

Einfluss eines Phosphodiesterase-2-Inhibitors auf die
Hämodynamik und die endothel-alveoläre Barriere
nach in-vivo-Priming mit LPS und ex-vivo-Applikation
von Pneumolysin am Modell der isolierten Rattenlunge

Daniel Birkfeld

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



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

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 2014

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 2014

© 2014 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

**Einfluss eines Phosphodiesterase-2-Inhibitors
auf die Hämodynamik und die endothel-alveoläre Barriere
nach *in-vivo*-Priming mit LPS und *ex-vivo*-Applikation von
Pneumolysin am Modell der isolierten Rattenlunge**

INAUGURALDISSERTATION

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

vorgelegt von

Daniel Birkfeld

aus Coesfeld-Westfalen

Gießen 2013

Aus der Medizinischen Klinik II und Poliklinik
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Gießen

Leiter: Prof. Dr. W. Seeger

Gutachter: Prof. Dr. Ghofrani

Gutachter: Prof. Dr. Middendorff

Tag der Disputation: 25.11.2014

Die Dissertation ist meiner Familie gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung.....	7
1.1 Hintergrund dieser Arbeit.....	7
1.1.1 Epidemiologische Bedeutung von Sepsis, ARDS und Streptococcus pneumoniae.....	7
1.2 Pathophysiologische Zusammenhänge.....	8
1.2.1 ARDS, LPS, Pneumolysin und TNF-alpha.....	8
1.2.2 TNF-alpha und Phosphodiesterase-2.....	9
1.2.3 Phosphodiesterase-2, cAMP und cGMP.....	9
1.2.4 Endotheliale Permeabilität, cAMP und cGMP.....	9
1.2.5 Glatte Gefäßmuskelzelle und cGMP.....	9
1.3 Möglichkeit der Phosphodiesterase-2-Inhibition.....	10
1.3.1 EHNA.....	10
1.4 Beschreibung des Priming-Effektes.....	10
1.4.1 LPS verstärkt die schädigenden Wirkungen eines später verabreichten Exotoxins.....	10
2. Ziele dieser Arbeit.....	12
3. Materialien und Methoden.....	13
3.1 Substanzen und Geräte.....	13
3.1.1 Substanzen.....	13
3.1.2 Geräte.....	14
3.2 Modell der isolierten Rattenlunge.....	15
3.2.1 Allgemeines zum Modell.....	15
3.2.2 Präparation der Ratte.....	15
3.2.2.1 Präparation mit LPS.....	15
3.2.2.2 Präparation ohne LPS.....	16
3.2.3 Lungenpräparation.....	16
3.2.4 Das Beatmungssystem.....	18
3.2.5 Der Perfusionskreislauf der Rattenlunge.....	18
3.2.6 Versuchsaufbau: Illustration (Abb. 1).....	20

3.2.7	Versuchsablauf.....	21
3.2.7.1	Rekrutierungsmanöver.....	21
3.2.7.2	Durchführung einer Kaskade.....	21
3.2.7.3	Tabellarische Darstellung des Versuchsablaufs.....	22
3.2.7.4	Schematische Darstellung des Versuchsablaufs (Abb. 2).....	23
3.2.8	Versuchsgruppen.....	24
3.2.8.1	ohne LPS (Abb. 3).....	24
3.2.8.2	mit LPS (Abb. 4).....	24
3.3	Erfassung von Messwerten.....	25
3.3.1	Messwertregistrierung.....	25
3.3.2	Gewinnung von Plasma zur Bestimmung von TNF-alpha.....	25
3.3.3	Biochemische Messungen.....	26
3.3.3.1	TNF-alpha.....	26
3.3.3.2	pH-Wert.....	26
3.3.4	Berechnung des Kapillären Filtrationskoeffizienten.....	26
3.3.5	Bestimmung der Nass-Trocken-Relation.....	27
3.3.6	Einteilung und Speicherung der Messwerte.....	27
3.4	Durchführung der Experimente.....	28
3.4.1	Priming-Effekt.....	28
3.4.2	Unterschiede zwischen spezifischer PDE-2-Inhibition und unspezifischer PDE-Inhibition.....	28
3.4.2.1	Spezifische Inhibition der PDE-2.....	28
3.4.2.2	Unspezifische Inhibition der PDE.....	28
3.5	Statistik.....	29
3.5.1	Shapiro-Wilk-Test.....	29
3.5.2	Student's T-Test.....	29
3.5.3	Mann-Whitney-U-Test.....	30

4.	Ergebnisse	31
4.1	Mittlerer Pulmonalarterieller Druck (mPAP)	31
4.1.1	Priming-Effekt (mPAP)	31
4.1.2	Spezifische Inhibition der PDE-2 (mPAP)	33
4.1.3	Unspezifische Inhibition der PDE (mPAP)	35
4.2	Gewichtszunahme der Lunge (Δg)	37
4.2.1	Priming-Effekt (Δg)	37
4.2.2	Spezifische Inhibition der PDE-2 (Δg)	39
4.2.3	Unspezifische Inhibition der PDE (Δg)	41
4.3	Kapillärer Filtrationskoeffizient (KFC)	43
4.3.1	Priming-Effekt (KFC)	43
4.3.2	Spezifische Inhibition der PDE-2 (KFC)	45
4.3.3	Unspezifische Inhibition der PDE (KFC)	47
4.4	Nass-Trocken-Relation (WD)	49
4.4.1	Priming-Effekt (WD)	49
4.4.2	Spezifische Inhibition der PDE-2 (WD)	51
4.4.3	Unspezifische Inhibition der PDE (WD)	53
4.5	TNF-alpha	55
5.	Diskussion	56
6.	Zusammenfassung und Ausblick	59
7.	Summary	60
8.	Abkürzungsverzeichnis	61
9.	Literaturverzeichnis	62
10.	Ehrenwörtliche Erklärung	67
11.	Danksagung	68
12.	Tabellarischer Lebenslauf	69

1. Einleitung

1.1 Hintergrund dieser Arbeit

1.1.1 Epidemiologische Bedeutung von Sepsis, ARDS und *Streptococcus pneumoniae*

Die Sepsis ist ein schweres Krankheitsbild und hat eine Mortalität zwischen 30 und 70% [27]. Eine alternde Bevölkerung und eine steigende Anzahl resistenter Keime tragen zur hohen Mortalität bei [27]. Es konnte gezeigt werden, dass in den USA die schweren Fälle einer Sepsis tendenziell zunehmen [5].

