Prostaglandin E₂ in pg/ml nach Gabe von 1,5 ml Plasma, 20 µg/ml LTA und 20 µg/ml PepG

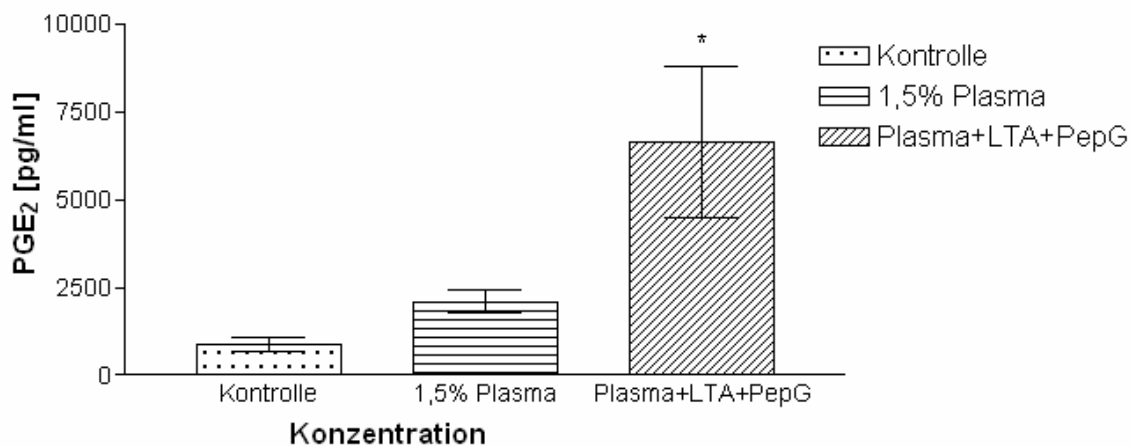


Abbildung 46a: Veränderung des Prostaglandin E₂-Gehalts ohne Zugabe von Plasma, nach Zugabe von 1,5% Plasma und nach „priming“ mit 20 µg/ml Lipoteichonsäure und 20 µg/ml Peptidoglykan G. Der Perfusionslösung wurden zum Zeitpunkt -5 min 1,5 ml Plasma zugegeben. Die Lungen wurden mit 20 µg/ml Lipoteichonsäure und 20 µg/ml Peptidoglykan G ab dem Zeitpunkt 0 min inkubiert. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 µM/L Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der mit LTA und PepG inkubierten Lungen zu den Kontrolllungen ohne Plasmazugabe: * p<0,05

5.9.3 Prostaglandin F_{1α}

Die Konzentration von Prostaglandin F_{1α} im Perfusat veränderte sich während der zweistündigen Versuchslaufzeit nicht. Nach Zugabe von 10 µM/L Arachidonsäure stieg die Prostaglandin F_{1α}-Konzentration im Perfusat an. Fünf Minuten nach der Arachidonsäuregabe betrug der Prostaglandin F_{1α}-Gehalt bei den Kontrollversuchen ohne Plasma durchschnittlich 22020 pg/ml und bei den Kontrollversuchen mit Zugabe von 1,5 ml Plasma 64340 pg/ml (Tab. 5e). Der Anstieg war bei den Kontrollversuchen mit Zugabe von 1,5 ml Plasma signifikant (p<0,05) höher als bei den Kontrollversuchen ohne Zugabe von Plasma. Das „priming“ mit 20 µg/ml LTA

bewirkte eine Zunahme des Perfusatgehalts von Prostaglandin $F_{1\alpha}$ auf 74120 pg/ml. Nach „priming“ mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Pep G betrug die Prostaglandin $F_{1\alpha}$ -Konzentration im Plasma 76610 pg/ml (Tab. 5e). Die Zunahme des Prostaglandin $F_{1\alpha}$ -Gehalts nach Priming mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Lipoteichonsäure oder 20 $\mu\text{g/ml}$ Peptidoglykan G war signifikant ($p < 0,01$) höher im Vergleich zu den Kontrollversuchen ohne Plasma. Im Vergleich mit den Kontrollversuchen mit Zugabe von 1,5 ml Plasma konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 47).

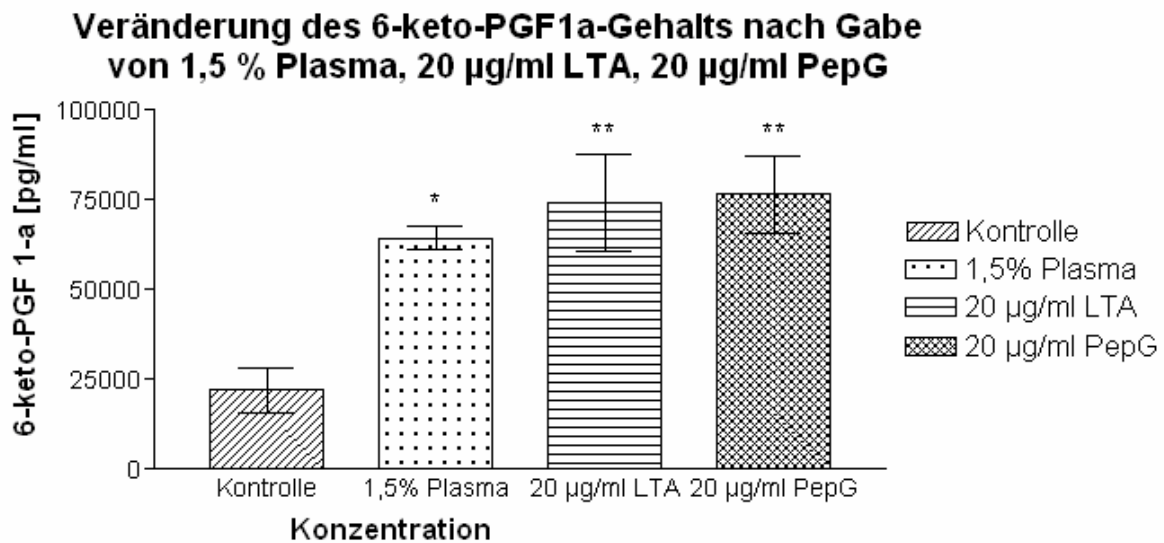


Abbildung 47: Veränderung des Prostaglandin $F_{1\alpha}$ -Gehalts ohne Zugabe von Plasma, nach Zugabe von 1,5% Plasma und nach „priming“ mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Lipoteichonsäure oder 20 $\mu\text{g/ml}$ Peptidoglykan G. Der Perfusionslösung wurden zum Zeitpunkt -5 min 1,5 ml Plasma zugegeben. Die Lungen wurden mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Lipoteichonsäure oder 20 $\mu\text{g/ml}$ Peptidoglykan G ab dem Zeitpunkt 0 min inkubiert. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 $\mu\text{M/L}$ Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. $n = 5$ unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der Kontrolllungen mit Plasmazugabe und der mit LTA oder PepG inkubierten Lungen zu den Kontrolllungen ohne Plasmazugabe: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Das „priming“ der isoliert perfundierten Rattenlunge mittels Zugabe von 20 $\mu\text{g/ml}$ Lipoteichonsäure und 20 $\mu\text{g/ml}$ Peptidoglykan G in das Perfusat zum Zeitpunkt $t=0$ min bewirkte ein Zunahme der Konzentration von Prostaglandin $F_{1\alpha}$ zum Zeitpunkt $t=125$ min auf 116100 pg/ml (Tab. 5e). Diese Veränderung war signifikant ($p < 0,01$) im Vergleich zu den Kontrollversuchen ohne Plasma; im Vergleich zu den Kontrollversuchen mit Zugabe von Plasma konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 47a).

**Gehalt von 6-keto-PGF_{1α} in pg/ml nach Gabe von
1,5 ml Plasma, 20 µg/ml LTA und 20 µg/ml PepG**

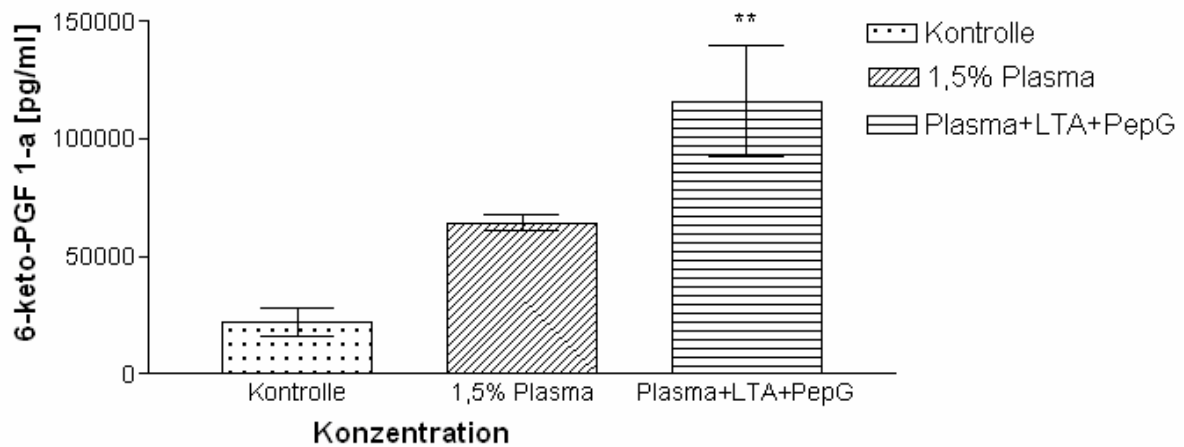


Abbildung 47a: Veränderung des Prostaglandin F_{1α}-Gehalts ohne Zugabe von Plasma, nach Zugabe von 1,5% Plasma und nach „priming“ mit 20 µg/ml Lipoteichonsäure und 20 µg/ml Peptidoglykan G. Der Perfusionslösung wurden zum Zeitpunkt -5 min 1,5 ml Plasma zugegeben. Die Lungen wurden mit 20 µg/ml Lipoteichonsäure und 20 µg/ml Peptidoglykan G ab dem Zeitpunkt 0 min inkubiert. Nach 120 min wurden dem Perfusat 10 µM/L Arachidonsäure zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der mit LTA und PepG inkubierten Lungen zu den Kontrolllungen ohne Plasmazugabe: * *p<0,01

6 Diskussion

Untersuchungen zum Gram-negativen „priming“

Die Derivate der Arachidonsäure werden als Eicosanoide bezeichnet und können in Prostaglandine, Thromboxane, Prostacycline und Leukotriene unterschieden werden. Die Wirkungen der Eicosanoide im Organismus sind mannigfaltig und beinhalten die Regulierung des Gefäßtonus, der Permeabilität des Kapillarbettes, Kontraktion oder Erschlaffung glatter Muskelzellen, Stimulierung oder Inhibition der Blutplättchenfunktion sowie die Regulierung des Mineralstoffmetabolismus (Leitch, 1984; Muller, 1991; Mancuso et al., 1997; Jones et al., 1997; McMillan, 2001; Egan und Fitzgerald, 2006). Ihre Effekte unterliegen einer komplizierten Selbstregulation und wirken sich hauptsächlich lokal in der unmittelbaren Umgebung zum Bildungsort aus.

Da die Eicosanoide nicht in Zellen gespeichert werden, müssen sie nach jedem Stimulus aus dem Ausgangsstoff Arachidonsäure neu synthetisiert werden. Die Leukotriensynthese findet nicht ausschließlich - wie in zahlreichen Veröffentlichungen beschrieben - in Blutzellen (Makrophagen, Monozyten, neutrophile Granulozyten) statt, sondern wie von Voelkel et al. (1996) und Chu et al. (2000) beschrieben ebenfalls in Endothelzellen. Chu et al. (2000) wiesen in ihren Untersuchungen das Vorkommen von 5-Lipoxygenase, FLAP-mRNA und FLAP-Protein in Endothelzellen von Blutgefäßen der Lunge nach. Offensichtlich darf das Endothel nicht als eine inaktive, lediglich die Blutgefäßwand bildende Zelllage angesehen werden, sondern vielmehr als übergeordnete, die Entzündungskaskade steuernde Regulierungsinstanz (Aird, 2003).

Im Mittelpunkt dieser Arbeit standen die Auswirkungen von aus dem Endothel der Lungenstrombahn freigesetzten Eicosanoiden. Um den Einfluß von aus Blutzellen gebildeten Eicosanoiden zu minimieren, wurde im vorliegend benutzten Modell der isoliert perfundierten Rattenlunge durch wiederholte Durchströmung der Lunge und anschließendes Verwerfen des Perfusats sichergestellt, daß unerwünschte Blutbestandteile aus dem Gefäßsystem der Lunge ausgewaschen wurden. Der in dieser Arbeit verwendete Versuchsaufbau entsprach der Beschreibung von Seeger et al. (1994).

In den Kontrollversuchen, die die grundlegende Bezugsgröße dieser Arbeit darstellen, wurden die eindrucksvollen Effekte des „priming“ mit LPS auf nachfolgend mit Arachidonsäure stimulierte Lungen nachgewiesen. Die Auswertung dieser Versuchsdaten zeigte die wesentlich stärkere Reaktion der gemessenen Parameter Δ PAP, Δ VP und Δ W im Vergleich zu mit Arachidonsäure stimulierten Lungen ohne vorhergehende Inkubation mit Lipopolysacchariden.

Peters-Golden et al. (2004) beschreiben den „priming“-Effekt für die Leukotriensynthese in ihrer Übersichtsarbeit. Desweiteren finden sich detaillierte Beschreibungen für das „LPS-priming“ der FLAP bei Serio et al. (2005) und Surette et al. (1998). Serio et al. (2005) untersuchten den „priming“-Effekt in einer Kultur von THP-1-Zellen, die als Modell menschlicher Monozyten dienten. Dabei wurde die Genexpression der FLAP nach Inkubation der Zellkultur mit Lipopolysaccharid verstärkt. Ebenfalls in einer Zellkultur, allerdings mit menschlichen polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten, untersuchten Surette et al. (1998) den vorstimulierenden Effekt von bakteriellem Lipopolysaccharid.

Der Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks war in der verwendeten Versuchsanordnung Gradmesser der durch die freigesetzten Eicosanoide verursachten Vasokonstriktion. Im Rahmen der Vasokonstriktion erfolgte eine massive Behinderung des Perfusatdurchflusses in der Lungenstrombahn.

Der ebenfalls unter dem Einfluß des Lipopolysaccharid-induzierten „priming“ ansteigende Ventilationsdruck war Ausdruck der durch die Derivate der Arachidonsäure verursachten Bronchokonstriktion. Dies wurde in den Arbeiten von Uhlig et al. (1996 und 1997) auf den bronchokonstriktiven Effekt des Thromboxans zurückgeführt. Durch die zunehmende Funktionsstörung und irreversible Endothelschädigung kam es zum Lungenödem, was sich in einer Gewichtszunahme der Lunge manifestierte. Der Anstieg des Gewichts der isoliert perfundierten Rattenlunge war Gradmesser für die Menge an Perfusat, die im Lungengewebe eingelagert wurde.

Die massiven Lungenschädigungen nach „LPS-priming“ wurden in den durchgeführten Versuchen durch den Einsatz verschiedener LOX-Inhibitoren in ihrer Intensität beeinflusst. Es zeigte sich, daß die unterschiedlichen Hemmstoffe der LOX-Isoenzyme einen sowohl in Bezug auf ihren Wirkmechanismus als auch in Bezug auf

ihre Dosis in der Lage waren, die schädlichen Auswirkungen des „LPS-priming“ zu vermindern.

Die Hemmung aller LOX-Isoenzyme (5-LOX, 12-LOX, 15-LOX) unter Einsatz von CDC verringerte die physikalisch erfaßten Parameter der Lungenschädigung, Δ PAP, Δ VP und Δ W, eindrucksvoll. Der Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks, des Ventilationsdrucks und die Zunahme des Lungengewichts wurden gegenüber der Kontrolle signifikant vermindert. Der stärkste Effekt wurde bei einer Dosis von 20 μ M/L erreicht.

Mit diesem Resultat stimmten auch die Ergebnisse der ELISA-Messungen überein. In den ungehemmten Kontrollversuchen betrug der initiale LTE₄-Gehalt im Plasma zum Zeitpunkt t=120 min bereits 668 pg/ml und stieg dann zum Zeitpunkt t=125 min auf 1575 pg/ml an. Deutlich geringer war die Initialkonzentration zum Zeitpunkt t=120 nach der Zugabe von CDC; sie betrug lediglich 86 pg/ml und stieg zum Zeitpunkt t=125 nur auf 506,50 pg/ml an.

LTC₄ konnte mittels ELISA im Perfusat der Kontrollversuche und der Versuche mit CDC nicht nachgewiesen werden; bei den übrigen Hemmstoffversuchen wurden ebenfalls größtenteils keine oder nur sehr geringe Gehalte von LTC₄ nachgewiesen. Dies war vermutlich auf die schnelle Metabolisierung zu den Abbauprodukten LTD₄ und LTE₄ zurückzuführen (Austen et al. 2009); die Messung der LTE₄-Perfusatkonzentration gab dabei hinreichend Aufschluß über den Erfolg respektive den Grad der Hemmung der 5-Lipoxygenase (Keppler et al., 1992).

Die Messung der Perfusatkonzentrationen an Thromboxan, Prostaglandin E₂ und 6-keto-Prostaglandin F_{1 α} in den Kontrollversuchen ergab im Vergleich zu den Hemmstoffversuchen mit CDC keine Unterschiede. Die Funktion der Zyklooxygenase wurde durch den Hemmstoff CDC nicht beeinträchtigt, und die Veränderung der gemessenen Parameter Δ PAP, Δ VP und Δ W war auf den Einfluß der Lipoxygenase-Metaboliten zurückzuführen.

Die Analyse der ELISA-Daten der Perfusatgehalte an Thromboxan, Prostaglandin E₂ und 6-keto-Prostaglandin F_{1 α} unterstreicht die Bedeutung der Lipoxygenase-Isoenzyme für die pathophysiologische Reaktion der Lunge nach einem „LPS-priming“. Es konnte

allerdings mit keinem der untersuchten Stoffe eine Schädigung der Lunge komplett verhindert werden. Neben den Lipoxygenase-Isoenzymen üben auch andere Metaboliten der Arachidonsäure einen Einfluß auf das pathophysiologische Geschehen in der Lunge aus. Zum Einfluß des Zyklooxygenaseweges liegen Untersuchungen von Ermert et al. (2000c) und Schütte et al. (1997) vor. Die Effekte von Cytochrom p450 und seinen Metaboliten in der Lungenstrombahn wurden von Fleming (2001), Alvarez et al. (2004), Michaelis et al. (2005) und Campbell und Falck (2007) und in ihren Arbeiten beschrieben.

Der Wirkstoff Gossypol inhibiert sowohl die 12-Lipoxygenase, als auch die 15-Lipoxygenase. Die Ergebnisse der Hemmstoffversuche mit Gossypol zeigten eine deutliche Reduktion der untersuchten Parameter pulmonaler arterieller Druck, Ventilationsdruck und Gewicht. Ebenso wie bei den Versuchen mit 5 µM/L CDC und 20 µM/L CDC war insbesondere die Gewichtszunahme der Lunge signifikant geringer ausgeprägt als in den Kontrollversuchen. Die Wassereinlagerung in der LPS-stimulierten Rattenlunge steht maßgeblich unter dem Einfluß der Cysteinyl-Leukotriene LTC₄ und LTE₄. Busse (1998) beschrieb in seiner Arbeit die vermehrte Ausschüttung von Cysteinyl-Leukotrienen nach Vorstimulation durch Zytokine oder andere proinflammatorische Substanzen. Zu diesen sind auch Bakterientoxine zu zählen. Weiterhin wies Busse auch auf die Effekte der Cysteinyl-Leukotriene auf das Gefäßsystem der Lunge hin und beschrieb die zur Flüssigkeitseinlagerung führenden Pathomechanismen. Im Normalzustand verhindern die intakte Gefäßwand der Lungenkapillaren und der kolloid-osmotische Druck der Plasmaproteine sowie der Lymphfluß die Ansammlung von Flüssigkeit im Interstitium der Lunge. Ist allerdings die Kapillarwand geschädigt, so verursachen bereits geringe Druckerhöhungen im kapillären Gefäßbett die Ausbildung eines Lungenödems. Der kolloid-osmotische Druck der Plasmaproteine kann die kapilläre Filtration über das Kapillarendothel nicht mehr gegenregulieren, und es kommt zu einem starken Flüssigkeitseinstrom in den Alveolarraum. Klausner et al. (1989) wiesen in ihrer Arbeit darauf hin, daß die Ausbildung eines Lungenödems nach einer Lungenschädigung zudem auf die erhöhte Durchlässigkeit der Lungenkapillaren für Proteine zurückzuführen ist.

Den Einfluß der Lipoxygenasemetabolite auf die Gefäßpermeabilität untersuchten Cook et al. (1990) am Modell der Ratte im Endotoxinschock. Die Verwendung des LTD₄/E₄-

Rezeptorblockers LY171883 und des selektiven LTD₄-Rezeptorantagonisten SKF-104353 bewirkte eine signifikante Verringerung der Gefäßpermeabilität. Die Permeabilität wurde unter der Verwendung von mit ^{99m}Tc-markiertem menschlichen Serumalbumin gemessen. Ahn et al. (1995) wiesen in ihrer Arbeit über das Thrombin-induzierte Lungenödem bei der Ratte nach, daß die Verwendung des selektiven Leukotrienrezeptorantagonisten ICI 198,615 die Ausbildung eines Lungenödems signifikant verminderte. Diese Ergebnisse stehen auch in Übereinstimmung mit den Untersuchungen der Arbeitsgruppe Ermert, die in verschiedenen Arbeiten (1998, 2000c) auf die Bedeutung der Leukotriene für die Erhöhung der Gefäßpermeabilität hinwiesen.

Die Cysteinyl-Leukotriene bewirken eine Kontraktion der glatten Muskulatur der Atemwege und sind in dieser Eigenschaft 10-fach bis 100-fach potenter als Histamin (Barnes et al., 1984). Jonsson (1998) beschrieb, daß Leukotrien C₄ die Kontraktion glatter Muskelzellen in der Luftröhre von Schafen über den Cys-LT₂-Rezeptor steuert. Auch für das Modell der Meerschweinchenlunge lösen die Cysteinyl-Leukotriene eine Kontraktion glatter Muskelzellen aus. Zusätzlich zur kontraktiven Wirkung bewirken Leukotrien C₄ und Lipoxin A die Freisetzung von Thromboxan. Diese Thromboxanfreisetzung wird über den Cys-LT₁-Rezeptor gesteuert und ist an der Kontraktionswirkung beteiligt. Im Modell des isoliert perfundierten mesenterialen Gefäßbettes beschrieben Shastri et al. (2001) die vasokonstriktive Wirkung der Leukotriene LTC₄, LTD₄ und LTE₄. Mittels der Lipoxygenase-Inhibitoren AA-861 und MK-571 konnten die vasokonstriktischen Reaktionen auf Angiotensin II signifikant verringert werden. Auf die gefäßkontrahierende Wirkung von Endothelin-1 und Kaliumchlorid übte die Zugabe der Lipoxygenase-Inhibitoren keinen Effekt aus. Jones et al. (2004) wiesen in ihrer Arbeit darauf hin, daß zwar die Überexpression von 5-Lipoxygenase in unbehandelten Ratten nicht zu pulmonalem Hochdruck führte; die Überexpression in vorgeschädigten Ratten allerdings eine deutliche Verstärkung des pulmonalen Hochdrucks bewirkte. Desweiteren wies das vorgeschädigte Lungengewebe nach Einwirkung der 5-Lipoxygenase im histologischen Schnitt weitreichende entzündungsbedingte Zellinfiltrationen und starke Muskularisation der pulmonalen Gefäße auf. Davidson und Drafta (1992) verwendeten für ihre Untersuchungen zum pulmonalen Hochdruck das Modell der isoliert perfundierten Rattenlunge und ihre

Ergebnisse unterstreichen die auch in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die wichtige Rolle, welche die Cysteinyl-Leukotriene bei der Regulierung des Gefäßtonus innehaben.

Auch im Hinblick auf die Veränderung der Prostanoidkonzentration im Perfusat zeigten sich bei den Hemmstoffversuchen mit Gossypol die gleichen Ergebnisse wie bei den Versuchsreihen mit CDC. Es kam zu einem Anstieg der Prostanoiden, aber die gemessenen Parameter PAP, VP und Gewicht belegen eine weniger intensive Schädigung der Lunge, als in den Kontrollversuchen. Gleichzeitig fanden sich auch hier steigende Werte der LTE₄-Konzentration. LTE₄ und seine Metaboliten waren also nicht alleine ursächlich für die Schädigung der isoliert perfundierten Rattenlunge.

Zur weiteren Differenzierung der Wirkungen der einzelnen LOX-Isoenzyme wurde mit Kaffeesäure ein spezifischer Hemmstoff der 5-Lipoxygenase in verschiedenen Dosierungen eingesetzt. Die Verwendung von 20 µM/L Kaffeesäure erbrachte im Vergleich zu den Versuchen mit 10 µM/L Kaffeesäure keine signifikante Verringerung der Lungenschädigung. Lediglich die Gewichtszunahme der Lunge konnte mit der Dosierung von 20 µM/L Kaffeesäure weiter verringert werden. Daher kann hier davon ausgegangen werden, daß mit 10 µM/L eine komplette Hemmung der 5-Lipoxygenase erreicht wurde. In dieser Versuchskonstellation zeigte sich ebenfalls eine im Vergleich zur Kontrolle deutlich weniger ausgeprägte Lungenschädigung. Bei der Gegenüberstellung der Versuche mit CDC ist zu erkennen, daß die Hemmung aller LOX-Isoenzyme eine stärkere Reduktion der gemessenen Parameter bewirkte, als die alleinige Hemmung der 5-Lipoxygenase.

Desweiteren ist festzustellen, daß die Hemmung der 12-LOX und der 15-LOX eine stärkere Verminderung des Anstiegs von pulmonalarteriellen Druck und Gewicht verursachten als die alleinige Hemmung der 5-LOX. Bei der Reduktion des Beatmungsdruckanstiegs ließen sich keine Unterschiede zwischen Gossypol und Kaffeesäure erkennen. Wie in der Literatur beschrieben, ist der 5-LOX-Weg der bedeutendste Weg für die Entstehung von ARDS und ALI, wird doch hierüber die Entstehung der potenten Cysteinyl-Leukotriene katalysiert. Andererseits haben auch die Metaboliten der 12-LOX und der 15-LOX einen nicht zu unterschätzenden Einfluß

auf die LPS-stimulierte Rattenlunge. Bereits 1988 wurde von Lefer et al. in einer Publikation postuliert, daß Lipoxin A und LTD₄ einen gemeinsamen Rezeptor besitzen. Zu klären ist bei den Versuchen, ob die Lipoxine und die Metaboliten der 12-LOX eine ähnlich hohe bzw. bei den Parametern Δ PAP und Δ W eine höhere Wirkung auf die Lungenendothelien aufweisen, als die durch 5-LOX katalysierten Leukotriene, oder ob es durch die Hemmung der 5-LOX zu einer Gleichgewichtsverschiebung im Sinne eines höheren Substratangebots für die 12-LOX und 15-LOX kommt. Mancini et al. (1998) untersuchten in einer Arbeit die Metabolisierung von 12-HETE und 15-HETE durch die 5-Lipoxygenase. In dieser Arbeit wurde beschrieben, daß in Anwesenheit von FLAP die 5-Lipoxygenase auch 12(S)-HETE und 15(S)-HETE als Substrat nutzen kann. Dies hatte im Falle von 12-(S)-HETE auch Auswirkungen auf die LTA₄-Synthese. Dieser Weg unterstreicht den Einfluß, den die Metaboliten der 12-Lipoxygenase auf die Leukotriensynthese besitzen. Die Veränderungen in den Konzentrationen von Thromboxan, Prostaglandin E₂ und 6-keto-Prostaglandin F_{1 α} in der vorliegenden Untersuchung waren analog zu den bereits beschriebenen Veränderungen in den Versuchsreihen mit CDC und Gossypol. Es kam außerdem ebenso zu einem starken Anstieg von LTE₄.

Weitergehend wurde mittels Baicalein in einer Versuchsreihe spezifisch die 12-Lipoxygenase gehemmt, um deren Einfluß auf die Leukotriensynthese eingehender zu betrachten. Hierbei zeigte sich, daß die erreichten Effekte auf VP und W weitgehend identisch waren mit der Reduktion unter dem Einfluß von Gossypol. Im Hinblick auf den PAP war eine geringgradig stärkere Reduktion des Anstiegs nach der Arachidonsäuregabe zu beobachten. Offensichtlich spielt die 15-Lipoxygenase lediglich eine untergeordnete Rolle im vorliegenden Versuchsaufbau. Bedeutsam für die pathophysiologischen Veränderungen in den durchgeführten Versuchen scheinen hauptsächlich die 12-Lipoxygenase und die 5-Lipoxygenase bzw. deren jeweilige Produkte zu sein.

Damit übereinstimmend war auch die Cysteinyl-Leukotrienkonzentration im Perfusat nach der Hemmung der 12-Lipoxygenase mit Baicalein signifikant geringer als nach der Hemmung der 5-Lipoxygenase mit Kaffeesäure. Zum Zeitpunkt t=125 min betrug die LTC₄-Konzentration im Perfusat der Versuche mit Kaffeesäure 1140 pg/ml und die

LTE₄-Konzentration 493 pg/ml. Im Vergleich dazu betrug bei den Baicalein-Versuchen der LTC₄-Gehalt lediglich 144,80 pg/ml und der LTE₄-Gehalt 90,60 pg/ml. Im Rahmen der Lungenschädigung wurde das anfallende LTE₄ weiter metabolisiert und lag dann in einer geringeren Konzentration vor. Bei der Betrachtung der ELISA-Bestimmungen der COX-Metaboliten fiel auf, daß sowohl Thromboxan als auch 6-keto-Prostaglandin F_{1α} und Prostaglandin E nach Inkubation mit Baicalein in deutlich höheren Konzentrationen im Perfusat nachweisbar waren, als in den Kontrollversuchen. Tries et al. (2002) untersuchten in ihrer Arbeit die Effekte der kombinierten Hemmung der Zyklooxygenase und Lipoxygenase mittels ML-3000. Sie wiesen in ihrer Arbeit den Anstieg der LOX-Metaboliten nach Hemmung der COX mittels Indomethacin in verschiedenen Tiermodellen nach. In der vorliegenden Arbeit wurde aufgezeigt, daß ein ähnlicher Effekt nach Hemmung der Lipoxygenase eintritt: Die Produkte der Zyklooxygenase stiegen nach LOX-Hemmung an. Dieser Mechanismus wurde auch in der Arbeit von Schroeder et al. (2002) zum Wachstum von Tumorzellen der Lunge beschrieben.

Die untersuchten Endothel- und daraus resultierenden Lungenschädigungen wurden durch ein sich verschiebendes Gleichgewicht zwischen den drei Isoenzymen der Lipoxygenase moduliert. Die Hemmung eines Isoenzym führte zum stärkeren Hervortreten der Wirkung der jeweils anderen Isoenzyme. Hierbei schien es allerdings nicht auf die einzelne Wirkung des speziellen Isoenzym anzukommen, sondern die 5-LOX benötigte offensichtlich die 15-LOX und 12-LOX als Synergisten. Ob neben der 12(S)-HETE weitere Produkte der 12-Lipoxygenase für die Leukotrien-Synthese eine Rolle spielen bleibt noch zu klären. Wang et al. (1990) wiesen in ihrer Arbeit die Aufnahme von Arachidonsäure und 12-HETE in Endothelzellen nach. 12-HETE kumulierte dabei in der Membran von Microsomen. Dies ist die Voraussetzung, damit 12-HETE dann weiter durch die 5-Lipoxygenase verstoffwechselt werden kann.

In Anwesenheit von FLAP ist es nach Mancini (1998) möglich, daß die 5-LOX auch 12(S)-HETE und 15(S)-HETE als Substrat nutzen kann. Dies ist eine Erklärung dafür, daß der Anstieg der gemessenen Parameter Δ PAP, Δ VP und Δ W unter der Hemmung der 12- und 15-LOX so deutlich war. Durch die Hemmung mit Gossypol stand der 5-LOX anscheinend weniger Substrat zur Verfügung, und so fiel auch die Produktion der Cysteinyl-Leukotriene geringer aus.

Die beiden Hemmstoffe MK-886 und L655,238 sind spezifische Hemmstoffe des 5-Lipoxygenase activating proteins (FLAP). Nachdem lange Zeit die Lokalisation von 5-LOX und FLAP an der Zellmembran vermutet wurde, fand man durch neuere Untersuchungen heraus, daß sich die 5-LOX im Kernplasma und im geringeren Maße auch im Zytoplasma befindet. Durch Stimulation kommt es zur Ansammlung der 5-LOX an der Kernmembran (Bannenberget al., 2004). Desweiteren wird das FLAP nach neueren Erkenntnissen nicht mehr als „docking-enzyme“ für die 5-Lipoxygenase betrachtet, sondern als „Arachidonsäure-Transferprotein“. Bei dieser Betrachtungsweise bindet die verfügbare (freie) Arachidonsäure an das FLAP und wird mittels eines noch unbekanntes Mechanismus der 5-LOX präsentiert. Daraufhin beginnt die Metabolisierung zu den Leukotrienen.

In Übereinstimmung mit Peters-Golden et al. (2004) zählten auch Mancini et al. (2001) in einer Untersuchung das FLAP zur Familie der Kernmembran-assoziierten Proteine des Eicosanoid- und Glutathion-Metabolismus (MAPEG). Zu dieser Familie zählt neben dem FLAP noch die PGE-Synthase, die LTC-Synthase sowie die microsomale Glutathion-S-Transferase (MGST) 1-3. Mancini et al. untersuchten in ihrer Arbeit die Hemmung der PGE-Synthase mittels verschiedener Wirkstoffe und konnten zeigen, daß sowohl LTC₄ als auch MK-886 in geringen Konzentrationen in der Lage waren, die PGE-Synthase eindrucksvoll zu hemmen. Im Gegensatz dazu waren die Zykllooxygenase-Inhibitoren Indomethacin und Acetaminophen in wesentlich höheren Konzentrationen inaktiv als Inhibitoren der Ratten-spezifischen PGE-Synthase.

In der Versuchsreihe mit MK-886 zeigte sich ein deutlich verminderter Anstieg von pulmonalarteriellen Druck, Beatmungsdruck und Gewicht im Vergleich zu den Kontrollversuchen, der vom Niveau mit den Hemmstoffen CDC, Gossypol, Kaffeesäure und Baicalein vergleichbar war. Die Veränderung von PAP, VP und W nach Hemmung aller LOX-Isoenzyme mittels CDC war ausgeprägter im Vergleich zu den Versuchen mit MK-886. Demgegenüber stand die stärkste Hemmung des PAP mittels L655,238, die in den bisher durchgeführten Versuchsreihen gefunden wurde. In hohen Dosen ab 10 µM/L löst MK-886 Apoptose aus (Gugliucci et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde MK-886 allerdings in der geringeren Dosierung von 5 µM/L verwendet. Jan und Tseng (2000) wiesen in ihrer Arbeit nach, daß bereits geringe Dosierungen von MK-886

eine Calciumfreisetzung und einen Calciumeinstrom in die Zelle induzierten. Hierdurch kann es zu einer Beeinflussung der Arachidonsäurekaskade kommen (Ca-abhängige Phospholipase C), die wiederum die Eicosanoidausschüttung der Endothelzellen beeinflusst. Dies erklärt die schwächere Hemmung durch MK-886 im Vergleich zu L655,238. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde von Zhu et al. (2003) in Versuchen mit Kaninchenlungen keine Verminderung der Vasokonstriktion unter dem Einfluß von MK-886 beobachtet.