Da insbesondere ältere Patienten wegen ihrer Gebrechlichkeit eher im Krankenhaus als ambulant behandelt werden müssen, sind gerade diese Patienten besonders gefährdet, an einer *nosokomialen Sepsis* zu erkranken. Untersuchungen haben gezeigt, dass die nosokomiale Sepsis in mindestens 20% der Fälle durch gram-negative Bakterien verursacht wird [7, 21]. Dabei besteht häufig eine ungünstige Prognose [31], die oft zusätzlich durch ein ARDS verschlechtert wird, das per se eine Mortalität von etwa 40% hat [2, 19, 24]. Zusätzlich können bei einer Sepsis erregerbedingte Pneumonien ein Problem darstellen.

Von den früh beginnenden *nosokomialen „early onset“ Pneumonien* werden 5 – 20% durch *Streptococcus pneumoniae* verursacht [1], wobei diese selbst zu einer Bakteriämie mit Sepsis führen können [37]. Durch eine Bakteriämie mit *Streptococcus pneumoniae* wird das Risiko, dass es zu einem ARDS kommt, erhöht [17].

Sowohl gram-negative Bakterien als auch *Streptococcus pneumoniae* können bei einer Sepsis nachweisbar sein. Daher ist es plausibel, die Wirkung beider Erreger in einem experimentellen Modell zu untersuchen.

1.2 Pathophysiologische Zusammenhänge

1.2.1 ARDS, LPS, Pneumolysin und TNF-alpha

TNF-alpha steht als proinflammatorisches Zytokin im Zentrum der Pathophysiologie einer gram-negativen Sepsis und eines ARDS [6, 14, 12, 33].

TNF-alpha wird in der Lunge selbst produziert [8] und führt im Rahmen eines ARDS zu einer erhöhten endothelialen Permeabilität, wobei hohe TNF-alpha-Konzentrationen mit einer erhöhten Mortalität assoziiert sind [9, 16, 18, 30].

Es ist daher legitim, TNF-alpha als wichtigen Indikator für das Auftreten und die Schwere einer gram-negativen Sepsis und eines ARDS anzusehen.

Kommt es zu einem ARDS, so beinhaltet dieses eine Dysfunktion von Lungenendothel und alveolärem Epithel, die eine Schrankenstörung zwischen Blutbahn und Alveole mit einer **erhöhten endothelial-alveolären Permeabilität** zur Folge hat [19]. Dieser Pathomechanismus trägt zur hohen Mortalität des ARDS bei und steht daher im Zentrum des klinischen Interesses [19].

Sowohl klinisch als auch experimentell können *Endotoxine (LPS) gram-negativer* Bakterien eine Sepsis auslösen und daher in einem experimentellen Modell verwendet werden, deren Pathogenität an einem Anstieg von TNF-alpha zu erkennen ist [33, 34]. Da auch *Streptococcus pneumoniae* im Rahmen einer Sepsis eine Bedeutung haben kann [1, 37], macht es Sinn, dessen Virulenzfaktor *Pneumolysin (PLY)* in einem experimentellen Modell zu untersuchen. PLY ist das für die Zellschädigung entscheidende Exotoxin des *gram-positiven* Bakteriums *Streptococcus pneumoniae* [20]. Es ist ein sogenanntes Pore-forming-toxin (PFT), das die Zellmembranen epithelialer und endothelialer Zellen, z.B. bei einer Pneumokokkenpneumonie, zerstört [11, 25, 26, 40] und zu einer Produktion von TNF-alpha führt [13].

Werden LPS und PLY in einem experimentellen Modell gemeinsam untersucht, so ist demnach von zellschädigenden Wirkungen auszugehen, die sich summieren und zu einer hohen Mortalität führen.

1.2.2 TNF-alpha und Phosphodiesterase-2

Auf zellulärer Ebene induziert TNF-alpha die Expression der PDE-2. Dies konnte an kultivierten, humanen umbilicalen Venen-Endothelzellen gezeigt werden [30].

1.2.3 Phosphodiesterase-2, cAMP und cGMP

Die PDE-2 wird in der Lunge gebildet und katalysiert den hydrolytischen Abbau von cGMP und cAMP [23].

Dabei ist die Affinität der PDE-2 zu cGMP höher als zu cAMP [23].

Bindet cGMP an die PDE-2, so hat dies eine Konformationsänderung der PDE-2 zur Folge, die zu einer vermehrten Hydrolyse von cAMP führt [23].

1.2.4 Endotheliale Permeabilität, cAMP und cGMP

Erhöhte intrazelluläre Konzentrationen von cAMP und cGMP wirken der endothelialen Permeabilitätssteigerung entgegen, erniedrigte Konzentrationen führen zu einer Permeabilitätserhöhung [15, 30, 32].

1.2.5 Glatte Gefäßmuskelzelle und cGMP

Erhöhte Konzentrationen von cGMP bewirken eine Relaxation der glatten Gefäßmuskelzelle und führen dadurch zu einer Drucksenkung [28].

1.3 Möglichkeit der Phosphodiesterase-2-Inhibition

1.3.1 EHNA

EHNA (Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine) inhibiert mit einer mittleren Konzentration (IC₅₀) von 0,8 µM die PDE-2 [22, 23].

Mit einer Konzentration von ≥ 10 µM werden neben der PDE-2 auch die PDE-1, PDE-3 und PDE-4 inhibiert [22].

Bei der vorliegenden Arbeit werden daher 1 µM für eine *spezifische PDE-2-Inhibition*, 10 µM für eine *unspezifische PDE-Inhibition* verwendet.