Bei einer Untersuchung zur Hypoxie an der isoliert perfundierten Rattenlunge wurde bei der Verwendung des FLAP-Inhibitors MK-866 mit dieser Arbeit übereinstimmende Ergebnisse bezüglich der Auswirkungen auf die TBX- und die LTB-Konzentration ermittelt (Voelkel et al., 1996). Desweiteren wurde das Vorkommen von 5-Lipoxygenase und FLAP im Lungen- bzw. Lungengefäßepithel der Rattenlunge unter hypoxischen Bedingungen nachgewiesen. Unter Normoxie konnte mit der durchgeführten immunhistochemischen Färbung weder FLAP noch 5-Lipoxygenase im Lungengewebe nachgewiesen werden. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit war es naheliegend, daß es auch unter LPS-Stimulation zur Expression von 5-LOX und FLAP in den Lungeneithelien kommt. Ermert et al. gelang 1998 der immunhistochemische Nachweis der COX-2-Lokalisation und deren Aktivierung in Rattenlungen. Bei Verfügbarkeit entsprechender Antikörper könnte auch der Nachweis der LOX-Isoenzyme mittels der beschriebenen Technik gelingen.

Die Betrachtung der Daten aus vorhergehenden Arbeiten von Ermert et al. (1998, 2000b, 2000c) zur COX-2/TxA-Achse und die in dieser Arbeit erhobenen Daten belegen, daß sowohl die Produkte der Zyklooxygenase-Reaktion als auch die Produkte der Lipoxygenase-Reaktion eine wichtige Rolle bei der Regulation des pulmonalarteriellen Drucks und des Beatmungsdrucks im Modell der durch Lipopolysaccharide stimulierten isoliert perfundierten Rattenlunge spielten. Die Leukotriene unterstützen und regulieren die Zyklooxygenaseschiene als redundantes System im Rahmen der Arachidonsäuremetabolisierung. Das komplexe Zusammenspiel von Leukotrienen und Produkten des Zyklooxygenaseweges beschrieben Kadowitz et al. (1984) in ihrer Arbeit am Modell der Tierarten Schaf und Katze. Im Hinblick auf die Permeabilitätserhöhung der Lungenstrombahn nach LPS-Stimulation besitzen die Produkte des Lipoxygenaseweges eine wesentlich stärkere Rolle als Prostanoiden und

Thromboxan. Die Herstellung leukotriendefizienter Mäuse durch Inaktivierung des 5-Lipoxygenase-Gens zeigte, daß Entzündungsreaktionen auch ohne Vorhandensein von Leukotrienen entstehen können (Goulet et al., 1994). In dieser Arbeit wurde die vermehrte Produktion der Prostanoiden auf eine Kompensationsreaktion aufgrund der Unfähigkeit der Mäuse Prostaglandine zu synthetisieren zurückgeführt. Desweiteren stand durch die Blockade der Leukotriensynthese mehr Arachidonsäure als Ausgangssubstrat zur Verfügung und verstärkte so die Bildung der Prostanoiden. Auch Chianchi et al. (2006) beschrieben den vermehrten Anfall von Prostanoiden nach Blockade der 5-Lipoxygenase.

Noch eindrucksvoller als MK-866 zeigte sich der FLAP-Inhibitor L655,238 in der Lage, die von Lipopolysacchariden ausgelöste Lungenschädigung zu begrenzen. In der verwendeten Dosierung von 30 µM/L fiel der Anstieg von PAP, VP und W signifikant geringer aus als in den Kontrollversuchen. Unabhängig von den vorhergehenden Reaktionen der 12-LOX und der 15-LOX erzielte also die vollständige Hemmung des FLAP eine vergleichbar starke Reduktion der pathophysiologischen Veränderungen wie die Hemmung aller drei LOX-Isoenzyme mittels CDC. Ohne die Funktion der FLAP kann also die 5-LOX nicht in die Arachidonsäurekaskade eingeschaltet werden und so kann auch die Bildung der Cysteinyl-Leukotriene unterbunden werden.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Mancini et al. (2001) wurde auch in den Versuchen mit den FLAP-Inhibitoren eine wesentlich geringere Konzentration an PGE₂ im Perfusat nachgewiesen. In den Kontrollversuchen betrug die PGE₂-Konzentration zum Zeitpunkt t=122 min 2407 pg/ml, unter dem Einfluß von L655,238 betrug sie 815 pg/ml und nach Inkubation mit MK-886 konnten lediglich 201 pg/ml (5 µM/L MK-886) respektive 283 pg/ml PGE₂ nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der Versuche mit Bay-u9773 zeigen die große Bedeutung der durch die 5-LOX produzierten Leukotriene beziehungsweise deren Vorstufen für die Reaktion der LPS-stimulierten Rattenlungen. Bay-u9773 wirkte erst, nachdem alle drei LOX-Isoenzyme bereits ihre Wirkung entfaltet hatten und unterband die Bindung von LTC₄ und LTE₄ an ihre spezifischen Rezeptoren. Sloniewsky et al. (2004) stellten in ihrer Untersuchung fest, daß in Rattenalveolarzellen vom Typ II zwar Cys-LT₂-Rezeptoren,

jedoch keine CysLT₁-Rezeptoren exprimiert werden. In ihrer Arbeit beschrieben Mandal et al. (2004), daß die verschiedenen Leukotriene auch an jeweils spezifischen Rezeptoren wirken. Demnach repräsentiert CysLT₁ einen spezifischen Rezeptor für LTD₄, wohingegen CysLT₂ für LTC₄ die molekulare Zielstruktur darstellt. Ebenso gibt es auch für LTB₄ spezifische Zielmoleküle. Diese sind die sogenannten Rezeptoren BLT₁ und BLT₂ (Tager und Luster, 2003; Sakata et al., 2004).

Ungeklärt bleibt, ob der Cys-LT₁-Rezeptor an den Rattenalveolarzellen die einzige Zielstruktur der Cysteinyl-Leukotriene ist, oder ob noch weitere Rezeptoren in der isoliert perfundierten Rattenlunge vorhanden sind. Hierüber finden sich keine eindeutigen Angaben in der Literatur, doch läßt das Vorkommen von zahlreichen verschiedenen Zelltypen in der Lunge die Vermutung zu, daß weitere CysLT-Rezeptoren vorhanden sein müssen. Für die Annahme, daß lediglich der CysLT₁-Rezeptor für die Bindung der Cysteinyl-Leukotriene verantwortlich ist, spricht, daß die quantitative Messung von LTC₄ und LTE₄ mittels ELISA in den Versuchen mit Bay-u9773 zum Zeitpunkt t=125 min wesentlich höher lag als in allen anderen Versuchen. Insbesondere der LTE₄-Gehalt im Plasma erreichte sehr hohe Konzentrationen. Die hohe LTE₄-Konzentration war möglicherweise auf die Hochregulation der Leukotriensynthese nach Endotoxinstimulierung zurückzuführen (Cook et al., 1990; Fink et al., 1991). So beschrieben Muskardin et al. (1994) eine vermehrte Produktion von LTE₄ in isoliert perfundierten Rattenlungen nach Stimulierung mit Lipopolysaccharid. Offensichtlich kann das aus der Arachidonsäure durch die Lipoxygenase-Isoenzyme entstehende Substrat LTC₄ nach der Blockade seines Rezeptors durch enzymatische Abspaltung von Glutamat und Glycin noch weiter zu LTE₄ verstoffwechselt werden (Austen et al., 2009).

Die pathophysiologischen Veränderungen in der LPS-stimulierten Rattenlunge wurden durch die Produkte der enzymatischen 5-LOX-Aktivität maßgeblich gesteuert. Die Produkte der Enzyme 15-LOX und 12-LOX beeinflussten zwar nicht unmittelbar die pathophysiologischen Veränderungen, erwiesen sich jedoch als bedeutsam für den 5-LOX-Metabolismus. Hier besitzt insbesondere die 12-LOX eine wichtige Steuerfunktion für den Metabolismus der 5-LOX.

Wie dargestellt, spielen die Leukotriene eine wichtige Rolle bei der Steuerung der pathophysiologischen Prozesse der isoliert perfundierten Rattenlunge. Diese Steuerung findet in engem Zusammenspiel mit den Produkten des Zykllooxygenaseweges, also den Prostanoiden Thromboxan, Prostaglandin E₂ und 6-keto-Prostaglandin F_{1α} statt. In den durchgeführten Hemmstoffversuchen führte die Blockade des Lipoxygenaseweges zu einem Anstieg der Perfusatkonzentrationen von Thromboxan, Prostaglandin E₂ und 6-keto-Prostaglandin F_{1α}. Diese Anstiege, im Vergleich zu den Kontrollversuchen, waren je nach verwendetem Hemmstoff des Lipoxygenaseweges teilweise in geringem Ausmaß, teilweise mit hochsignifikantem Unterschied festzustellen. Zieht man nun in Betracht, daß auch im Bereich des Zykllooxygenaseweges ein Gram-negatives „priming“ existiert, so kam es in der vorliegenden Arbeit durch die Blockade des Lipoxygenaseweges zu einer vermehrten Bereitstellung des Substrats Arachidonsäure für den Zykllooxygenaseweg. Das normalerweise vorhandene Gleichgewicht der Metabolisierung verschob sich und führte zu einem vermehrten Anfall der Prostanoiden (TBX, PGF E₂, 6-keto-PGF_{1α}) (Goulet et al., 1994, Chianchi et al., 2006). Neben der Tatsache, daß AA als Substrat der COX-2 in größerer Menge zur Verfügung stand, war der Anstieg der Perfusatkonzentration von Thromboxan, Prostaglandin E₂ und 6-keto-Prostaglandin F_{1α} möglicherweise auch auf die Hochregulation der COX-2-Aktivität durch die Cysteinyl-Leukotriene zurückzuführen (Rossi et al., 2005). So untersuchten Wikström et al. (2003) den Einfluß von Leukotrienen auf die Regulation der COX-2 in Zellkulturen (Int 407/Caco 2). Dabei kam es zur vermehrten Expression von COX-2 durch Leukotriene über den MAP-Kinase-Erk-1/2-Weg und konsekutiv zum erhöhten Anfall von Prostanoiden. Der gleiche Mechanismus wurde für Tumorzellen und Makrophagen von Ratten beschrieben (Feuerstein et al., 1981; Romano und Clària, 2003).

Der vermehrte Anfall von Arachidonsäure im Sinne eines Arachidonsäure-Shift durch Blockade des Lipoxygenaseweges und der vermehrte Anfall von Prostanoiden im Rahmen der Hochregulation der COX-2 durch die Cysteinyl-Leukotriene führte allerdings nicht zu einer vermehrten Schädigung der isoliert perfundierten Rattenlunge über die Wirkung der Prostanoiden. Diese Wirkungen der Prostanoiden waren also nur bis zu einem gewissen Grad dosisabhängig. Insbesondere bestand die Schädigung der Gram-negativ stimulierten Rattenlunge aus einem engen Zusammenspiel zwischen den Produkten des Zykllooxygenase- und des Lipoxygenase-Weges. Der maßgebliche

Einfluß, den die Leukotriene auf die pathophysiologische Reaktion der Lunge haben, zeigte sich in den deutlich geringeren Anstiegen der Parameter Δ PAP, Δ VP und Δ W. Trotz in großer Menge bereitstehender Arachidonsäure als Substrat für die Zyklooxygenasen fiel die Lungenschädigung ohne den Einfluß der Leukotriene wesentlich geringer aus, als in den Kontrollversuchen. Nakata et al. (2005) stellten in ihrer Arbeit dar, daß inflammatorische Veränderungen auch in COX-2 deletierten Mäusen eintreten. Nach Vorstimulation der COX-2 deletierten Mäuse mit Ovalbumin wiesen die Tiere deutlich erhöhte Leukotrienkonzentrationen (LTC₄, LTE₄, LTD₄) und verringerte PGE-Konzentrationen auf. Nichtsdestotrotz zeigten die Mäuse ausgeprägte Entzündungserscheinungen. Ermert et al. (2000c) diskutierten in ihrer Arbeit bereits, daß die Endothelschäden und der Gewichtsanstieg der isoliert perfundierten Rattenlunge eher durch Leukotriene als durch die Produkte der Zyklooxygenase verursacht werden. Zahlreiche Autoren wiesen auf die zentrale - und bisher unterschätzte - Rolle der Leukotriene im Rahmen von Entzündungsreaktionen hin (Leff, 2001; Sharma und Mohammed, 2006; Rubin und Mollison, 2007).

Medikamentöse Interventionsmöglichkeiten erscheinen auf der Ebene des FLAP am sinnvollsten, da einerseits der Hauptweg für die durch Produkte des Lipoxygenaseweges verursachte Entzündung blockiert wird, andererseits die Wirkungen der Produkte der 12-Lipoxygenase- und der 15-Lipoxygenase-Aktivität nicht beeinflusst würden. Desweiteren könnte durch die Hemmung des FLAP auch die Produktion der Cysteinyl-Leukotriene unterbunden werden. Deren Wirkungen auf die Zellen in der isoliert perfundierten Rattenlunge konnte zwar auch mittels eines Cys-LT-Rezeptorblockers verhindert werden, allerdings wird deren Entstehung nicht verhindert. Im Hinblick auf das Modell der isoliert perfundierten Rattenlunge zeigten die Hemmung der FLAP und der CysLT-Rezeptoren einen vergleichbaren lungenprotektiven Effekt. Allerdings könnten die Cysteinyl-Leukotriene in einem intakten Organismus weitere negative Effekte auslösen; insofern scheint es sinnvoll, ihre Entstehung bereits auf der Stufe der FLAP zu verhindern. Desweiteren könnten durch die Hemmung der Leukotriensynthese auf Ebene der FLAP in Abhängigkeit vom Inhibitor Kreuzreaktionen auf andere Mitglieder der MAPEG-Familie genutzt werden.

Untersuchungen zum Gram-positiven „priming“

In Analogie zu dem beschriebenen „priming“ durch bakterielle Endotoxine, kann es auch im Rahmen von Infektionen mit Gram-positiven Bakterien zu einer „priming“-Reaktion kommen. Meist handelt es sich hierbei um nosokomiale Infektionen, die wegen ihrer zunehmenden Häufigkeit nicht zu vernachlässigen sind (De Kimpe et al., 1995). Kengatharan et al. (1998) beschrieben in ihrer Arbeit die Entstehung des Schocks und nachfolgendes Multiorganversagen am Modell der Ratte. MPD ist ein spezifisches Fragment von Peptidoglykan und verantwortlich für das Zusammenspiel mit LTA bei der Entstehung des Schocks. Desweiteren nahmen Kengatharan et al. an, daß die Struktur der Lipoteichonsäure bestimmend für die Pathogenität eines Bakteriums ist, während Peptidoglykan die durch LTA verursachten Reaktionen verstärkt. Die weitergehenden Zusammenhänge der durch Gram-positive Bakterien ausgelösten Sepsis sind in der Übersichtarbeit von Sriskandan und Cohen (1999) umfassend dargestellt. Middelveld und Alving (2000) stellten bei *in vivo* Untersuchungen am Tiermodell Schwein fest, daß sich die Wirkungen von Lipoteichonsäure und Peptidoglykan G bei der Auslösung respiratorischen Versagens und beim septischen Schock synergistisch verstärken. Peptidoglykan G zeigte bei alleiniger Gabe eine geringere Wirkung als Lipoteichonsäure, bei kombinierter Gabe war die Wirkung deutlich verstärkt.

Im Modell der isolierten Rattenlunge wurde die „priming“-Reaktion durch Gram-positive Bakterien mittels der Verwendung von Lipoteichonsäure und Peptidoglykan simuliert. LTA und Pep G sind die Hauptbestandteile der Zellwand Gram-positiver Bakterien. Neben den von Blutzellen und den vom Endothel freigesetzten Entzündungsmediatoren, beeinflussen auch im Blutplasma gelöste Faktoren die pathophysiologischen Abläufe im durch Gram-positive Bakterien verursachten Schock. Deren Wirkungen variieren stark in ihrer Wirkungsrichtung und dem Zielort der pathophysiologischen Veränderungen. Teilweise werden diese Stoffe an anderen Lokalisationen im Körper produziert und beeinflussen dann das lokale Geschehen im Sinne eines erweiterten Substratangebots (Thiemermann, 2002). Auf die Bedeutung des Komplementsystems wurde durch Kirschfink (1997) hingewiesen: Das überschüssige Komplementsystem bewirkte Gewebe- und Organschäden und kann die durch den Ablauf der Arachidonsäurekaskade verursachten Schäden weiter verstärken.

Deitch und Mancini (1993) gingen in Ihrer Arbeit ebenfalls auf die Wirkungen des aktivierten Komplementsystems im Schock ein, und beschreiben Möglichkeiten das Komplementsystem zu beeinflussen.

In den Versuchen zum Gram-positiven „priming“ der vorliegenden Arbeit wurden im Modell der isoliert perfundierten Rattenlunge die Wirkungen der verwendeten Substanzen im Einzelnen untersucht. Die Zugabe von Plasma in das Perfusat der isoliert perfundierten Rattenlunge besaß keine signifikanten Auswirkungen auf den Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks nach zweistündiger Inkubation und Zugabe von 10 µM/L Arachidonsäure zum Zeitpunkt t=120 min. Ebenso wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Anstieg des Beatmungsdrucks und der Gewichtszunahme im Vergleich zu den Kontrollversuchen ohne Plasmazugabe gemessen. Auch der Gehalt von Thromboxan, Prostaglandin E₂ und Prostaglandin F_{1α} der Kontrollversuche mit Zugabe von 1,5 ml Plasma wies keine signifikanten Änderungen im Vergleich zu den Kontrollversuchen ohne Plasmazugabe auf.

Die zweistündige Inkubation mit 20 µg/ml Lipoteichonsäure oder 20 µg/ml Peptidoglykan unter Zugabe von 1,5 ml Plasma bewirkte nach der Verabreichung von Arachidonsäure in das Perfusat keine signifikanten Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks im Vergleich zu den Kontrollversuchen mit und ohne Plasmazugabe. Auch bei den gemessenen Parametern Beatmungsdruck (ΔVP) und Gewicht (ΔW) wurden keine signifikanten Unterschiede gemessen. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von De Kimpe et al. (1995). Sie stellten in ihrer Studie fest, daß Peptidoglykan G und Lipoteichonsäure bei alleiniger Gabe nicht die gleichen Effekte auslösen konnten wie bei einer kombinierten Gabe. Auch die dreifach höhere Dosierung von Lipoteichonsäure konnte diese Effekte nicht hervorrufen. Der Gehalt von Thromboxan, Prostaglandin E₂ und Prostaglandin F_{1α} war im Vergleich zu den Kontrollversuchen signifikant erhöht, während sich im Vergleich zu den Kontrollversuchen mit Zugabe von Plasma keine signifikanten Unterschiede ergaben.

Die Kombination von 1,5 % Plasma mit 20 µg/ml Lipoteichonsäure und 20 µg/ml Peptidoglykan G bewirkte einen signifikanten (p<0,05) Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks sowohl im Vergleich mit den Kontrollversuchen ohne Plasmazugabe als auch im

Vergleich mit den Kontrollversuchen mit Plasmazugabe. Auch die Veränderungen des Beatmungsdrucks waren signifikant ($p < 0,001$). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Arbeit von De Kimpe et al. (1995). Die durchschnittliche Gewichtszunahme der isoliert perfundierten Rattenlunge war im Vergleich zu den Kontrollversuchen mit oder ohne Plasmazugabe zwar größer, allerdings waren diese Unterschiede statistisch nicht signifikant. Der Gehalt von Thromboxan, Prostaglandin E_2 und Prostaglandin $F_{1\alpha}$ war beim Gram-positiven „priming“ mit Zugabe von 1,5 ml Plasma signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrollversuchen ohne Plasmazugabe. Im Vergleich zu den Kontrollversuchen mit Zugabe von Plasma konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zum „priming“ durch Pep G und LTA im Hinblick auf den Vergleich mit den Kontrollversuchen ohne Plasmazugabe unterstreichen die Ergebnisse zahlreicher vorhergehender Arbeiten (De Kimpe et al., 1995; Kengatharan et al., 1998; Thiernemann, 2002; Wray et al., 2001; Leemans et al., 2003; Wang et al., 2003): Die Kombination von Peptidoglykan G und Lipoteichonsäure löst eine mit dem Gram-negativen „priming“ vergleichbare Reaktion der isoliert perfundierten Rattenlunge aus.

Im Hinblick auf die Reaktion der isoliert perfundierten Rattenlunge nach Gram-positiven „priming“ im Vergleich mit den Kontrollversuchen mit Zugabe von 1,5 ml Plasma wurden mit Ausnahme der Parameter ΔPAP und ΔVP keine signifikanten Unterschiede festgestellt. In der Literatur finden sich Hinweise auf im Plasma befindliche Substanzen, welche die Organ-/Zellreaktion beim Gram-positiven „priming“ beeinflussen. So beschrieben Palaniyar et al. (2002) die Entfernung Gram-positiver Bakterien aus der Lungenstrombahn unter der Mitwirkung von Collectinen der Lunge und von im Plasma gelöster Immunproteine (IIPs). Auch Dziarski (2003) weist auf das Vorhandensein von Stoffen im Plasma hin, die Peptidoglykan erkennen und direkte antimikrobielle Aktivität entwickeln können. Die genauen Wirkmechanismen dieser Substanzen sollten in weitergehenden Studien aufgeklärt werden.

7 Zusammenfassung

Das Erkrankungsbild der Sepsis besitzt trotz intensiver Forschung und auch therapeutischer Fortschritte eine immense Bedeutung. Die durch Gram-negative und zunehmend - im Rahmen nosokomialer Infektionen - durch Gram-positive Bakterien verursachte Sepsis führt zum „acute respiratory distress syndrome“ (ARDS). Im Rahmen des ARDS kommt es in der exsudativen Phase zu einer ausgeprägten Schädigung des alveolären Epithels und des vaskulären Endothels. Dies führt zum Einstrom von Flüssigkeit, Proteinen, Entzündungszellen und Erythrozyten in das Interstitium und den Alveolarraum. Induziert und gesteuert werden diese Schädigungen der Lunge durch das komplexe Zusammenspiel von proinflammatorischen und antiinflammatorischen Mediatoren. Wie diese Steuerung im Detail abläuft ist noch nicht umfassend geklärt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte aufgeklärt werden, ob die Produkte des Lipoxygenaseweges (Leukotriene) an der intrazellulären Signaltransduktion beim Gram-negativen „priming“ durch Lipopolysaccharid beteiligt sind und welche Rolle die Isoenzyme der Lipoxygenase beim Gram-negativen „priming“ spielen. Weiterhin wurde untersucht welche Wechselwirkungen zwischen dem Lipoxygenaseweg und dem Zykllooxygenaseweg im Rahmen des Gram-negativen „priming“ stattfinden; und zusätzlich sollte aufgeklärt werden, ob im Plasma gelöste Faktoren eine Rolle beim Gram-positiven „priming“ durch Peptidoglykan und Lipoteichonsäure spielen?

Als Versuchsmodell bot sich im Hinblick auf die zu untersuchende Fragestellung das Modell der isoliert perfundierten Rattenlunge an. Dabei handelt es sich um ein seit langem etabliertes Modell, das im Gegensatz zum Ganztiermodell den Vorteil bietet, die Messungen einzig an dem im Mittelpunkt des Interesses stehenden Organ durchzuführen. Die isoliert perfundierte Rattenlunge besitzt weiterhin ihre physiologischen Regulationsmechanismen und bietet daher die Möglichkeit, die pathophysiologischen Reaktionen im Rahmen der Versuchsreihen durch direkte Messung zu erfassen.

Die Inkubation der isoliert perfundierten Rattenlunge mit Lipopolysaccharid Gram-negativer Bakterien führte nach der Gabe eines weiteren inflammatorischen Stimulus wie Arachidonsäure zur „priming“-Reaktion des untersuchten Organs. Im Rahmen des „priming“ zeigte die isolierte Lunge im Vergleich zur nicht vorstimulierten Lunge eine

vielfach stärkere pathophysiologische Reaktion mit erhöhter Vaso- und Bronchoreaktivität sowie Perfusions-Ventilationsverteilungsstörungen. Diesem „priming“-Effekt lag eine erhöhte Expression verschiedener Enzymsysteme wie Lipoxygenaseenzyme, Zykllooxygenaseenzyme und NO-Synthasen zugrunde. Über den Lipoxygenaseweg wurde zunächst die 5-Hydroxyperoxyeicosatetraensäure gebildet, die das Intermediärprodukt für die 5-Hydroeicosatetraensäure und die Leukotriene A₄, B₄, C₄, D₄ und E₄ darstellte. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Funktion die Enzyme 5-Lipoxygenase, 15-Lipoxygenase, 12-Lipoxygenase sowie das 5-Lipoxygenase aktivierende Protein (FLAP) und die Blockade des Cys LT₁/Cys LT₂-Rezeptors im Rahmen der durch Zellwandbestandteile Gram-negativer Bakterien ausgelösten „priming“-Reaktion auf funktionelle Lungenfunktionsparameter und Eicosanoid-Produktion ausüben. Zur Aufklärung der Funktion der Lipoxygenase-Isoenzyme wurden deren Inhibitoren CDC, Gossypol, Kaffeesäure und Baicalein eingesetzt; im Hinblick auf den Einfluß des FLAP wurden die Inhibitoren L-655,238 und MK-886 verwendet und zur Blockade des Cys LT₁/ Cys LT₂-Rezeptors kam Bay-u9773 zum Einsatz.

Desweiteren wurde unter Verwendung von Lipoteichonsäure und Peptidoglykan G der Einfluß der Zugabe von Plasma im Rahmen des Gram-positiven „priming“ untersucht. Hierzu wurde die isoliert perfundierte Rattenlunge mit verschiedenen Kombinationen an Lipoteichonsäure und Peptidoglykan G unter Zugabe von Plasma inkubiert.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten, daß die zentrale Schaltstelle für die durch Lipopolysaccharid ausgelöste Signaltransduktion der Cys LT₁/ Cys LT₂-Rezeptor war. Die Blockade dieses Rezeptors unter Verwendung von Bay-u9773 verminderte die „priming“-Reaktion der isoliert perfundierten Lunge eindrucksvoll.

Die Blockade von 5-Lipoxygenase, 15-Lipoxygenase, 12-Lipoxygenase sowie des FLAP verminderten zwar ebenfalls die ausgeprägte Wirkung des zweiten inflammatorischen Stimulus Arachidonsäure auf das LPS-stimulierte Organ, doch konnte in den verschiedenen Kombinationen kein vergleichbar gutes Ergebnis wie bei der Verwendung von Bay-u9773 erzielt werden. Unter dem Einfluß von Bay-u9773 kam es zu einer hochsignifikanten ($p < 0,001$) Reduktion von Δ PAP und Δ VP, sowie zu einer

signifikanten ($p < 0,05$) Reduktion von ΔW . Die Prostanoiden Thromboxan, Prostaglandin E_2 und 6-keto-Prostaglandin $F_{1\alpha}$ wiesen keinen signifikanten Anstieg der Perfusatkonzentrationen auf. Leukotrien E_4 zeigte in den Versuchen mit Bay-u9773 einen hochsignifikanten ($p < 0,001$) Anstieg im Vergleich zu den Kontrollversuchen. Im Rahmen der Versuche wurde desweiteren die Wirkung der unterschiedlichen Isoenzyme und deren Bedeutung unter Berücksichtigung synergistischer Effekte aufgeklärt.

Im Rahmen des Gram-negativen „priming“ kam es bei Hemmung der Lipoxygenase-Isoenzyme zu einem Shift des Arachidonsäure-Metabolismus hin zu den Prostanoiden. Arachidonsäure steht hierbei vermehrt als Substrat für die COX-2 zur Verfügung und es kommt gleichzeitig zu einer Hochregulation der COX-2 durch die Cysteinyl-Leukotriene. Dieser Arachidonsäure-Shift findet seinen Ausdruck in den steigenden Werten von Thromboxan, Prostaglandin E_2 und 6-keto-Prostaglandin $F_{1\alpha}$. Trotz dieses Shifts wurden allerdings die Anstiege von pulmonalerteriellen Druck, Beatmungsdruck und Gewicht signifikant unter dem Einfluß von CDC, Gossypol, Kaffeesäure, Baicalein, L-655,238 und MK-886 gehemmt. Parallel hierzu sind die Werte von Leukotrien E_4 im Perfusat sehr gering. Beim Gram-negativen „priming“ sind die Lipoxygenase-Produkte entscheidend an der „priming“-Reaktion beteiligt. Ihre Wirkung entfalten die Leukotriene über Bronchokonstriktion, Permeabilitätserhöhung, Proinflammation und pulmonale Vasokonstriktion. Möglicherweise gibt es noch weitere Metaboliten des Lipoxygenaseweges, wie beispielsweise Lipoxin A/B, die Einfluß auf die „priming“-Reaktion haben.

Eine weitere Fragestellung, die im Rahmen dieser Arbeit behandelt wurde, war die Untersuchung der Bedeutung der Zugabe von Plasma im Rahmen des Gram-positiven „priming“. Bei den unter Zugabe von Plasma mit Lipoteichonsäure und Peptidoglykan G stimulierten isoliert perfundierten Rattenlunge zeigte sich, daß es keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollen mit Zugabe von Plasma gab. Es wurde in dieser Studie nicht im Einzelnen untersucht welche im Plasma gelösten Stoffe Einfluß auf das pathophysiologische Geschehen im Modell der isoliert perfundierten Rattenlunge nach Gram-positiven „priming“ haben. In der Literatur wird auf die Wirkungen des Komplementsystems im Rahmen inflammatorischer Geschehen hingewiesen.

Zum umfassenden Verständnis der Pathophysiologie septischer Erkrankungen sollten die Einflüsse weiterer Metaboliten des Lipoxygenaseweges auf die „priming“-Reaktion untersucht werden. Die Lipoxygenase-Isoenzyme stellen aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse eine wichtige Zielstruktur in der Entwicklung weiterer und besserer Behandlungsmöglichkeiten des ARDS dar.

8 Summary

In spite of intensive research and therapeutical progress, the clinical picture of sepsis still possesses an immense importance. Sepsis caused by gram-negative and increasingly - within the scope of nosocomial infections - by gram-positive bacteria leads to the acute respiratory distress syndrome (ARDS). Within the scope of ARDS a massive damage of the alveolar epithelium and vascular endothelium occurs in the exsudative phase. This leads to the influx of fluid, protein, inflammatory cells and erythrocytes into the interstitium and the alveolar space. Those damages to the lung are induced and guided by the complex interaction of proinflammatory and anti-inflammatory mediators. There are no comprehensive research results as to how this linkage occurs in detail. In this study we examined whether the products of the lipoxygenase pathway (leukotrienes) take part in the intracellular signal transduction during gram-negative “priming” and which role is played by the lipoxygenases during gram-negative “priming”. Furthermore we investigated the interaction between the lipoxygenase and the cyclooxygenase pathway during gram-negative “priming” due to lipopolysaccharide and the relevancy of plasma in gram-positive “priming” due to peptidoglycan G and lipoteichoic acid.

With respect to the question to be examined, the model of the isolated perfused rat lung lends itself as an experimental model. This is a well-established model which, as opposed to the whole animal model, has the advantage of enabling measurements only on the organ which is in the focus of interest. Furthermore, the isolated perfused rat lung still possesses its physiological regulatory mechanisms, therefore offering the opportunity to measure the pathophysiological reactions within the frame of the test series via direct measurements.

The incubation of the isolated perfused rat lung with lipopolysaccharide leads to a “priming” reaction of the examined organ after administering a second inflammatory stimulus such as arachidonic acid. Within the frame of the “priming”, the isolated lung, as opposed to the non-prestimulated lung shows a much stronger pathophysiological reaction with higher vaso- and bronchoreactivity as well as perfusion-ventilation mismatch. This “priming” effect is based on an increased expression of various enzyme systems like lipoxygenase enzyme, cyclooxygenase enzyme and NO-synthase. Initially,

5-hydroxyperoxyeicosatetraenoic acid is formed through the lipoxygenase way, which is the intermediary product for 5-hydroeicosatetraenoic acid and leukotriene A₄, B₄, C₄, D₄ and E₄. In the present thesis the function of the AA metabolites 5-lipoxygenase, 15-lipoxygenase, 12-lipoxygenase as well as that of the 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) and the blockage of the Cys LT₁/Cys LT₂ receptor within the frame of the “priming” reaction triggered through cell-wall components of gram-negative bacteria was examined. To clarify the function of lipoxygenase isoenzymes, their inhibitors CDC, gossypol, caffeic acid and baicalein were used; with respect to the influence of the 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP), the inhibitors L-655,238 and MK-886 were used, and Bay-u9773 was employed for the blockage of the Cys LT₁/Cys LT₂ receptor.

Furthermore, the influence of plasma within the frame of gram-positive “priming” was examined using lipoteichoic acid and peptidoglycan G. For this purpose, the isolated perfused rat lung was incubated with various combinations of lipoteichoic acid and peptidoglycan G, adding plasma.

The results of the examinations show that the Cys LT₁/Cys LT₂ is the central switch point for the signal transduction triggered by lipopolysaccharide. The blockage of this receptor using Bay-u9773 impressively lessens the “priming” reaction of the isolated perfused lung.

The blockage of 5-lipoxygenase, 15-lipoxygenase, 12-lipoxygenase as well as the 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) also decreases the fatal effect of the second inflammatory stimulus arachidonic acid on the LPS-stimulated organ, but no equally good result could be achieved in the various combinations as the one achieved through the use of Bay-u9773. The administration of Bay-u9773 led to a highly significant ($p < 0,001$) reduction of Δ PAP and Δ VP, as well as to a significant ($p < 0,05$) reduction of Δ W. The prostanoids thromboxane, prostaglandin E₂ and 6-keto-prostaglandin F_{1 α} showed no significant increase of their concentration. The concentration of leukotriene E₄ was highly significant ($p < 0,001$) increased during the experiments using Bay-u9773. Furthermore, the effect of the various isoenzymes and their importance with respect to synergistic effects were clarified within the frame of the experiments.

Within the frame of the gram-negative “priming”, inhibition of lipoxygenase isoenzymes led to a shift of the arachidonic acid metabolism towards prostanoids. This is expressed through the increasing values of thromboxane, prostaglandin E₂ and 6-keto-prostaglandin F_{1α}. In spite of this shift, the increase of pulmonary arterial pressure, ventilation pressure and weight were significantly inhibited under the influence of CDC, gossypol, caffeic acid, baicalein, L-655,238 and MK-886. Parallel to this, the values of leukotriene E₄ in the perfusate were very low. In gram-negative “priming” the lipoxygenase metabolites play a vital part in the “priming” reaction. Leukotrienes develop their effect through bronchoconstriction, increase of permeability, proinflammation and pulmonary vasoconstriction. It is possible that there are further metabolites of the lipoxygenase way, like for example lipoxin A/B, which have an influence on the “priming” reaction.

Another question examined within the frame of this thesis was the examination of the significance of plasma within the frame of gram-positive “priming”. There were no significant differences between the isolated perfused rat lungs stimulated with plasma, lipoteichoic acid and peptidoglycan G and the check tests. The influence of substances dissolved in the plasma on the pathophysiological process in the model of the isolated perfused rat lung after gram-positive “priming” was not examined in detail in this study. In the literature, the effect of the complement system in the frame of inflammatory processes is pointed out.