1.4 Beschreibung des Priming-Effektes

1.4.1 LPS verstärkt die schädigenden Wirkungen eines später verabreichten Exotoxins

Mit Priming-Effekt ist allgemein das Ergebnis einer Bahnung gemeint, das heißt bei dieser Arbeit, dass ein schädigendes Agens (LPS) die schädigenden Wirkungen eines anderen Agens (PLY) verstärkt, wenn das eine Agens zeitversetzt zum anderen gegeben wird.

EINLEITUNG

Priming-Effekte konnten an verschiedenen Tier- und Zellmodellen gezeigt werden, zum Beispiel

- In einem reinen *in vitro-Modell* für humane PMN:
Humane PMN wurden mit LPS und 1 Stunde später mit Ionophor A 23187 behandelt. Das Priming mit LPS zeigte sich anhand einer massiv erhöhten Produktion einer proinflammatorischen Substanz (Leukotrien B₄) durch PMN [3].
- In einem reinen *ex-vivo-Modell*:
Zunächst wurde LPS broncho-alveolär einer isolierten Rattenlunge [36], in einer anderen Studie über das Perfusat intravaskulär einer isolierten Kaninchenlunge [35] appliziert, 3 [36] bzw. 2 [35] Stunden später das Exotoxin von *E. coli* (Hämolyisin) über das Perfusat intravaskulär verabreicht [35, 36].

Die Kombination Alveoläres Priming mit LPS und intravaskuläres Hämolyisin ergab einen dramatischen Anstieg des PAP, des Lungengewichtes und des Shunt-flows [36]. Die Kombination intravaskuläres Priming mit LPS und intravaskuläres Hämolyisin ergab ebenfalls einen Anstieg des PAP und des Lungengewichtes [35].

- In einem reinen *in-vivo-Modell*:
Pavianen wurde abgetötete, 12 Stunden später lebende *E. coli* intravenös appliziert [38].
Der Priming-Effekt war anhand eines erhöhten PAP und morphologischen Lungenschäden in Form von Vakuolisierung und Kräuselung der Endothelmembranen, Vakuolisierung des Typ-I-Epithels, Freiliegen der Basalmembran, Ansammlung von Entzündungszellen (PMN und Makrophagen) und Verdickung des Interstitiums durch Ödem und Fibroblasten darstellbar [38].

2. Ziele dieser Arbeit

- a) Der Priming-Effekt soll am Modell der isolierten Rattenlunge *ex vivo* gezeigt werden, nachdem der Ratte 3 Stunden zuvor LPS *in vivo* verabreicht wurde (in-vivo - ex-vivo-Modell).

- b) Es sollen Unterschiede zwischen einer spezifischen PDE-2- versus einer unspezifischen PDE-Inhibition herausgearbeitet und daraus therapeutische Optionen abgeleitet werden.

3. Materialien und Methoden

3.1 Substanzen und Geräte

3.1.1 Substanzen

Aprotinin, Trasylol 0,5 Bayer Vital

Atipamezol, Antisedan, Dr. E. Gräub AG, Bern

Braunoderm, B.Braun Melsungen AG

Destilliertes Wasser Aqua ad iniectabilia, Baxter, Unterschleißheim

Elektrolytlösung I/3, Serag-Wiessner, Naila, 975 ml beinhalteten:

Calciumchlorid-Dihydrat	2,40	mmol
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	1,30	mmol
Kaliumchlorid	4,30	mmol
Kalium-Dihydrogenphosphat	1,10	mmol
Natriumchlorid	125,00	mmol
Glucose	13,32	mmol

Fentanyl, Janssen Cilag GmbH

Heparin-Natrium, Liquemin, Hoffmann-La Roche AG

Inhibitor der PDE-2 EHNA Byk 190954, Firma Byk Gulden

Lidocainhydrochlorid 2 %, Xylocain 2 %, AstraZeneca, Wedel

Lipopolysaccharid (LPS) von Salmonella equi abortus

Medetomidin, Domitor, Dr. E. Gräub AG, Bern

NaCl 0,9% Isotone Kochsalzlösung, Baxter, Unterschleißheim

Naloxon, Narcanti, Dupont Pharma, Bad Homburg

Natriumbikarbonat 8,4 % NaHCO₃, Braun, Melsungen

Pentobarbital-Na, Narcoren von Merial

Pentoxifyllin, Trental, Aventis Pharma

Pneumolysin (PLY) von Streptococcus pneumoniae

3.1.2 Geräte

Beatmungsgerät (Respirator) SAR-830/P Ventilator

Blutgasanalysegerät AVL Hb 995, Bad Homburg

Druckaufnehmer „Single Use Pressure Transducer“, Braun

Einkanalschreiber (Rikadenki)

Farbmonitor (Monitor), AOC

Gasflasche mit CO₂

Gewichtsaufnehmer Typ U1/A der Firma Hottinger Baldwin Meßtechnik, Darmstadt

Luftfilter Firma Braun

Männliche CD-Ratten, Charles River aus Sulzfeld

Mikro 12-24 Zentrifuge, Firma Hettich

Nadel rosa (18Gx3/2“), BD Microlance 3, Drogheda, Ireland

Nadel lila (24Gx1“), BD Microlance 3, Drogheda, Ireland

Nadel braun (26Gx1/2“), BD Microlance 3, Drogheda, Ireland

Personal Computer Pentium 2

Plastik-Einmalspritzen steril, 1 ml, 2,5 ml.

Rat TNF- α Immunoassay kit (ELISA), BioSource International Inc., USA

Rollerpumpe Masterflex easyload Model 7518-00, Cole-Parmer, USA

Thermomix BU, Braun

Tintenstrahldrucker Deskjet 690 C, Hewlett-Packard

Venenverweilkanüle 22Gx1“ 25 mm, Vasocan Braunüle, Braun

Verstärker „PlugSys-DBA“, Hugo-Sachs

3.2 Modell der isolierten Rattenlunge

3.2.1 Allgemeines zum Modell

Bei dem verwendeten Rattenlungenmodell handelt es sich um ein in der Forschungsgruppe Professor Dr. W. Seeger etabliertes Experiment zur Erforschung von Perfusionsdrücken (mPAP, mLVP), Atemdrücken (VP, PEEP) und der Lungengewichtszunahme (Δg).

Es ermöglicht, die Rattenlunge *ex vivo*, das heißt unabhängig von Einflussfaktoren des Gesamtorganismus, zu untersuchen.