To ensure global understanding of the pathophysiology of septic illness the influence of other metabolites of the lipoxygenase way on the “priming” reaction should be examined. Because of the results achieved in this thesis, the lipoxygenase isoenzymes are an important target structure in the development of further and better treatments of ARDS.

9 Literaturverzeichnis - Referenzen

Aasen A.O., J.E. Wang. Mediator responses in surgical infections. *Surg. Infect. (Larchmt)* 2006; Suppl 2: 3-4

Abramovitz M., E. Wong, M.E. Cox, C.D. Richardson, C. Lil, P.J. Vickers 5-lipoxygenase activating protein stimulates the utilization of arachidonic acid by 5-lipoxygenase. *Eur. J. Biochem.* 1993; 215: 105-111

Ahn C.M., H. Sandler, T. Saldeen. Beneficial effects of a leukotriene receptor antagonist on thrombin-induced pulmonary edema in the rat. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 1995; 53(6): 433-438

Aird W.C. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood* 2003; 101: 3765-3777

Alvarez D.F., E.B. Gjerde, M.I. Townsley. Role of EETs in regulation of endothelial permeability in rat lung. *Am. J. Physiol.* 2004; 286: L445-L451

Amann R., R. Schuligoi, B.A. Peskar. Eicosanoid release in the endotoxin-primed isolated perfused rat lung and its pharmacological modification. *Inflamm. Res.* 1999; 48: 632-636

Amrani Y., R.A.Panettieri. Airway smooth muscle: contraction and beyond. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2003; 35(3): 272-276

Anderson K.V. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 2000; 12: 13-19.

Austen K.F., A. Maekawa, Y. Kanaoka, J.A. Boyce. The leukotriene E4 puzzle: finding the missing pieces and revealing the pathobiologic implications. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009; 124(3): 406-414

Bannenberg G., R.L. Moussignac, K. Gronert, P.R. Devchand, B.A. Schmidt, W.J. Guilford, J.G. Bauman, B. Subramanyam, H.D. Perez, J.F. Parkinson, C.N. Serhan Lipoxins and novel 15-epilipoxin analogs display potent antiinflammatory actions after oral administration. *Brit. J.Pharm.* 2004; 143: 43-52

Barnes N.C., P.J. Piper, J.F. Costello. Comparative actions of inhaled leukotriene C4, leukotriene D4 and histamine in normal human subjects. *Thorax* 1984; 39: 500-504

Bertram T.A., L.H. Overby, R. Danilowicz, T.E. Elling, A.R. Brody. Pulmonary intravascular macrophages produce prostaglandins and leukotrienes in vitro. *Chest* 1988; 93: 82S-84S

Bersten A.D., K. Davidson, T.E. Nicholas, I.R. Doyle. Respiratory mechanics and surfactant in the acute respiratory distress syndrome. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1998; 25(11): 955-963

Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 2004; 430(6996): 257-263

Bone, R.C., R.A. Balk, F.B. Cerra, R.P. Dellinger, A.M. Fein, W.A. Knaus, R.M. Schein, W.J. Sibbald American college of chest physicians / society of critical care medicine consensus conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit. Care. Med.* 1992; 20: 864

Brinckmann R., M. S. Topp, I. Zalán, D. Heydeck, P. Ludwig, H. Kühn, W.E. Berdel, J.R. Habenicht Regulation of 15-lipoxygenase expression in lung epithelial cells by interleukin-4. *Biochem. J.* 1996; 318: 305-312

Brun-Buisson C. The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med.* 2000; 26: 64-74

Bürkert E., D. Szellas, O. Rådmark, D. Steinhilber, O. Werz Cell type-dependent activation of 5-lipoxygenase by arachidonic acid. *J. Leukoc. Biol.* 2003; 73: 191-200

Burhop K. E., W. M. Selig, A. B. Malik. Monohydroxyeicosatetraenoic acids (5-HETE and 15-HETE) induce pulmonary vasoconstriction and edema. *Circ. Res.* 1988; 62: 687-698

Burgess C.A., B.K. McCandless, J.A. Cooper, A.B. Malik. Leukotriene B4 increases pulmonary transvascular filtration by a neutrophil-independent mechanism. *J. Appl. Physiol.* 1990; 68: 1260-1264

Busse W.W. Leukotrienes and inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998; 157: 210-213

Buttenschoen K., M. Kormann, D. Berger, G. Leder, H.G. Berger, C. Vasilescu. Endotoxemia and endotoxin tolerance in patients with ARDS. *Langenbecks Arch. Surg.* 2008; 393: 473-478

Campbell W.B., J.R. Falck. Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Hypertension* 2007; 49: 590-596

Chanez P., C. Bonnans, C. Chavis, I. Vachier. 15-lipoxygenase, a Janus enzyme. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2002; 27: 655-658

Chen H.I., S.J. Kao, D. Wang, R.P. Lee, C.F. Su. Acute respiratory distress syndrome. *J. Biomed. Sci.* 2003; 10: 588-592

Cianchi F., C. Cortesini, L. Magnelli, E. Fanti, L. Papucci, N. Schiavone, L. Messerini, A. Vannacci, S. Capaccioli, F. Perna, M. Lulli, V. Fabbroni, G. Perigli, P. Bechi, E. Masini. Inhibition of 5-lipoxygenase by MK886 augments the antitumor activity of celecoxib in human colon cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 2006; 5(11): 2716-2726

Cho, H., M. Ueda, M. Tamaoka, M. Hamaguchi, K. Aisaka, Y. Kiso, T. Inoue, R.Ogino, T. Tatsuoka, T. Ishihara, T. Noguchi, I. Morita, S. Murota. Novel caffeic acid derivatives: extremely potent inhibitors of 12-lipoxygenase. *J. Med. Chem.* 1991; 34: 1503-1505

Chu S., L. Tang, E. Watney, E.Y. Chi, W.R. Henderson Jr. In situ amplification of 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein in allergic airway inflammation and inhibition by leukotriene blockade. *J. Immunol.* 2000; 165: 4640-4648

Coffey M. J., S. M. Phare, M. Peters-Golden. Prolonged exposure to lipopolysaccharide inhibits macrophage 5-lipoxygenase metabolism via induction of nitric oxide synthesis. *J. Immunol.* 2000; 165: 3592-3598

Cohen L., A. Haziot, D.R. Shen, X.-Y. Lin, C. Sia, R. Harper, J. Silver, J.M. Goyert. CD14-independent responses to LPS require a serum factor that is absent from neonates. *J. Immunol.* 1995; 155: 5337-5342

Conrad D. J., M. Lu. Regulation of 12/15-lipoxygenase by Stat6-dependent transcription. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2000; 22: 226-234

Contant C.F., A.B. Valadka, S.P. Gopinath, H.J. Hannay, C.S. Robertson. Adult respiratory distress syndrome: a complication of induced hypertension after severe head injury. *J. Neurosurg.* 2001; 95(4): 560-568

Cook J.A., E.J. Li, K.M. Spicer, W.C. Wise, P.V. Halushka. Effect of leukotriene receptor antagonists on vascular permeability during endotoxic shock. *Circ. Shock* 1990; 32(3): 209-218

Corey E.J., H. Niwa, J.R. Falck C. Mioskowski, Y. Arai, A. Marfat Recent studies on the chemical synthesis of eicosanoids. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.* 1980; 6: 19-25

Dauphinee S.M., A. Karsan. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab. Invest.* 2006; 86: 9-22

Davidson D., D. Drafta. Prolonged pulmonary hypertension caused by platelet-activating factor and leukotriene C4 in the rat lung. *J. Appl. Physiol.* 1992; 73(3): 955-961

Davidson K.G., A.D. Bersten, H.A. Barr, K.D. Dowling, T.E. Nicholas, I.R. Doyle. Endotoxin induces respiratory failure and increases surfactant turnover and respiration independent of alveolocapillary injury in rats. *Am. J Respir. Crit. Care Med.* 2002; 165(11): 1516-1525

Deitch EA., M.C. Mancini. Complement receptors in shock and transplantation. *Arch. Surg.* 1993; 128: 1222-6

De Kimpe S.J., M.K. Kengatharan, C. Thiernemann, J.R. Vane. The cell wall components peptidoglykan and lipoteichoic acid from *staphylococcus aureus* act in synergy to cause shock and multiple organ failure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995; 92: 10359-10363

Drazen M.J., K.F. Austen, R.A Lewis, D.A. Clark, G. Goto, A. Marfat, E.J. Corey. Comparative airway and vascular activities of leukotriens C-1 and D *in vivo* and *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1980; 77: 4354-4358

Dziarski R. Recognition of bacterial peptidoglycan by the innate immune system. *Cell. Mol. Life Sci.* 2003; 60(9): 1793-1804

Egan K., G.A. FitzGerald. Eicosanoids and the vascular endothelium. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2006; 176 Pt 1: 189-211

El Samalouti V., T. Schletter, I. Chyla, A. Lentschat, U. Mamat, L. Brade, H.D. Flad, A.J. Ulmer, L. Hamann. Identification of the 80 kDa LPS-binding protein (LMP80) as decay-acceleration factor (DAF,CD55). *Fems Immunol. Med. Microbiol.* 1999; 23: 258-269

Ermert L., M. Ermert, M. Goppelt-Struebe, D. Walmrath, F. Grimminger, W. Steudel, H.A. Ghofrani, C. Homberger, H. Duncker, W. Seeger Cyclooxygenase isoenzyme localization and mRNA expression in rat lungs. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1998; 18: 479-488

Ermert L., M. Ermert, A. Althoff, M. Merkle, F. Grimminger, W. Seeger. Vasoregulatory prostanoid generation proceeds via cyclooxygenase-2 in noninflamed rat lungs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998; 286(3): 1309-1314

Ermert L., M. Ermert, M. Merkle, M. Goppelt-Struebe, H.-R. Duncker, F. Grimminger, W. Seeger. Rat pulmonary cyclooxygenase-2 expression in response to endotoxin challenge: differential regulation in the various types of cells in the lung. *Am. J. Pathol.* 2000; 156: 1275-1287

Ermert M., M. Merkle, R. Mootz, F. Grimminger, W. Seeger, L. Ermert. Endotoxin priming of the cyclooxygenase-2-thromboxane axis in isolated rat lungs. *Am. J. Physiol.* 2000; 287: L1195-L1203

Ermert M., C. Ruppert, A. Günther, H.-R. Duncker, F. Grimminger, W. Seeger, L. Ermert. Cell-specific nitric oxide synthase-isoenzyme expression and regulation in response to endotoxin in intact rat lungs. *Lab. Invest.* 2002; 82: 425-441

Erridge C., S. Kennedy, C.M. Spickett, D.J. Webb. Oxidized phospholipid inhibition of toll-like receptor (TLR) signaling is restricted to TLR2 and TLR4: roles for CD14, LPS-binding protein, and MD2 as targets for specificity of inhibition. *J. Biol. Chem.* 2008; 283(36): 24748-24759

Faraci F.M., C.G. Sobey, S. Chrissobolis, D.D. Lund, D.D. Heistad, N.L. Weintraub Arachidonate dilates basilar artery by lipoxygenase-dependent mechanism and activation of K⁺ channels. *Am. J. Physiol.* 2001; 281: R246-R253

Feuerstein N., J.A. Bash, J.N. Woody, P.W. Ramwell. Leukotriene C stimulates prostaglandin release from rat peritoneal macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1981; 100 (3): 1085-1090

Fink M.P., K.L. Kruithoff, J.B. Antonsson, H.L. Wang, H.R. Rothschild. Delayed treatment with an LTD₄/E₅ antagonist limits pulmonary edema in endotoxic pigs. *Am. J. Physiol.* 1991; 260: R1007-R1013

Fiorucci S., R. Meli, M. Bucci, G. Cirino. Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy? *Biochem. Pharmacol.* 2001; 62(11): 1433-1438

Fisher A.B., N. Itakura, C. Dodia, R.G. Thurman. Relationship between alveolar PO₂ and the rate of p-nitroanisole O-demethylation by the cytochrome P-450 pathway in isolated rabbit lungs. *J. Clin. Invest.* 1979; 64(3): 770-774

Fleming I. Cytochrome P450 and vascular homeostasis. *Circ. Res.* 2001; 89: 753-762

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

Furuichi K., T. Wada, Y. Iwata, S. Kokubo, A. Hara, J. Yamahana, T. Sugaya, Y. Iwakura, K. Matsushima, M. Asano, H. Yokoyama, S. Kaneko. Interleukin-1-dependent sequential chemokine expression and inflammatory cell infiltration in ischemia-reperfusion injury. *Crit. Care Med.* 2006; 34(9): 2447-2455

Glauser F.L., P. Egan, J.E. Millen, P. Fischer, K. Propst, J. Lewis, K. Chetty. The effect of salicylate infusion on the alveolar epithelial membrane in the isolated perfused lung. *Crit. Care Med.* 1978; 6(3): 181-184

Gugliucci A., L. Ranzato, L. Scorrano, R. Colonna, V. Petronilli, C. Cusan, M. Prato, M. Mancini, F. Pagano, P. Bernardi. Mitochondria are direct targets of the lipoxygenase inhibitor MK 886. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 31789-31795

Gottschlich, B., M. Ragaller. Pathophysiologie der Sepsis: Grundlagen und Monitoring. *Homepage der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie der TU Dresden.* 2007

Goulet J.L., J.N. Snouwaert, A.M. Latour, T.M. Coffman, B.H. Koller. Altered inflammatory responses in leukotriene-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994; 91: 12852-12856

Gourine A. V., D. M. Poputnikov, N. Zhernosek, E.V. Melenchuk, R. Gerstberger, K.M. Spyer, V.N. Gourine. P2 receptor blockade attenuates fever and cytokine response induced by lipopolysaccharide in rats. *Brit. J. Pharmacol.* 2005; 146: 139-145

Grandel U., F. Grimminger. Endothelial responses to bacterial toxins in sepsis. *Crit. Rev. Immunol.* 2003; 23: 267-99

Grimminger F., D. Walmrath, R.G. Birkemeyer, S. Bhakdi, W. Seeger. Leukotriene and hydroxyeicosatetraenoic acid generation elicited by low doses of *escherichia coli* hemolysin in rabbit lungs. *Infection and Immunity* 1990; 58: 2659-2663

Hack C.E., S. Zeerleder. The endothelium in sepsis: Source of and a target for inflammation. *Crit. Care Med.* 2001; 29: S21-S27

Hanaoka M., R.L. Ge, T. Kaneki, T. Koizumi, T. Kobayashi, K. Kubo. Effect of tacrolimus on endotoxin-induced lung injury in sheep. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2002; 130(1): 89-97

Harmanci K. Montelukast: its role in the treatment of childhood asthma. *Ther. Clin. Risk Manag.* 2007; 3: 885-892

Hashimoto C., K.L. Hudson, K.V. Anderson. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 1988; 52: 269-279

Henderson W. R. The role of leukotrienes in inflammation. *Ann. Internal Med.* 1994; 121: 684-697

Holgate S.T., M. Peters-Golden, R.A. Panettieri, W.R. Henderson Jr. Roles of cysteinyl leukotrienes in airway inflammation, smooth muscle function, and remodeling. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003; 111(1 Suppl): S18-S34

Ingalls R.R., D.T. Golenbock. CD11c/Cd18, a transmembrane signaling receptor for lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 1995; 181: 1473-1479

Jan C., Tseng C. MK-886, a leukotriene biosynthesis inhibitor, as an activator of Ca²⁺ mobilization in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 2000; 294: 96-102

Jeyaseelan S, H.W. Chu, S.K. Young, M.W. Freeman, G.S. Worthen. Distinct roles of pattern recognition receptors CD14 and Toll-like receptor 4 in acute lung injury. *Infect. Immun.* 2005; 73(3): 1754-1763

Jones J.E., J.L. Walker, Y. Song, N. Weiss, W.V. Cardoso, R.M. Tuder, J. Loscalzo, Y.Y. Zhang. Effect of 5-lipoxygenase on the development of pulmonary hypertension in rats. *Am. J. Physiol.* 2004; 286(5): H1775-H1784

Jones R.L., Y. Qian, H.N. Wong, H. Chan, A.P. Yim. Prostanoid action on the human pulmonary vascular system. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1997; 24(12): 969-972

Jonsson E.W. Functional characterisation of receptors for cysteinyl leukotrienes in smooth muscle. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 1998; 641: 1-55

Kadowitz P.J., A.L. Hyman. Analysis of responses to leukotriene D4 in the pulmonary vascular bed. *Circ. Res.* 1984; 55: 707-717

Kato A., T. Ogasawara, T. Homma, H. Saito, K. Matsumoto. Lipopolysaccharide-binding protein critically regulates lipopolysaccharide-induced IFN-beta signaling pathway in human monocytes. *J. Immunol.* 2004; 172(10): 6185-6194

Kawajiri H., D.Zhuang, N. Qiao, T. Yoshimoto, M. Yamamoto, S. Iseki, K. Hamaguchi. Expression of arachidonate 12-lipoxygenase in rat tissues: a possible role in glucagon secretion. *J. Histochem. Cytochem.* 2000; 48: 1411-1419

Kengatharan K., S. J. De Kimpe, C. Thiemermann. Role of nitric oxide in the circulatory failure and organ injury on a rodent model of Gram-positive shock. *Brit. J. Pharmacol.* 1996; 119: 1411-1421

Kengatharan K.M., S. de Kimpe, C. Robson, S.J. Foster, C. Thiemermann. Mechanism of Gram-positive shock : Identification of peptidoglykan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock and multiple organ failure. *J. Exp. Med.* 1998; 188: 305-315

Keppler D., M. Müller, C. Klünemann, A. Guhlmann, K. Krauss, J. Müller, U. Berger, I. Leier, E. Mayatepek. Transport and *in vivo* elimination of cysteinyl leukotrienes. *Adv. Enzyme Regul.* 1992; 32: 107-16