Dabei bleibt die Rattenlunge als Organ intakt.

3.2.2 Präparation der Ratte

Zur Verfügung standen männliche CD-Ratten (Charles River aus Sulzfeld) mit einem Gewicht von 300 bis 400 Gramm.

Die Präparation der Ratten teilte sich in zwei Gruppen auf, und zwar in

- Versuchstiere, die mit LPS vorbehandelt wurden (siehe 3.2.2.1).
- Versuchstiere, die kein LPS erhielten (siehe 3.2.2.2).

3.2.2.1 Präparation mit LPS

Zunächst musste die Ratte sediert und analgesiert werden, um die Vena jugularis interna darzustellen, in die das LPS injiziert wurde. Die Spontanatmung des Tieres blieb erhalten.

Die Sedierung erfolgte gewichtsunabhängig mit Medetomidin 0,1 mg. Die Analgesie wurde mit Fentanyl bedarfsweise zwischen 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und 750 $\mu\text{g}/\text{kg}$ gesichert.

Sowohl Medetomidin als auch Fentanyl wurden intraperitoneal mittels einer Hohlnadel 26Gx1/2" (braune Nadel) verabreicht.

Nach einseitiger subkutaner Gabe von 1,5 ml Lidocainhydrochlorid 2% paratracheal über eine andere Hohlnadel 24Gx1" (lila Nadel) erfolgte das operative Aufsuchen der

Vena jugularis interna links oder rechts. Diese wurde proximal unterbunden und herznah mittels einer Venenverweilkanüle 22Gx1“ 25 mm (blaue Kanüle) punktiert und damit katheterisiert. Anschließend erfolgte über diese Kanüle die intravenöse Gabe von LPS 2,5 mg/kg.

Danach wurde die Kanüle wieder entfernt, die punktierte Vene mit einem vorgelegten Faden zur Vermeidung von Luftemboli und Blutung sofort verschlossen und die Haut mittels fortlaufender Naht adaptiert.

Anschließend wurden die Wirkungen von Fentanyl und Medetomidin antagonisiert, indem Fentanyl mit Naloxon je nach Bedarf mit 100 bis 200 µg/kg und Medetomidin mit Atipamezol 0,05 mg gewichtsunabhängig antagonisiert wurden. Die eine Hälfte Naloxon wurde intraperitoneal, die andere subcutan gegeben. Atipamezol wurde nur intraperitoneal verabreicht.

Dazu diente für beide Antagonisten eine Hohlnadel 26Gx1/2“ (braune Nadel).

Die Tiere wurden 3 Stunden nach Applikation des LPS der Lungenpräparation überführt (siehe 3.2.3).

3.2.2.2 Präparation ohne LPS

Diese Tiere unterlagen keiner besonderen Vorbereitung, sondern wurden unmittelbar der Lungenpräparation überführt (siehe 3.2.3).

3.2.3 Lungenpräparation

Nach intraperitonealer Injektion von Pentobarbital-Na 80mg/kg Körpergewicht erfolgte die Tracheostomie beim noch spontan atmenden Tier. Dazu wurde die Ratte auf den Rücken liegend fixiert und das Fell mit Braunoderm desinfiziert. Die Tiefe der Pentobarbital-Narkose wurde anhand der Reaktion auf das Quetschen des Schwanzes mittels einer Metallpinzette überprüft. Bei ausbleibendem sichtbarem Muskelzucken war davon auszugehen, dass die Narkose tief genug war und die Tracheostomie erfolgen konnte. Die Tracheostomie wurde mit einer subkutanen, praetrachealen Injektion von 2,5 ml Lidocainhydrochlorid 2% über eine Hohlnadel 24Gx1“ (lila Nadel) eingeleitet. Dadurch entstand eine praetracheale Quaddel, durch die die Präparation der Trachea erleichtert und die Nozizeption des praetrachealen Gebietes

MATERIALIEN UND METHODEN

ausgeschaltet wurde. Anschließend wurde die Haut über der Quaddel median ca. 2,5 cm längs inzidiert und die Trachea unter Schonung der Halsgefäße dargestellt. Über eine Querinzision der Trachea erfolgte die sofortige Intubation mit einem Metalltubus, über den die Ratte mit einem PEEP von 1 mmHg und Raumluft beatmet wurde.

Das Fell wurde nun ventral über dem Abdomen und über dem Thorax entfernt und das Abdomen mit einem Medianschnitt vom Xiphoid bis zur Symphyse eröffnet.

In die linke Vena renalis erfolgte die Injektion von 1000 I.E. Heparin-Natrium, woraufhin diese abgeklemmt wurde, um ein Verbluten der Ratte zu vermeiden.

Das Diaphragma wurde nun vom Thorax abgetrennt und eine mediane Sternotomie vollzogen. Unter Schonung der Lunge wurden mittels Klemmen die beiden Thoraxseiten nach lateral auseinandergebogen, so dass sich der Lungensitus übersichtlich darstellte.

Es wurde zur Gewinnung von Plasma Blut aus dem rechten Ventrikel aspiriert, um die Konzentration von TNF-alpha daraus zu bestimmen (siehe 3.3.2). Danach wurde ein Metallkatheter über einen kleinen Schnitt in den Truncus pulmonalis gebracht und ein Faden zur Fixierung des Katheters um die Ausflussbahn des Herzens zugezogen. Damit war die Aorta verschlossen.

Die Herzspitze wurde dann zur Eröffnung des linken Ventrikels sofort abgetrennt, um einen Blutrückstau in die Lunge zu vermeiden.

Anschließend wurde die Lunge mittels des Perfusates in einer Geschwindigkeit von 4,0 ml/min blutfrei perfundiert und die Lunge mit Raumluft unter Zusatz von 4,5% CO₂ beatmet. Die Temperatur des Kühlsystems für das Perfusat (Thermofix) betrug zu diesem Zeitpunkt 4°C.

Das Herz-Lungenpaket wurde nun unter ständiger Beatmung und Perfusion an den Gewichtsaufnehmer gehängt.

Daraufhin wurde Perfusat aus dem linken Ventrikel entnommen und der pH-Wert des Perfusates mit dem Blutgasanalysegerät bestimmt.

Der pH-Wert des Perfusates lag bei 7,20 +/- 0,05.

3.2.4 Das Beatmungssystem

Das Beatmungssystem setzte sich aus dem Beatmungsgerät, Plastikschläuchen, einem Metalltubus, einer Wasserfalle, einem Luftfilter und einer Gasflasche mit CO₂ zusammen.

Beatmet wurde mit Raumluft, in der sich 150 mmHg O₂ sowie 5 mmHg CO₂ befanden. Die Plastikschläuche dienten als In- und Expirationsschenkel und waren an unterschiedlichen Anschlüssen am Beatmungsgerät angeschlossen, wobei sich am anderen Ende der Plastikschläuche sowohl In- als auch Expirationsschenkel in dem einen Metalltubus vereinigten, der sich in der Trachea der Ratte befand.

Die Wasserfalle wurde im Expirationsschenkel installiert. Aus der Höhe der Wassersäule ergab sich der PEEP. Im Expirationsschenkel befand sich auch ein Luftfilter, damit das Beatmungsgerät vor Kondensationswasser geschützt wurde.

Von der Gasflasche mit CO₂ führte ein Plastikschlauch zum Inspirationsschenkel, so dass CO₂ zur Inspirationsluft stufenlos hinzugefügt werden konnte, um den pH-Wert des Lungenperfusates zu regulieren.

Mit dem Beatmungsgerät erfolgte die Beatmung volumenkontrolliert mit einer Frequenz von 65/min, einer Inspirationszeit von 0,37 sek und einem Volumenfluss von 650 ml/min. Daraus ergab sich ein Inspirationsvolumen von 4 ml.

Bei Bedarf konnte auf eine druckkontrollierte Beatmung mit einem Inspirationsdruck von 20 cmH₂O umgestellt werden (vgl. Abschnitt 3.2.7: Versuchsablauf).

3.2.5 Der Perfusionskreislauf der Rattenlunge

Als Perfusat diente die Elektrolytlösung I/3, Serag-Wiessner, Naila. Das Gesamtvolumen des Perfusates belief sich auf 100 ml. Es wurde mit der Rollerpumpe in einem Schlauchsystem unter gleichmäßigem Volumenfluss transportiert. Das Schlauchsystem bestand aus Silikonschläuchen und einem Tygon-Schlauch, der sich in der Rollerpumpe befand. Der Fluss konnte in 0,1-ml/min-Stufen zwischen 4,0 ml/min und 13,0 ml/min reguliert werden. *Eine Eichung des Flusses erfolgte vor jedem Versuch.*

Durch eine Blasenfalle wurde die luftfreie Perfusion der Lunge gesichert.

MATERIALIEN UND METHODEN

Zur Regulation des pH-Wertes im Perfusat wurde Natriumbikarbonat dem Perfusat hinzugefügt, bis bei einer Temperatur von 25°C ein pH-Wert von 7,4 erreicht worden war.

Das Perfusat befand sich in zwei unabhängig voneinander geschalteten 150 ml fassenden Vorratsgefäßen aus Glas, die jeweils eine äußere und eine innere Kammer besaßen. In der inneren Kammer befand sich das Perfusat, in der äußeren Kammer Flüssigkeit zur Temperierung der inneren Kammer. Beide Kammern wurden von einer Glaswand getrennt, so dass ein Temperaturaustausch zwischen den Kammern möglich war. Die Flüssigkeit zur Temperierung stammte aus dem Thermomix, der eine Einstellung der Temperatur zwischen 4°C und 42°C gestattete.

Das Perfusat beider Vorratsgefäße wurde mittels der Rollerpumpe transportiert, wobei zwischen beiden Vorratsgefäßen hin und her geschaltet werden konnte, ohne den Volumenfluss zu unterbrechen.

Hinter der Rollerpumpe befand sich ein Wärmeaustauscher, der auf die gleiche Temperatur wie der Thermomix eingestellt war. Dadurch wurden Temperaturschwankungen, die durch den Volumenfluss der Rollerpumpe entstanden waren, ausgeglichen.

Der Perfusatfluss mündete schließlich als arterieller Schenkel in den Truncus pulmonalis des Rattenherzens und dadurch orthograd in den Lungenkreislauf.

Der Abfluss des Perfusates geschah über den linken Ventrikel des Rattenherzens, in dem sich ein Katheter befand. Über diesen linksventrikulären Katheter, der den venösen Schenkel bildete, floss das Perfusat wieder in dasselbe Vorratsgefäß zurück, aus dem es gekommen war, sodass ein geschlossener Perfusionskreislauf entstand.

Der linksventrikuläre Abflußdruck LVP wurde mittels des hydrostatischen Druckes reguliert, der durch die Perfusatsäule über dem Rattenherzen gebildet wurde.

Zum Zeitpunkt der Lungenperfusion betrug das Perfusatvolumen im Vorratsgefäß 40 ml, im übrigen Perfusionssystem 60 ml.

Vor jedem Versuch wurden das gesamte Schlauchsystem sowie die beiden Vorratsgefäße mit 1 Liter destilliertem Wasser, gefolgt von 1 Liter isotoner Kochsalzlösung und schließlich 1 Liter Perfusat gespült.