Kirschfink M. Controlling the complement system in inflammation. *Immunopharmacology* 1997; 38 (1-2): 51-62

Klausner J.M., I.S. Paterson, J.A. Mannick, R. Valeri, D. Shepro, H.B. Hechtman. Reperfusion pulmonary edema. *JAMA* 1989; 17; 261(7): 1030-35

Leemans J.C., M. Heikens, K.P. van Kessel, S. Florquin, T. van der Poll. Lipoteichoic acid and peptidoglykan from *Staphylococcus aureus* synergistically induce neutrophil influx into the lungs of mice. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003; 10(5): 950-953

Lefer A. M., G.L. Stahl, D.J. Lefer, M.E. Brezinski, K.C. Nicolaou, C.A. Veale, Y. Abe, J.B. Smith. Lipoxins A₄ and B₄: Comparison of eicosanoids having bronchoconstrictor and vasodilator actions but lacking platelet aggregatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1988; 85: 8340-8344

Leff A.R. Discovery of leukotrienes and development of antileukotriene agents. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2001; 86: 4-8

Leitch A.G. Leukotrienes and the lung. *Rev. Mal. Respir.* 1984; 1(6): 329-336

Loick H.M, J.L. Theissen. Die Eicosanoide als Mediatoren beim ARDS. *AINS* 1994; 1: 3-9

Loppnow H., F. Stelter, U. Schonbeck, C. Schuler, M. Ernst, C. Schutt, H.D. Flad. Endotoxin activates human vascular smooth muscle cells despite lack of expression of CD14 mRNA or endogenous membrane CD14. *Infect. Immun.* 1995; 63: 1020-1026

Lynn W.A., Y. Lui, D.T. Golenbock. Neither CD14 nor serum is absolutely necessary for activation of mononuclear phagocytes by bacterial lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 1993; 61: 4452-4461

Mancini J.A., H. Waterman, D. Riedenau. Cellular oxygenation of 12-hydroxyeicosatetraenoic acid and 15-hydroxyeicosatetraenoic acid by 5-lipoxygenase is stimulated by 5-lipoxygenase-activating protein. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 32842-32847

Mancini J.A., K. Blood, J. Guay, R. Gordon, D. Claveau, C.C. Chan, D. Riendeau. Cloning, expression, and up-regulation of inducible rat prostaglandin E synthase during lipopolysaccharide-induced pyresis and adjuvant-induced arthritis. *J. Bio. Chem.* 2001; 276: 4469-4475

Mancuso P., J. Whelan, S.J. DeMichele, C.C. Snider, J.A. Guszcza, K.J. Claycombe, G.T. Smith, T.J. Gregory, M.D. Karlstad. Effects of eicosapentaenoic and gamma-linolenic acid on lung permeability and alveolar macrophage eicosanoid synthesis in endotoxic rats. *Crit. Care. Med.* 1997; 25(3): 523-32

Mandal A. K., J. Skoch, B. J. Bacskai, B.T. Hyman, P. Christmas, D. Miller, T.T. Yamin, S. Xu, D. Wisinewski, J.F. Evans, R.J. Sobermann. The membrane organization of leukotriene synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004; 101: 6587-6592

Maniatis N.A., A. Kotanidou, J.D. Catravas, S.E. Orfanos. Endothelial pathomechanisms in acute lung injury. *Vascul. Pharmacol.* 2008; 49(4-6): 119-133

Mao J. T., I. Tsu, S. M. Dubinett, B. Adams, T. Sarafian, F. Baratelli, M.D. Roth, K.J. Serio. Modulation of pulmonary leukotriene B4 production by cyclooxygenase-2 inhibitors and lipopolysaccharide. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 6872-6878

Marcus A. J. The eicosanoids in biology and medicine. *J. Lipid Res.* 1984; 25: 1511-1516

McMillan R.M. Leukotrienes in respiratory disease. *Pediatr. Respir. Rev.* 2001; 2(3): 238-244

Medzhitov R., P. Preston-Hurlburt, C.A. Janeway Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388: 394-397

Meng X., B.S. Khanuja, Y.T. Ip. Toll receptor-mediated Drosophila immune response requires Dif, an NF- κ B factor. *Genes Dev.* 1999; 13: 792-797

Michaelis U.R., J.R. Falck, R. Schmidt, R. Busse, I. Fleming. Cytochrome P450C9-derived epoxyeicosatrienoic acids induce the expression of cyclooxygenase-2 in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005; 25: 321-326

Middelveld R.J., K. Alving. Synergistic septicemic action of the gram-positive bacterial cell wall components peptidoglycan and lipoteichoic acid in the pig in vivo. *Shock* 2000; 13(4): 297-306

Miller A.W., P.V.G. Katakam, H-C. Lee, C.D. Tulbert, D.W. Busija, N.L. Weintraub. Arachidonic acid-induced vasodilation of rat small mesenteric arteries is lipoxygenase-dependent. *J. Pharmacol. Epx. Ther.* 2003; 304: 139-144

Moxley M.A., W.J. Longmore. Effect of experimental diabetes and insulin on lipid metabolism in the isolated perfused rat lung. *Biochem. Biophys. Acta* 1977; 488(2): 218-224

Muller B. Pharmacology of thromboxane A₂, prostacyclin and other eicosanoids in the cardiovascular system. *Therapie* 1991; 46(3): 217-221

Munro N. Pulmonary challenges in neurotrauma. *Crit. Care Nurs. Clin. North Am.* 2000; 12(4): 457-464

Muskardin D.T., N.F. Voelkel, F.A. Fitzpatrick. Modulation of pulmonary leukotriene formation and perfusion pressure by bestatin, an inhibitor of leukotriene A₄ hydrolase. *Biochem. Pharmacol.* 1994; 48(1): 131-137

Nagai Y, S. Akashi, M. Nagafuku, M. Ogata, Y. Iwakura, S. Akira, T. Kitamura, A. Kosugi, M. Kimoto, K. Miyake. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat. Immunol.* 2003; 3: 667-672

Nakata J., M. Kondo, J. Tamaoki, T. Takemiya, M. Nohara, K. Yamagata, A. Nagai. Augmentation of allergic inflammation in the airways of cyclooxygenase-2-deficient mice. *Respirology* 2005; 10(2): 149-156

Ndengele M.M., C. Muscoli, Z.Q. Wang, T.M. Doyle, G.M. Matuschak, D. Salvemini. Superoxide potentiates NF-kappaB activation and modulates endotoxin-induced cytokine production in alveolar macrophages. *Shock* 2005; 23(2): 186-193

Nie D., K. Tang, C. Diglio, K.V. Honn. Eicosanoid regulation of angiogenesis: role of endothelial arachidonate 12-lipoxygenase. *Blood* 2000; 95: 2304-2311

Noonan T.C., W.M. Selig, K.E. Burhop, C.A. Burgess, A.B. Malik. Pulmonary microvascular response to LTB4: effects of perfusate composition. *J. Appl. Physiol.* 1988; 64: 1989-1996

Noonan T.C., A.B. Malik. Pulmonary vascular response to leukotriene D4 in unanesthetized sheep: role of thromboxane. *J. Appl. Physiol.* 1986; 60: 765-769

Ogletree M.L., K.L. Brigham, J.A.Oates, W.C. Hubbard. Increased flux of 5-HETE in sheep lung lymph during pulmonary leukostasis after endotoxin. *Fed. Proc.* 1981; 40: 767

Ohnishi T., M. Muroi, K. Tanamoto. The lipopolysaccharide-recognition mechanism in cells expressing TLR4 and CD14 but lacking MD-2. *Immunol. Med. Microbiol.* 2007; 51(1): 84-91

Olson N.C., K.T. Kruse-Elliott, L. Johnson. Effect of LY171883 on endotoxin-induced lung injury in pigs. *J. Appl. Physiol.* 1990; 69: 1315-1322

Olson N.C., P.B. Joyce L.N. Fleisher. Role of platelet activating factor and eicosanoids during endotoxin induced lung-injury in pigs. *Am. J. Phys.* 1990; 258: H1674-H1686

Olson N.C., P.W. Hellyer, J.R. Dodam. Mediators and vascular effects in response to endotoxin. *Brit. Vet. J.* 1995; 151(5): 489-522

Orfanos S.E., I. Mavrommati, I. Korovesi, C. Roussos. Pulmonary endothelium in acute lung injury: from basic science to the critically ill. *Intens. Care Med.* 2004; 30(9): 1702-1714

Parameswaran K., K. Radford, A. Fanat, J. Stephen, C. Bonnans, B.D. Levy, L.J. Janssen, P.G. Cox. Modulation of human airway smooth muscle migration by lipid mediators and Th-2 cytokines. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2007; 37(2): 240-247

Palaniyar N., J. Nadesalingam, K.B. Reid. Pulmonary innate immune proteins and receptors that interact with gram-positive bacterial ligands. *Immunobiology* 2002; 205(4-5): 575-594

Peters-Golden M. Cell biology of the 5-lipoxygenase pathway. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998; 157: 272-232

Peters-Golden M., C. Canetti, P. Mancuso, M. J. Coffey. Leukotriens: Underappreciated mediators of innate immune responses. *J. Immunol.* 2004; 173: 589-594

Piao W, C. Song, H. Chen, M.A. Diaz, L.M. Wahl, K.A. Fitzgerald, L. Li, A.E. Medvedev. Endotoxin tolerance dysregulates MyD88- and Toll/IL-1R domain-containing adapter inducing IFN-beta-dependent pathways and increases expression of negative regulators of TLR signaling. *J. Leukoc. Biol.* 2009; 86(4): 863-875

Profita M., A. Sala, L. Riccobono, E. Pace, A. Paternò, S. Zarini, L. Siena, A. Mirabella, G. Bonsignore, A.M. Vignola. 15(S)-HETE modulates LTB₄ production and neutrophil chemotaxis in chronic bronchitis. *Am. J. Physiol.* 2000; 279: C1249-C1258

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

Pugin J., G. Verghese, M.C. Widmer, M.A. Matthay. The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. *Crit. Care Med.* 1999; 27(2): 304-312

Reid G. K., S. Kargman, P. J. Vickers, J.A. Mancini, C. Léveilé, D. Ethier, D.K. Miller, J.W. Gillard, R.A. Dixon, J.F. Evans Correlation between expression of 5-lipoxygenase-activating protein, 5-lipoxygenase, and cellular leukotriene synthesis. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 19818-19823

Ramos C.D., C. Canetti, J.T. Souto, J.S. Silva, C.M. Hogaboam, S.H. Ferreira, F.Q. Cunha. MIP-1alpha [CCL3] acting on the CCR1 receptor mediates neutrophil migration in immune inflammation via sequential release of TNF-alpha and LTB4. *J. Leukoc. Biol.* 2005; 78(1): 167-177

Rietschel E.T., H. Brade. Bacterial endotoxins. *Sci. Am.* 1992; 1267: 54-61

Rietschel E.T., H. Brade, O. Holst, L. Brade, S. Muller-Loennies, U. Mamat, U. Zahringer, F. Beckmann, U. Seydel, K. Brandenburg, A.J. Ulmer, T. Mattern, H. Heine, J. Schletter, H. Loppnow, U. Schonbeck, H.D. Flad, S. Hauschildt, F.U. Schade, F. DiPadova, S. Kusumoto, R.R. Schumann. Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and biological detoxification. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1994a; 216: 39-81

Rietschel E.T., T. Kirikae, F.U. Schade, U. Mamat, G. Schmidt, H. Loppnow, A.J. Ulmer, U. Zahringer, U. Seydel, F. DiPadova, M. Schreier, H. Brade. Bacterial endotoxin: Molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* 1994b; 8: 217-225

Rietschel E.T., T. Kirikae, F.U. Schade, A.J. Ulmer, O. Holst, H. Brade G. Schmidt, U. Mamat, H.D. Grimmecke, S. Kusumoto, U. Hringler. The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity. *Immunobiol.* 1993; 187: 169-190

Rietschel E.T., U. Seydel, U. Zahringer, F.U. Schade, L. Brade, H. Loppnow, W. Feist, M.H. Wang, A.J. Ulmer, H.D. Flad, K. Brandenburg, T. Kirikae, D. Grimmecke, O. Holst, H. Brade. Bacterial endotoxin: Molecular relationships of structure to activity and function. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 1991; 5(4): 753-779

Rock F.L., G. Hardiman, J.C. Timans, R.A. Kastelein, J.F. Bazan. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 588-593

Romano M., J. Clària. Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase converging functions on cell proliferation and tumor angiogenesis: implications for cancer therapy. *FASEB J.* 2003; 17: 1986-1995

Rossi A., A.M. Acquaviva, F. Iuliano, R. DiPaola, S. Cuzzocrea, L. Sautebin. Up-regulation of prostaglandin biosynthesis by leukotriene C4 in elicited mice peritoneal macrophages activated with lipopolysaccharide/interferon- γ . *J. Leukoc. Biol.* 2005; 78(4): 985-991

Roth D.M., D.J. Lefer, C.E. Hock, A.M. Lefer. Effects of peptide leukotrienes on cardiac dynamics in rat, cat and guinea pig hearts. *Am. J. Physiol.* 1985; 249: H477-H484

Rubin P., K.W. Mollison. Pharmacotherapy of diseases mediated by-lipoxygenase pathway eicosanoids. *Prostagland. Lipid Mediat.* 2007; 83(3): 188-197

Rutschmann S., A.C. Jung, C. Hetru, J.M. Reichhart, J.A. Hoffmann, D. Ferrandon. The Rel protein DIF mediates the antifungal but not the antibacterial host defense in *Drosophila*. *Immunity* 2000; 12: 569-580

Sakata K., S.E. Dahlén, M. Bäck. The contractile action of leukotriene B4 in the guinea-pig lung involves a vascular component. *Br. J. Pharmacol.* 2004; 141(3): 449-456

Samuelsson B.P., P. Borgeat, S. Hammarström, R.C. Murphy. Leukotriens: a new group of biologically active compounds. *Adv. Prost. Thromb. Res.* 1980; 6: 1-18

Samuelsson B.P., S.Dahlen, J. Lindgren. Leukotriens and lipoxins: Structure, biosynthesis and biological effects. *Science* 1987; 237: 1171-1178

Schletter J., H. Heine, A.J. Ulmer, E.T. Rietschel. Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Arch. Microbiol.* 1995; 164(6): 383-389

Schnyder-Candrian S, V.F. Quesniaux, F. DiPadova, I. Maillet, N. Noulin, I. Couillin, R. Moser, F. Erard, B.B. Vargaftig, B. Ryffel, B. Schnyder. Dual effects of p38 MAPK on TNF-dependent bronchoconstriction and TNF-independent neutrophil recruitment in lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome. *J. Immunol.* 2005; 175(1): 262-269

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

Seeger W., M. Bauer, S. Bhakdi. Staphylococcal alpha-toxin elicits hypertension in isolated rabbit lungs. Evidence for thromboxane formation and the role of extracellular calcium. *J. Clin. Invest.* 1984; 74: 849-858

Seeger W., G. Stöhr, H.R.D Wolf, H. Neuhof. Alteration of surfactant function due to protein leakage: special interaction with fibrin monomer. *J. Appl. Physiol.* 1985; 587: 326-338

Seeger W., N. Suttorp. Role of membrane lipids in the pulmonary vascular abnormalities caused by bacterial toxins. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1987; 136: 462-466

Seeger W., D. Walmrath, M. Menger, H. Neuhof. Increased lung vascular permeability after arachidonic acid and hydrostatic challenge. *J. Appl. Physiol.* 1986; 61(5): 1781-1789

Seeger W., H. Walter, N. Suttorp, M. Muhly, S. Bhakdi. Thromboxane-mediated hypertension and vascular leakage evoked by low doses of *Escherichia coli* hemolysin in rabbit lungs. *J. Clin. Invest.* 1989b; 84(1): 220-227

Seeger W., H. Wolf, G. Stähler, H. Neuhof, L. Roka. Increased pulmonary vascular resistance and permeability due to arachidonate metabolism in isolated rabbit lungs. *Prostaglandins* 1982; 23: 157-173

Serhan C.N., A. Jain, S. Marleau, C. Clish, A. Kantarci, B. Behbehani, S.P. Colgan, G.L. Stahl, A. Merched, N.A. Petasis, L. Chan, T.E. Van Dyke. Reduced inflammation and tissue damage in transgenic rabbits overexpressing 15-lipoxygenase and endogenous anti-inflammatory lipid mediators. *J. Immunol.* 2003; 171: 6856-6865

Serio K. J., K. V. Reddy, T. D. Bigby. Lipopolysaccharide induces 5-lipoxygenase-activating protein gene expression in THP-1 cells via a NF- κ B and C/EBP-mediated mechanism. *Am. J. Physiol.* 2005; 288: C1125-C1133

Schottmüller, H. Wesen und Behandlung der Sepsis. *Inn. Med.* 1914; 31: 257

Schroeder C.P., P. Yang, R.A. Newman, R. Lotan. Simultaneous inhibition of Cox-2 and 5-Lox activities augments growth arrest and death of premalignant and malignant human lung cell lines. *J. Exp. Ther. Oncol.* 2007; 6(3): 183-192

Schütte H., S. Rosseau, R. Czymek, L. Ermert, D. Walmrath, H.J. Krämer, W. Seeger, F. Grimminger. Synergism between endotoxin priming and exotoxin challenge in provoking severe vascular leakage in rabbit lungs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997; 156: 819-824

Schützer K.M., A. Larsson, B. Risberg, A. Falk. Leukotriene receptor antagonism prevents lung protein leakage and hypoxaemia in a septic cat model. *Eur. Respir. J.* 1994; 7(6): 1131-1137

Sharma A.K., L.G. Fernandez, A.S. Awad, I.L. Kron, V.E. Laubach. Proinflammatory response of alveolar epithelial cells is enhanced by alveolar macrophage-produced TNF-alpha during pulmonary ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol.* 2007; 293(1): L105-113