3.2.6 Versuchsaufbau: Illustration

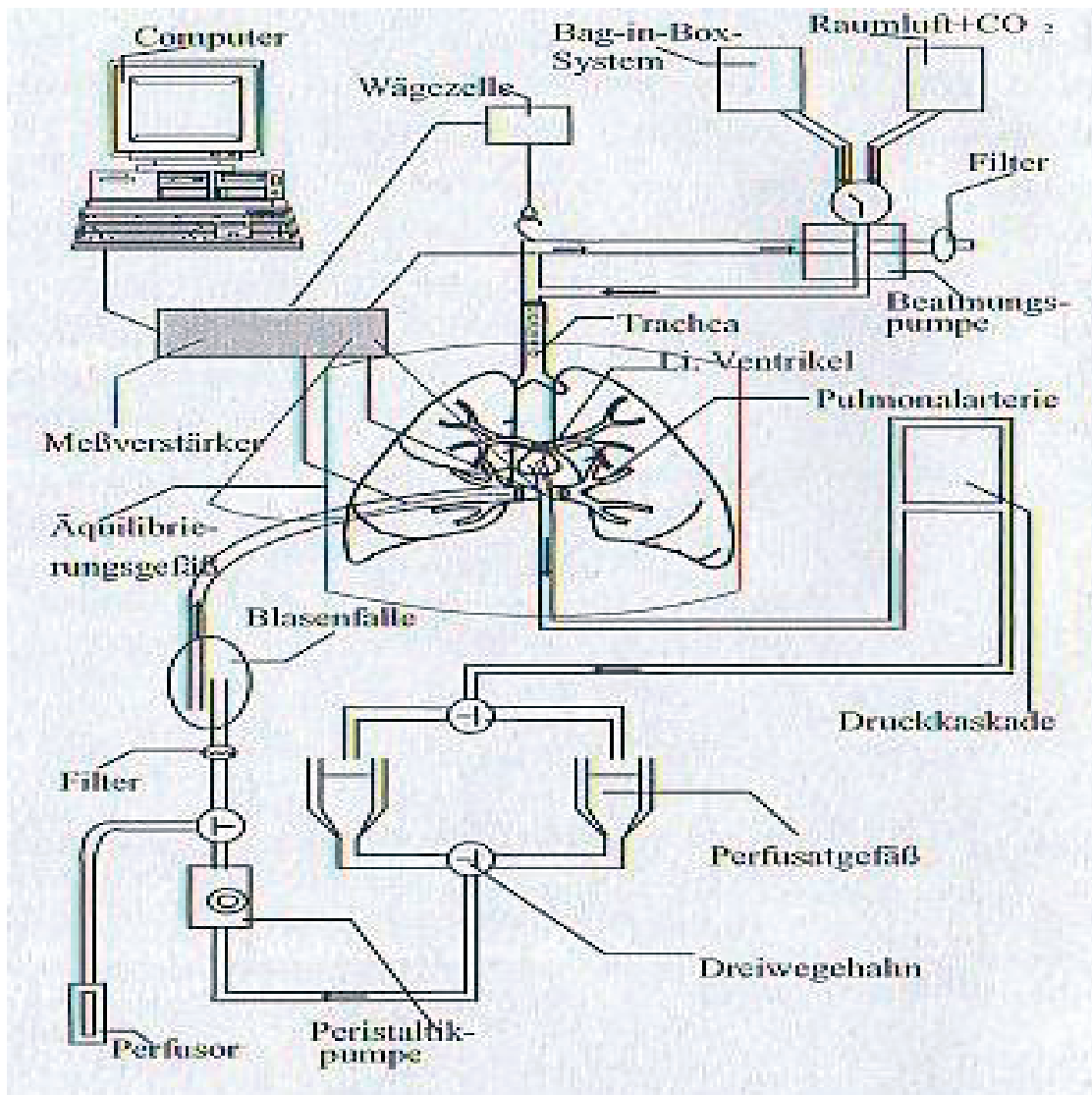


Abbildung 1 [41]: Die Abb. zeigt ein Schema der isolierten, ventilerten Lunge im Perfusionskreislauf ab dem Versuchsstart ($t = 0$).

Die Perfusatgefäße konnten mit dem Dreiwegehahn gewechselt werden, sodass sich nur ein Gefäß im Perfusionssystem befand.

3.2.7 Versuchsablauf

Ab dem Zeitpunkt $t = 0$ war die Rattenlunge isoliert, mit 4 ml Inspirationsvolumen und einem PEEP von 2 mmHg volumenkontrolliert ventiliert und mit dem Perfusat blutfrei perfundiert. Zu diesem Zeitpunkt betrug der Perfusatfluss 13,0 ml/min, die Temperatur des Thermofix 42°C und der mLVP 1 mmHg. Der Zeitpunkt $t = 0$ war der Versuchsstart.
 $t = 180$ (nach 180 Minuten) das Versuchsende.

Der pH-Wert des Perfusates wurde zum Versuchsstart und alle 30 Minuten bestimmt, er wurde durch die stufenlose Zufuhr von CO₂ in der Atemluft bei 7,35 +/- 0,02 konstant gehalten.

Die Aufzeichnung von Lungengewichtszunahme (Δg), mittlerem pulmonal-arteriellem Druck (mPAP), mittlerem linksventrikulärem Druck (mLVP) und Ventilationsdruck (VP) begann zum Zeitpunkt null ($t = 0$) und wurde fortlaufend über einen Monitor graphisch sichtbar gemacht.

3.2.7.1 Rekrutierungsmanöver

Um der Bildung von Atelektasen vorzubeugen, wurde die Lunge alle 30 Minuten gebläht, indem die Beatmung für 3 aufeinanderfolgende Atemzyklen auf druckkontrolliert umgestellt und bis einem maximalen Inspirationsdruck von 20 cmH₂O beatmet wurde. Danach wurde die Beatmung wieder auf volumenkontrolliert umgestellt.

3.2.7.2 Durchführung einer Kaskade

Zur Bestimmung des KFC wurden standardisierte Druckerhöhungen des mLVP vollzogen, wobei der mLVP von 1 mmHg auf 7,5 mmHg erhöht und gleichzeitig das Lungengewicht (g) über die Zeit (t) registriert wurde. Diese Druckerhöhungen wurden als Kaskaden bezeichnet.

Eine Kaskade setzte sich aus einem Druckanstieg, einem Druckplateau und einer Druckabfallphase zusammen. Insgesamt dauerte eine Kaskade 8 Minuten. Der Druckanstieg von 1 mmHg auf 7,5 mmHg dauerte 10 Sekunden. Das Druckplateau

von 7,5 mmHg dauerte bis zum Ende der Kaskade, das heißt bis zur Vollendung der 8. Minute. Die Druckabfallphase auf den Ursprungswert von 1 mmHg geschah praktisch sofort (innerhalb < 1 Sekunde).

3.2.7.3 Tabellarische Darstellung des Versuchsablaufs

Der Versuch begann mit dem Zeitpunkt $t = 0$. Die folgende Tabelle 1 gibt einen Überblick über den Versuchsablauf. **Tabelle 1:**

Zeitpunkt t in Minuten Versuchsstart: t =	Maßnahmen, die immer durchgeführt wurden:	Maßnahmen, die abhängig von der Versuchsgruppe durchgeführt wurden:
0	Rekrutierungsmanöver	
15		Zugabe des PDE-Inhibitors EHNA zum Perfusat
30	Rekrutierungsmanöver, dann Start der 1. Kaskade	
50		Zugabe von PLY zum Perfusat
90	Rekrutierungsmanöver, dann Start der 2. Kaskade	
120	Rekrutierungsmanöver, dann Start der 3. Kaskade	
150	Rekrutierungsmanöver, dann Start der 4. Kaskade	
180	Versuchsende, Abstellen von Beatmung und Perfusion Wiegen des linken Lungenunterlappens zur Bestimmung der WD	

3.2.7.4 Schematische Darstellung des Versuchsablaufs

Aus der **Abbildung 2** gehen die unterschiedlichen Versuchsanordnungen hervor, dargestellt auf einem Zeitstrahl (x-Achse: $t = \text{Zeit}$). EHNA und PLY wurden je nach Versuchsgruppe hinzugefügt. Die Dosierungen von EHNA und PLY variierten zwischen den Versuchsgruppen: 1 oder 10 μM EHNA; 10 oder 20 ng/ml PLY (vgl. auch Abschnitt 3.2.8: Versuchsgruppen). Der Versuchsablauf erlaubte es, die Wirkungen des *in vivo* verabreichten Endotoxins LPS *ex vivo* zu untersuchen, und zwar mit PLY und dem PDE-Inhibitor EHNA.

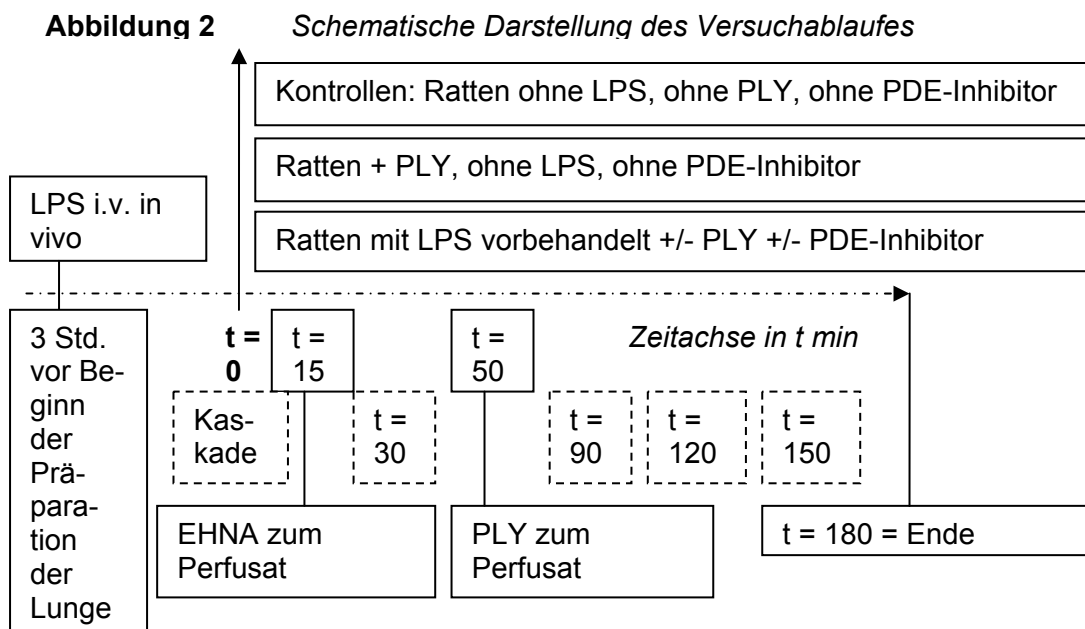
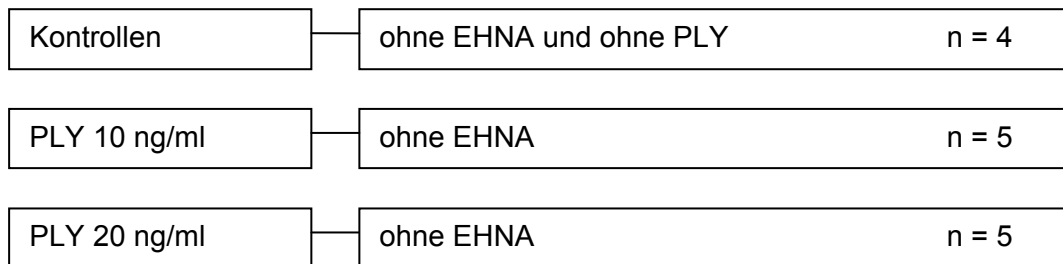


Abb. 2: Der Zeitpunkt $t = 0$ kennzeichnete den Versuchsstart, an dem die Lunge vollständig isoliert und in den Perfusionskreislauf eingebunden war.