Sharma J.N., L.A. Mohammed. The role of leukotrienes in the pathophysiology of inflammatory disorders is there a case for revisiting leukotrienes as therapeutic targets? *Inflammopharmacology* 2006; 14(1-2): 10-16

Shastri S., J.R. McNeill, T.W. Wilson, R. Poduri, C. Kaul, V. Gopalakrishnan. Cysteinyl leukotrienes mediate enhanced vasoconstriction to angiotensin II but not endothelin-1 in SHR. *Am. J. Physiol.* 2001; 281(1): H342-H349

Simons R.K., R.V. Maier, E.Y. Chi. Pulmonary effects of continuous endotoxin infusion in the rat. *Circ. Shock* 1991; 33(4): 233-243

Sloniewsky D. E., K. M. Ridge, Y. Adir, F.P. Fries, A. Briva, J.I. Sznajder, P.H. Sporn. Leukotriene D₄ activates alveolar epithelial Na,K-ATPase and increases alveolar fluid clearance. *Am. J. Crit. Care. Med.* 2004; 169: 407-412

Sriskandan S., J. Cohen. Gram-positive sepsis. Mechanisms and differences from Gram-negative sepsis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 1999; 13(2): 397-412

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

Sun D., C.D. Funk. Disruption of 12/15-lipoxygenase expression in peritoneal macrophages. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 24055-24062

Sundström E., L. Lastbom, A. Ryrfeld, S-E Dahlen. Interactions among three classes of mediators explain antigen-induced bronchoconstriction on the isolated perfused and ventilated guinea pig lung. *J. Pharmacol. Epx. Ther.* 2003; 307: 408-418

Surette M. E., N. Dallaire, N. Jean, S. Picard, P. Borgeat. Mechanisms of the priming effect of lipopolysaccharides on the biosynthesis of leukotriene B₄ in chemotactic peptide-stimulated human neutrophils. *FASEB J.* 1998; 12: 1521-1531

Tabeta K, P. Georgel, E. Janssen, X. Du, K. Hoebe, K. Crozat, S. Mudd, L. Shamel, S. Sovath, J. Goode, L. Alexopoulou, R.A. Flavell, B. Beutler. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101(10): 3516-3521

Tager A.M., A.D. Luster. BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors. *Prost. Leukot. Essent. Fatty Acids* 2003; 69(2-3): 123-134

Thiemermann C. Interactions between lipoteichoic acid and peptidoglycan from *Staphylococcus aureus*: a structural and functional analysis. *Microbes Infection* 2002; 4: 927-935

Tobias P.S., K. Soldau, J.A. Gegner, D. Mintz, R.J. Ulevitch. Lipopolysaccharide-binding-protein mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 10482-10488

Togbe D., G. Aurore, N. Noulin, V.F. Quesniaux, S. Schnyder-Candrian, B. Schnyder, V. Vasseur, S. Akira, K. Hoebe, B. Beutler, B. Ryffel, I. Couillin. Nonredundant roles of TIRAP and MyD88 in airway response to endotoxin, independent of TRIF, IL-1 and IL-18 pathways. *Lab. Invest.* 2006; 86(11): 1126-1135

Togbe D., S. Schnyder-Candrian, B. Schnyder, E. Doz, N. Noulin, L. Janot, T. Secher, P. Gasse, C. Lima, F.R. Coelho, V. Vasseur, F. Erard, B. Ryffel, I. Couillin, R. Moser. Toll-like receptor and tumor necrosis factor dependent endotoxin-induced acute lung injury. *Int. J. Exp. Pathol.* 2007; 88: 387-391

Tries S., W. Neupert, S. Laufer. The mechanism of action of the new antiinflammatory compound ML 3000: inhibition of 5- lox and COX-1/2. *Inflamm. Res.* 2002; 51(3): 135-143

Tudhope S.R., N.J. Cuthbert, T.S. Abram, M.A. Jennings, R.J. Maxey, A.M. Thompson, P. Norman, P.J. Gardiner. Bay u9773, a novel antagonist of cystenyl-leukotrienes with activity against two receptor subtypes. *Eur. J. Pharmacol.* 1994; 264: 317-323

Turner C.R., M.N. Lackey, M.F. Quinlan et al. Therapeutic intervention in a rat model of adult respiratory distress syndrome: II. Lipoxygenase pathway inhibition. *Circ. Shock* 1991; 34: 263-269

Udobi K.F., E.D. Childs, K. Touijer. Acute respiratory distress syndrome. *Am. Fam. Physician* 2003; 67: 315-22

Uhlig S., R. Nüsing, A. von Bethmann, R.L. Featherstone, T. Klein, F. Brasch, K.-M. Müller, V. Ullrich, A. Wendel. Cyclooxygenase-2-dependent bronchoconstriction in perfused rat lungs exposed to endotoxin. *Mol. Med.* 1996; 2: 373-383

Uhlig S., R.L. Featherstone, H.D. Held, R. Nüsing, C. Schudt, A. Wendel. Attenuation by phosphodiesterase inhibitors of lipopolysaccharide-induced thromboxane release and bronchoconstriction in rat lungs. *J. Pharm. Exp. Ther.* 1997; 283: 1453-1459

Ullrich R., G. Roeder, C. Lorber, Z.M. Quezado, W. Kneifel, H. Gasser, G. Schlag, H. Redl, P. Germann. Continuous venovenous hemofiltration improves arterial oxygenation in endotoxin-induced lung injury in pigs. *Anesthesiology* 2001; 95(2): 428-436

Voelkel N. F., R. M. Tuder, K. Wade, M. Höper, R.A. Lepley, J.L. Goulet, B.H. Koller, F. Fitzpatrick. Inhibition of 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) reduces pulmonary vascular reactivity and pulmonary hypertension in hypoxic rats. *J. Clin. Invest.* 1996; 97: 2491-2498

von Euler U.S. Some aspects of the actions of prostaglandins. *Arch. Pharmacodyn. Ther.* 1973; 202/Suppl.: 295-307

Walch L., X. Norel, J-P. Gascard, C. Brink. Functional studies of leukotriene receptors in vascular tissues. *Am. J. Respi. Crit. Care Med.* 2000; 161: S107-S111

Walmrath D., J. Pilch, M. Scharrmann, F. Grimminger, W. Seeger. Severe VA/Q mismatch in perfused lungs evoked by sequential challenge with endotoxin and E.coli haemolysin. *J. Appl. Physiol.* 1994; 76: 1020-1030

Wang J. E., M. K. Dahle, M. McDonald, S.J. Foster, A.O. Aasen, C. Thiemermann. Peptidoglycan and lipoteichoic acid in Gram-positive bacterial sepsis: receptors, signal transduction, biological effects, and synergism. *Shock* 2003; 20: 402-414

Wang J., M.K. Dahle, A. Yndestad, I. Bauer, M.C. McDonald, P. Aukrust, S.J. Foster, M. Bauer, A.O. Aasen, C. Thiemermann. Peptidoglycan of *Staphylococcus aureus* causes inflammation and organ injury in the rat. *Crit. Care Med.* 2004; 32(2): 546-52

Wang L., T. L. Kaduce, A. A. Spector. Localization of 12-hydroxyeicosatetraenoic acid in endothelial cells. *J. Lipid Res.* 1990; 31: 2265-2276

Ward P.A. Role of complement, chemokines, and regulatory cytokines in acute lung injury. *Ann. NY Acad. Sci.* 1996; 796: 104-112

Ware L.B. Pathophysiology of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Crit. Care Med.* 2006; 27(4): 337-349

Watkins D.N., D.J. Peroni, K.A. Basclain, M.J. Garlepp, P.J. Thompson. Expression and activity of nitric oxide synthases in human airway epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* 1997; 16: 629-639

Wedde-Beer K., C. Hu, M.M. Rodriguez, G. Piedimonte. Leukotriens mediate neurogenic inflammation in lungs of young rats infected with respiratory syncytial virus. *Am. J. Physiol.* 2002; 282: L1143-L1150

Welsch D.J., D.P. Creely, S.D. Hauser, K.J. Mathis, G.G. Krivi, P.C. Isakson. Molecular cloning and expression of human leukotriene-C₄ synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994; 91: 9745-9749

Wikström K., J.F. Ihd, A. Sjölander. regulation of leukotriene-dependent induction of cyclooxygenase 2 and Bcl-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 302(2): 330-5

Wolf H.R., H.W. Seeger. Experimental and clinical results in shock lung treatment with vitamin E. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1982; 393: 392-410

Woods J.W., M.J. Coffey, T.G. Brock, I.I. Singer, M. Peters-Golden. Lipoxygenase is located in the euchromatin of the nucleus in resting human alveolar macrophages and translocates to the nuclear envelope upon cell activation. *J. Clin. Invest.* 1995; 95: 2035-2046

Wray G.M., S.J. Foster, C.J. Hinds, C. Thiemermann. A cell wall component from pathogenic and non-pathogenic gram-positive bacteria (peptidoglycan) synergises with endotoxin to cause the release of tumour necrosis factor-alpha, nitric oxide production, shock, and multiple organ injury/dysfunction in the rat. *Shock* 2001; 15(2): 135-142

Wright, S.D. Multiple receptors for endotoxin. *Curr. Opin. Immunol.* 1991; 3: 83-90

Zink M.H., C.L. Oltman, T. Lu, P.V. Katakam, T.L. Kaduce, H. Lee, K.C. Dellsperger, A.A. Spector, P.R. Myers, N.L. Weintraub. 12-Lipoxygenase in porcine coronary microcirculation: implications for coronary vasoregulation. *Am. J. Physiol.* 2000; 280: H693-H704

Zhu D., M. Medhora, W.B. Campbell, N. Spitzbarth, J.E. Baker, E.R. Jacobs. Chronic hypoxia activates lung 15-lipoxygenase, which catalyzes production of 15-HETE and enhances constriction in neonatal rabbit pulmonary arteries. *Circ. Res.* 2003; 92: 992-1000

Zughaier S.M., S.M. Zimmer, A. Datta, R.W. Carlson, D.S. Stephens. Differential induction of the toll-like receptor 4-MyD88-dependent and -independent signaling pathways by endotoxins. *Infect. Immun.* 2005; 73(5): 2940-2950

10 Anhang

Geräte und Verbrauchsmaterialien

- Hoch-Temperatur-Polysulfon-Käfige 1500 U Eurostandard Typ IV S (Tecniplast, D-Hohenpeißenberg)
- Labortiereinstreu aus Hobelspänen (Abedd Lab & Vet Service GmbH, A-Wien)
- Nagetierfutter: Harlan Teclad 2018 Global Rodent Diet (Harlan Teclad, Shaw's Farm, GB-Blackthorn)
- Beatmungsgerät für Kleintiere: Small Animal Ventilator KTR-4 (Hugo Sachs Elektronik, D-March-Hugstetten)
- Trachealkanüle (Hugo Sachs Elektronik, D-March-Hugstetten)
- Thermomix-Frigomix Kombination (B.Braun, D-Melsungen)
- Doppelwandige Perfusatresevoir (Glasbläserei der Justus-Liebig-Universität, D-Gießen)
- Doppelwandige Organkammer und Minikühler (Glasbläserei der Justus-Liebig-Universität, D-Gießen)
- Masterflex-Rollerpumpe mit Easy-Load-Pumpenkopf 7518-10 (Cole Parmer Instrument Co., USA-Chicago)
- Schlauchmaterial (Cole Parmer Instrument Co., USA-Chicago)
- Perfusionskanüle für die Pulmonalarterie, Ø 2,5mm (Hugo Sachs Elektronik, D-March-Hugstetten)
- Perfusionskanüle für den linken Ventrikel, Ø 2,5mm (Hugo Sachs Elektronik, D-March-Hugstetten)
- Druckaufnehmer, Combitrans Monitoring Set Med. II for arterial blood pressure measurement (B.Braun, D-Melsungen)
- Elektronische Wägezelle U1, Meßbereich: 0-500 g, Meßgenauigkeit: ±0,01 g (Hottinger Baldwin Messtechnik, D-Darmstadt)
- Meßverstärker für Elektronische Wägezelle U1 (Hottinger Baldwin Messtechnik, D-Darmstadt)
- 4-Kanal-Brückenverstärker TBM 4 M (Fa. WPI, Harry Fein, D-Berlin)
- AD/DA-Meßkarte PCL-818 HG (Spectra Computersysteme, D-Leinfelden-Echterdingen)

- Labtech Notebook-Software, Pro-Version 10.1 (Spectra Computersysteme, D-Leinfelden-Echterdingen)
- Personal Computer
- Mikrotiterplattenlesegerät Infinite M 200 (Tecan Deutschland GmbH, D-Crailsheim)
- ABL 330[®] Blutgasanalysegerät (Radiometer, NL-Copenhagen)
- Aqua *ad injectabilia* (Pharmacia, D-Erlangen)
- Krebs-Henseleit-Pufferlösung, Elektrolytlösung I/3 (Serag-Wiessner, D-Naila)
Zusammensetzung: NaCl (125 mM), Glucose (13,32 mM), KCl (4,3 mM), CaCl₂*2H₂O (2,4 mM), MgCl₂*6H₂O (1,3 mM), KH₂PO₄ (1,1 mM)
- Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃) 8,4% (Serag-Wiessner, D-Naila)
- Kohlendioxid (CO₂) (Messer Griesheim, D-Siegen)

Tabellen

	Δ PAP, mmHG	Δ VP, mmHG	Δ W, g
Kontrolle Zeitpunkt 0-120	0,86 ± 0,21	0,02 ± 0,02	0,04 ± 0,02
Kontrolle Zeitpunkt 125	3,88 ± 0,15***	0,14 ± 0,04*	0,63 ± 0,17**

Tabelle 5a: Wirkung der Arachidonsäuregabe zum Zeitpunkt 120 min auf den Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks (Δ PAP), des Beatmungsdrucks (Δ VP) und des Lungengewichts (Δ W) bis zum Zeitpunkt 125 min.

Die Perfusion der Lungen erfolgte ohne Stimulation durch Bakterienwandbestandteile als Kontrolle. Nach 2 Stunden wurde die Arachidonsäure (10 μ M/L) der Perfusionslösung zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die zwischen dem Zeitpunkt 0 und 120 min sowie innerhalb von 5 Minuten nach Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche. Signifikante Unterschiede der Messwertveränderungen der Kontrolllungen zwischen dem Zeitpunkt 0 und 120 zu den Messwertveränderungen zum Zeitpunkt 125 min: * p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001.

	Δ PAP 0-120 min, mmHG
Kontrolle	$0,86 \pm 0,21$
10 μ g/ml LPS	$0,40 \pm 0,09$
1,5% Plasma	$0,60 \pm 0,17$
1,5% Plasma + 20 μ g/ml LTA	$0,30 \pm 0,08$
1,5% Plasma + 20 μ g/ml PepG	$2,34 \pm 0,54$
1,5% Plasma + 20 μ g/ml LTA + 20 μ g/ml PepG	$1,08 \pm 0,23$

Tabelle 5b: Einfluss des „priming“ durch Bakterienwandbestandteile auf den Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks (Δ PAP) zwischen den Zeitpunkten 0 und 120 min.

Die Perfusion der Lungen erfolgte ohne Stimulation durch Bakterienwandbestandteile als Kontrolle und unter Zugabe von 10 μ g/ml LPS, 1,5 % Plasma, 1,5 % Plasma und 20 μ g/ml LTA, 1,5 % Plasma und 20 μ g/ml PepG sowie 1,5 % Plasma mit 20 μ g/ml LTA und 20 μ g/ml PepG. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die zwischen dem Zeitpunkt 0 und 120 min aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

	Thromboxan, pg/ml	PGE ₂ , pg/ml	6-keto-PGF _{1α} , pg/ml
Kontrolle	$60,40 \pm 21,90$	$234,00 \pm 71,20$	$1910,00 \pm 111,80$
10 μ g/ml LPS	$218,80 \pm 70,62$	$430,00 \pm 357,00$	$5297,00 \pm 1074,00$
1,5% Plasma	$32,50 \pm 8,26$	$211,00 \pm 18,77$	$1238,00 \pm 221,60$
1,5% Plasma + 20 μ g/ml LTA	$53,60 \pm 6,28$	$794,20 \pm 83,75$	$2665,00 \pm 450,50$
1,5% Plasma + 20 μ g/ml PepG	$167,00 \pm 17,38$	$584,60 \pm 32,19$	$3386,00 \pm 178,40$
1,5% Plasma + 20 μ g/ml LTA + 20 μ g/ml PepG	$210,40 \pm 33,10$	$406,20 \pm 34,72$	$4178,00 \pm 464,50$

Tabelle 5c: Einfluss des „priming“ durch Bakterienwandbestandteile auf die Arachidonsäuremetabolite TXB₂, PGE₂ und 6-ketoPGF_{1 α} bis zum Zeitpunkt 120 min.

Die Perfusion der Lungen erfolgte ohne Stimulation durch Bakterienwandbestandteile als Kontrolle und unter Zugabe von 10 μ g/ml LPS, 1,5 % Plasma, 1,5 % Plasma und 20 μ g/ml LTA, 1,5 % Plasma und 20 μ g/ml PepG sowie 1,5 % Plasma mit 20 μ g/ml LTA und 20 μ g/ml PepG. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die zwischen dem Zeitpunkt 0 und 120 min aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

	Δ PAP, mmHG	Δ VP, mmHG	Δ W, g
Kontrolle	3,88 ± 0,15	0,14 ± 0,04	0,63 ± 0,17
10 µg/ml LPS	9,73 ± 0,54	1,53 ± 0,14	3,12 ± 0,98
1,5% Plasma	3,93 ± 0,32	0,13 ± 0,03	0,16 ± 0,04
1,5% Plasma + 20 µg/ml LTA	3,60 ± 1,06	0,44 ± 0,14	0,13 ± 0,10
1,5% Plasma + 20 µg/ml PepG	4,42 ± 0,80	0,48 ± 0,15	0,76 ± 0,42
1,5% Plasma + 20 µg/ml LTA + 20 µg/ml PepG	8,86 ± 4,21*	1,40 ± 0,25**	2,67 ± 1,59

Tabelle 5d: Einfluss des „priming“ durch Bakterienwandbestandteile auf den Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks (Δ PAP), des Beatmungsdrucks (Δ VP) und des Lungengewichts (Δ W) nach Applikation von Arachidonsäure.

Die Perfusion der Lungen erfolgte ohne Stimulation durch Bakterienwandbestandteile als Kontrolle und unter Zugabe von 10 µg/ml LPS, 1,5 % Plasma, 1,5 % Plasma und 20 µg/ml LTA, 1,5 % Plasma und 20 µg/ml PepG sowie 1,5 % Plasma mit 20 µg/ml LTA und 20 µg/ml PepG. Nach 120 Minuten wurde dem Perfusat Arachidonsäure (10 µM/L) zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche. Signifikante Unterschiede der durch Bakterienwandbestandteile stimulierten Lungen zu den Kontrolllungen mit Zugabe von Plasma und ohne Zugabe von Plasma: * p<0,05, ** p<0,01.

	Thromboxan, pg/ml	PGE ₂ , pg/ml	6-keto-PGF _{1α} , pg/ml
Kontrolle	2220,00 ± 543,10	871,00 ± 209,80	22020,00 ± 6154,00
10 µg/ml LPS	6637,00 ± 709,90	3047,00 ± 713,90	66630,00 ± 7417,00
1,5% Plasma	3299,00 ± 610,50	2089,00 ± 312,80	64340,00 ± 3288,00*
1,5% Plasma + 20 µg/ml LTA	4805,00 ± 495,60*	3354,00 ± 704,80**	74120,00 ± 13530,00**
1,5% Plasma + 20 µg/ml PepG	5155,00 ± 805,00*	2614,00 ± 338,20*	76610,00 ± 10850,00**
1,5% Plasma + 20 µg/ml LTA + 20 µg/ml PepG	7121,00 ± 1814,00*	6613,00 ± 2137,00*	116100,00 ± 23490,00**

Tabelle 5e: Einfluss des „priming“ durch Bakterienwandbestandteile auf die Arachidonsäuremetabolite TXB₂, PGE₂ und 6-ketoPGF_{1 α} nach Applikation von Arachidonsäure.

Die Perfusion der Lungen erfolgte ohne Stimulation durch Bakterienwandbestandteile als Kontrolle und unter Zugabe von 10 µg/ml LPS, 1,5 % Plasma, 1,5 % Plasma und 20 µg/ml LTA, 1,5 % Plasma und 20 µg/ml PepG sowie 1,5 % Plasma mit 20 µg/ml LTA und 20 µg/ml PepG. Nach 120 Minuten wurde dem Perfusat Arachidonsäure (10 µM/L) zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM des Metabolitengehalts zum Zeitpunkt 125 min. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche. Signifikante Unterschiede der Kontrolllungen mit Plasmazugabe und der durch Bakterienwandbestandteile stimulierten Lungen zu den Kontrolllungen ohne Zugabe von Plasma: * p<0,05, ** p<0,01.

	Δ PAP, mmHG	Δ VP, mmHG	Δ W, g
10 μ g/ml LPS	9,73 \pm 0,54	1,53 \pm 0,14	3,12 \pm 0,98
CDC 1 μ M/L	9,26 \pm 0,85	1,12 \pm 0,10	5,92 \pm 1,62
CDC 5 μ M/L	4,06 \pm 0,38***	1,02 \pm 0,25	0,91 \pm 0,39*
CDC 20 μ M/L	1,78 \pm 0,43***	0,28 \pm 0,03 ***	0,46 \pm 0,12*
Gossypol 0,5 μ M/L	5,47 \pm 0,48***	0,88 \pm 0,12**	0,69 \pm 0,16*
Gossypol 1 μ M/L	4,02 \pm 0,75***	0,62 \pm 0,09***	0,56 \pm 0,12*
Kaffeensäure 1 μ M/L	7,96 \pm 0,64	0,84 \pm 0,10***	3,26 \pm 1,60
Kaffeensäure 10 μ M/L	5,52 \pm 1,03**	0,66 \pm 0,06***	2,26 \pm 1,19
Kaffeensäure 20 μ M/L	5,56 \pm 0,63**	0,46 \pm 0,03***	0,93 \pm 0,18
Baicalein 5 μ M/L	3,60 \pm 0,82**	0,56 \pm 0,10***	0,73 \pm 0,26

Tabelle 6a: Einfluss des Gram-negativen „priming“ durch Bakterienwandbestandteile auf den Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks (Δ PAP), des Beatmungsdrucks (Δ VP) und des Lungengewichts (Δ W) nach Applikation von Arachidonsäure und nach Inkubation mit einem Lipoxigenase-Inhibitor.

Die Perfusion der Lungen erfolgte mit Stimulation durch Lipopolysaccharid als Kontrolle und unter Zugabe von CDC (1 μ M/L, 5 μ M/L, 20 μ M/L), Gossypol (0,5 μ M/L, 1 μ M/L), Kaffeensäure (1 μ M/L, 10 μ M/L, 20 μ M/L) und Baicalein (5 μ M/L). Nach 120 Minuten wurde dem Perfusat Arachidonsäure (10 μ M/L) zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche. Signifikante Unterschiede der durch Bakterienwandbestandteile stimulierten Lungen zu den Kontrolllungen: * p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001.

	Thromboxan, pg/ml	PGE ₂ , pg/ml	6-keto-PGF _{1α} ,pg/ml
10 μ g/ml LPS	6637,00 \pm 709,90	3047,00 \pm 713,90	66630,00 \pm 7417,00
CDC 1 μ M/L	7341,00 \pm 927,80	10560,00 \pm 2944,00*	113000,00 \pm 18110,00
CDC 5 μ M/L	6777,00 \pm 1672,00	3547,00 \pm 1046,00	80020,00 \pm 20780,00
CDC 20 μ M/L	3707,00 \pm 653,10	2893,00 \pm 358,70	60460,00 \pm 4117,00
Gossypol 0,5 μ M/L	7568,00 \pm 820,50	4326,00 \pm 876,10	73340,00 \pm 5938,00
Gossypol 1 μ M/L	5354,00 \pm 571,70	3330,00 \pm 263,00	62980,00 \pm 5490,00
Kaffeensäure 1 μ M/L	8384,00 \pm 1029,00	5302,00 \pm 498,50*	117500,00 \pm 11290,00**
Kaffeensäure 10 μ M/L	6858,00 \pm 483,70	2081,00 \pm 249,10*	57100,00 \pm 4752,00
Kaffeensäure 20 μ M/L	7380,00 \pm 756,50	3895,00 \pm 635,20*	81970,00 \pm 7032,00
Baicalein 5 μ M/L	11920,00 \pm 1192,00*	5802,00 \pm 1065,00*	95260,00 \pm 11680,00

Tabelle 6b: Einfluss des Gram-negativen „priming“ durch Bakterienwandbestandteile auf die Arachidonsäuremetabolite TXB₂, PGE₂ und 6-ketoPGF_{1 α} nach Applikation von Arachidonsäure und nach Inkubation mit einem Lipoxigenase-Inhibitor.

Die Perfusion der Lungen erfolgte mit Stimulation durch Lipopolysaccharid als Kontrolle und unter Zugabe von CDC (1 μ M/L, 5 μ M/L, 20 μ M/L), Gossypol (0,5 μ M/L, 1 μ M/L), Kaffeensäure (1 μ M/L, 10 μ M/L, 20 μ M/L) und Baicalein (5 μ M/L). Nach 120 Minuten wurde dem Perfusat Arachidonsäure (10 μ M/L) zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM des Metabolitengehalts zum Zeitpunkt 125 min. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche. Signifikante Unterschiede der durch Bakterienwandbestandteile stimulierten Lungen zu den Kontrolllungen: * p<0,05, ** p<0,01.

	LTC ₄	LTE ₄
10 µg/ml LPS	0,00 ± 0,00	1575,00 ± 188,70
CDC 20 µM/L	0,00 ± 0,00	506,5 ± 176,40**
Gossypol 1 µM/L	497,00 ± 497,00	739,40 ± 277,40**
Kaffeensäure 10 µM/L	1140,00 ± 616,80	493,00 ± 204,10
Baicalein 5 µM/L	144,80 ± 143,60	90,60 ± 90,60

Tabelle 6c: Einfluss des Gram-negativen „priming“ durch Bakterienwandbestandteile auf die Arachidonsäuremetabolite LTC₄ und LTE₄ nach Applikation von Arachidonsäure und nach Inkubation mit einem Lipoxigenase-Inhibitor.

Die Perfusion der Lungen erfolgte mit Stimulation durch Lipopolysaccharid als Kontrolle und unter Zugabe von CDC (1 µM/L, 5 µM/L, 20 µM/L), Gossypol (0,5 µM/L, 1 µM/L), Kaffeensäure (1 µM/L, 10 µM/L, 20 µM/L) und Baicalein (5 µM/L). Nach 120 Minuten wurde dem Perfusat Arachidonsäure (10 µM/L) zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM des Metabolitengehalts zum Zeitpunkt 125 min. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche. Signifikante Unterschiede der durch Bakterienwandbestandteile stimulierten Lungen zu den Kontrolllungen: ** p<0,01.

	ΔPAP, mmHG	ΔVP, mmHG	ΔW, g
10 µg/ml LPS	9,73 ± 0,54	1,53 ± 0,14	3,12 ± 0,98
MK-886 1µM/L	6,54 ± 1,42*	0,86 ± 0,17**	3,34 ± 1,66
MK-886 5µM/L	3,52 ± 0,26***	0,50 ± 0,05***	0,64 ± 0,10
L-655,238 30 µM/L	2,30 ± 0,43***	0,36 ± 0,05**	0,29 ± 0,03*

Tabelle 7a: Einfluss des Gram-negativen „priming“ durch Bakterienwandbestandteile auf den Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks (ΔPAP), des Beatmungsdrucks (ΔVP) und des Lungengewichts (ΔW) nach Applikation von Arachidonsäure und nach Inkubation mit einem Inhibitor des FLAP.

Die Perfusion der Lungen erfolgte mit Stimulation durch Lipopolysaccharid als Kontrolle und unter Zugabe von 5 µM/L MK-886 und 30 µM/L L-655,238. Nach 120 Minuten wurde dem Perfusat Arachidonsäure (10 µM/L) zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche. Signifikante Unterschiede der durch Bakterienwandbestandteile stimulierten Lungen zu den Kontrolllungen: * p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001.

	Thromboxan, pg/ml	PGE ₂ , pg/ml	6-keto-PGF _{1α} , pg/ml
10 µg/ml LPS	6637,00 ± 709,90	3047,00 ± 713,90	66630,00 ± 7417,00
MK-886 1µM/L	9742,00 ± 1760,00	5184,00 ± 1121,00	105000,00 ± 9584,00*
MK-886 5µM/L	8546,00 ± 1373,00	3655,00 ± 737,80	98950,00 ± 13150,00*
L-655,238 30 µM/L	24700,00±2805,00***	16720,00 ± 4113,00*	181600,00 ± 23500,00***

Tabelle 7b: Einfluss des Gram-negativen „priming“ durch Bakterienwandbestandteile auf die Arachidonsäuremetabolite TXB₂, PGE₂ und 6-ketoPGF_{1α} nach Applikation von Arachidonsäure und nach Inkubation mit einem Inhibitor des FLAP.

Die Perfusion der Lungen erfolgte mit Stimulation durch Lipopolysaccharide als Kontrolle und unter Zugabe von 5 µM/L MK-886 und 30 µM/L L-655,238. Nach 120 Minuten wurde dem Perfusat Arachidonsäure (10 µM/L) zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM des Metabolitengehalts zum Zeitpunkt 125 min. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche. Signifikante Unterschiede der durch Bakterienwandbestandteile stimulierten Lungen zu den Kontrolllungen: * p<0,05, ***p<0,001.

	LTC ₄	LTE ₄
10 µg/ml LPS	0,00 ± 0,00	1575,00 ± 188,70
MK-886 5µM/L	203,80 ± 135,50	86,40 ± 86,40***

Tabelle 7c: Einfluss des Gram-negativen „priming“ durch Bakterienwandbestandteile auf die Arachidonsäuremetabolite LTC₄ und LTE₄ nach Applikation von Arachidonsäure und nach Inkubation mit einem Inhibitor des FLAP.

Die Perfusion der Lungen erfolgte mit Stimulation durch Lipopolysaccharid als Kontrolle und unter Zugabe von 5 µM/L MK-886 und 30 µM/L L-655,238. Nach 120 Minuten wurde dem Perfusat Arachidonsäure (10 µM/L) zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM des Metabolitengehalts zum Zeitpunkt 125 min. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche. Signifikante Unterschiede der durch Bakterienwandbestandteile stimulierten Lungen zu den Kontrolllungen: ***p<0,001.

	ΔPAP, mmHG	ΔVP, mmHG	ΔW, g
10 µg/ml LPS	9,73 ± 0,54	1,53 ± 0,14	3,12 ± 0,98
Bay-u9773 1 µM/L	3,04 ± 0,19***	0,50 ± 0,07***	0,28 ± 0,04*

Tabelle 8a: Einfluss des Gram-negativen „priming“ durch Bakterienwandbestandteile auf den Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks (ΔPAP), des Beatmungsdrucks (ΔVP) und des Lungengewichts (ΔW) nach Applikation von Arachidonsäure und nach Inkubation mit einem LT-Rezeptblocker.

Die Perfusion der Lungen erfolgte mit Stimulation durch Lipopolysaccharid als Kontrolle und unter Zugabe von 1 µM/L Bay-u9773. Nach 120 Minuten wurde dem Perfusat Arachidonsäure (10 µM/L) zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 Minuten nach der Arachidonsäuregabe aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche. Signifikante Unterschiede der durch Bakterienwandbestandteile stimulierten Lungen zu den Kontrolllungen: * p<0,05, ***p<0,001.

	Thromboxan, pg/ml	PGE ₂ , pg/ml	6-keto-PGF _{1α} , pg/ml
10 µg/ml LPS	6637,00 ± 709,90	3047,00 ± 713,90	66630,00 ± 7417,00
Bay-u9773 1 µM/L	8727,00 ± 1479,00	3727,00 ± 785,60	78610,00 ± 9580,00

Tabelle 8b: Einfluss des Gram-negativen „priming“ durch Bakterienwandbestandteile auf die Arachidonsäuremetabolite TXB₂, PGE₂ und 6-ketoPGF_{1α} nach Applikation von Arachidonsäure und nach Inkubation mit einem LT-Rezeptblocker.

Die Perfusion der Lungen erfolgte mit Stimulation durch Lipopolysaccharid als Kontrolle und unter Zugabe von 1 µM/L Bay-u9773. Nach 120 Minuten wurde dem Perfusat Arachidonsäure (10 µM/L) zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM des Metabolitengehalts zum Zeitpunkt 125 min. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

	LTC ₄	LTE ₄
10 µg/ml LPS	0,00 ± 0,00	1575,00 ± 188,70
Bay-u9773 1 µM/L	1763,00 ± 631,40	37210,00 ± 4961,00***

Tabelle 8c: Einfluss des Gram-negativen „priming“ durch Bakterienwandbestandteile auf die Arachidonsäuremetabolite LTC₄ und LTE₄ nach Applikation von Arachidonsäure und nach Inkubation mit einem LT-Rezeptblocker.

Die Perfusion der Lungen erfolgte mit Stimulation durch Lipopolysaccharid als Kontrolle und unter Zugabe von 1 µM/L Bay-u9773. Nach 120 Minuten wurde dem Perfusat Arachidonsäure (10 µM/L) zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM des Metabolitengehalts zum Zeitpunkt 125 min. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche. Signifikante Unterschiede der durch Bakterienwandbestandteile stimulierten Lungen zu den Kontrolllungen: ***p<0,001

11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Leander Ermert für die Übernahme und hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit. Ebenso danke ich Frau Dr. Monika Ermert für die ausdauernde und hervorragende Betreuung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Rüdiger Gerstberger danke ich ganz besonders für die Übernahme meiner Doktorarbeit von veterinärmedizinischer Seite, sowie für seine hervorragende und engagierte Betreuung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Für die ausgesprochen gute und kollegiale Zusammenarbeit im Labor bedanke ich mich bei Karin Quanz sowie allen Mitarbeitern des Lungenlabors im SFB 547. Insbesondere für die zu jeder Tages- und Nachtzeit aufmunternde Zusammenarbeit und für die selbstlose Unterstützung auch in schwierigen Zeiten möchte ich mich bei Dr. Chicky Inholte bedanken.

Mein Dank gilt ebenso den geschätzten Kollegen Dr. Matyas Tatar und Dr. Timo Prange. Mit einem Mhhh, Haie entschuldige ich mich dafür, mich so lange ausgeschlossen zu haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Doris Dahmen und Dr. Heinrich Dahmen für die stets verständnisvolle Rücksichtnahme und großzügige Bereitschaft die Fertigstellung meiner Doktorarbeit zu unterstützen.

Mein Dank gilt insbesondere auch meiner Großmutter Charlotte Bennerscheidt sowie meinen leider viel zu früh verstorbenen Großeltern Franz Bennerscheidt, Irmgard Dünner und Hans Dünner, die mir neben der großzügigen finanziellen Unterstützung stets Inspiration zur Beendigung dieser Arbeit waren.

Ganz besonders aber möchte ich der Liebe meines Lebens Julia Naglo-Dünner danken! Danke, daß Du (meistens) geduldig meine Launen ertragen hast. Der Wettkampf hat uns zum gemeinsamen großen Ziel geführt!

12 Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und 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 Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Marc Dünner



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5585-1



9 783835 955851