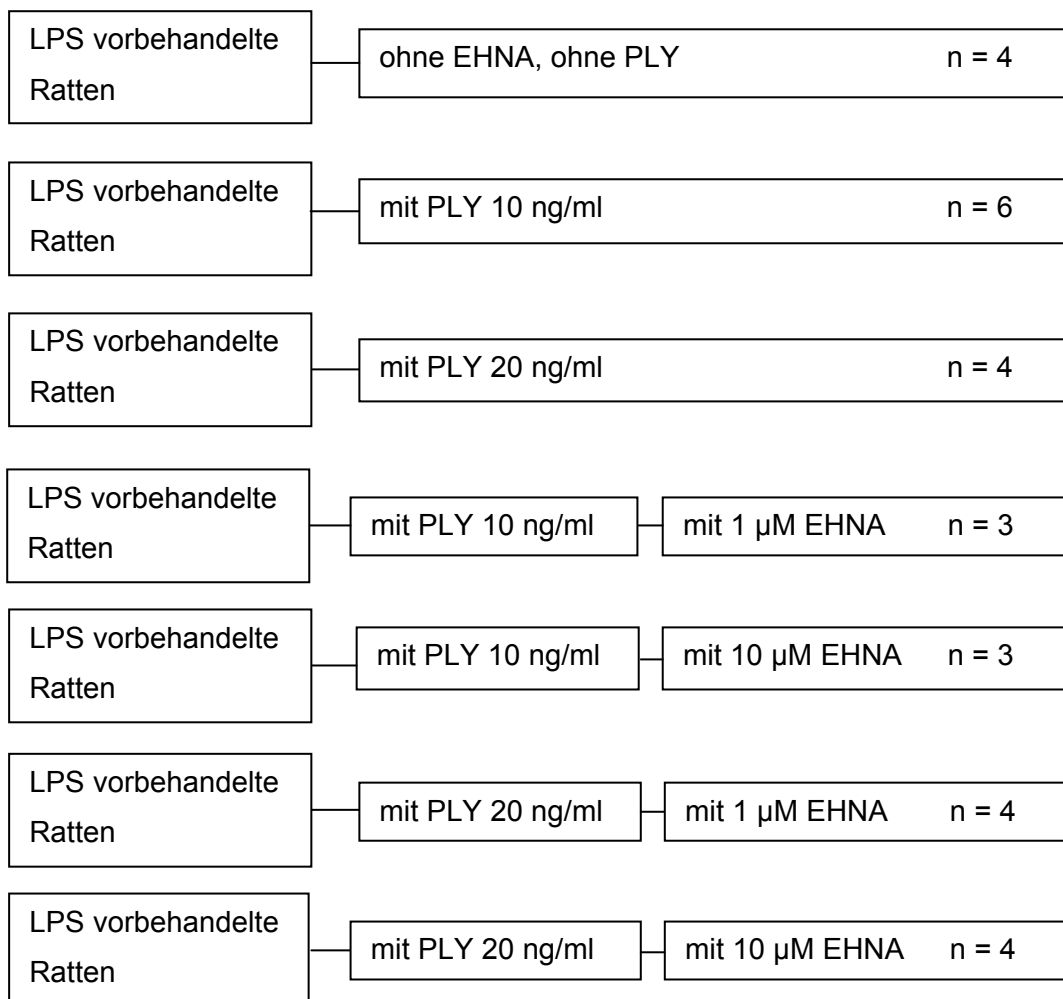
3.2.8 Versuchsgruppen

Als Kontrollen dienten Lungen, die aus nicht mit LPS vorbehandelten Tieren stammten und weder EHNA noch PLY erhielten.

3.2.8.1 ohne LPS: Abbildung 3:



3.2.8.2 mit LPS: Abbildung 4:



3.3 Erfassung von Messwerten

3.3.1 Messwertregistrierung

Der Gewichtsaufnehmer vom Typ U1/A diente zur fortlaufenden Registrierung der Gewichtszunahme der Lunge Δg während der Experimente an der isolierten Rattenlunge. Eine Eichung erfolgte vor jedem Versuch. Mittels Innenkatheter wurden die Beatmungsdrücke (VP, PEEP), der pulmonalarterielle Druck (PAP) und der linksventrikuläre Druck (LVP) kontinuierlich erfasst. Die Katheter waren an den Druckaufnehmer der Firma Braun angeschlossen. Eine Eichung der Druckaufnehmer erfolgte mittels eines Gauer-Eichgerätes wöchentlich, eine Kalibrierung geschah vor jedem Versuch. Die Lungenhilushöhe war Bezugspunkt für 0 mmHg für PAP und LVP. Gewicht und Drücke wurden nun über einen PlugSys-DBA-Verstärker der Firma Hugo Sachs und über eine AD/DA-Wandler-Karte der Firma Decision zu Rechneinheit und Monitor (Pentium 2 und Farbmonitor AOC) geleitet und dort graphisch dargestellt, mittels Microsoft Excel tabellarisch ausgewertet und nach Bedarf über den Tintenstrahldrucker Deskjet 690 C von Hewlett-Packard ausgedruckt.

3.3.2 Gewinnung von Plasma zur Bestimmung von TNF-alpha

Mittels einer 2,5 ml Plastik-Einmalspritze, die mit einer Hohlnadel 18Gx3/2“ (rosa Nadel) versehen war, wurden 1,5 ml des heparinisierten Blutes aus dem rechten Ventrikel vorsichtig aspiriert. In der Spritze befanden sich bereits Pentoxifyllin 2 mg und eine Aprotininmenge 1000 Kallikrein-Inaktivator-Einheiten entsprechend. Die Herzfrequenz betrug bei der Blutaspiration zwischen 20 und 90 Schlägen/min, die Zunge blieb dabei stets rosig.

Mit einer Verzögerung von 3 Minuten wurde das Blut in einer Mikro 12-24 Zentrifuge mit 9000 U/min für 2 Minuten zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren war das Plasma als Überstand erkennbar und wurde sofort bei minus 18° Celsius eingefroren. Das Plasma diente als Analysat für einen ELISA zur Bestimmung von TNF-alpha (siehe Abschnitt 3.3.3: Biochemische Messungen).

3.3.3 Biochemische Messungen

3.3.3.1 TNF-alpha

Bei Versuchsstart ($t = 0$) und alle 60 Minuten wurden Perfusatsproben genommen und zur späteren Bestimmung der TNF-alpha-Konzentration bei minus 18°C eingefroren. Die Konzentration wurde dann mittels eines ELISA bestimmt. Als ELISA diente das ELISA-Kit von BioSource International Inc. aus den USA, das speziell auf die Bestimmung von Rat-TNF-alpha ausgerichtet war. Die Proben wurden aus dem Perfusat von nicht-vorbehandelten Lungen (Kontrollen) und mit LPS vorbehandelten (geprimten) Lungen genommen. Die einzelnen Konzentrationen wurden gegen die Zeit aufgetragen und graphisch dargestellt (siehe Abschnitt 4.5: Ergebnisse, Abb. 17).

3.3.3.2 pH-Wert

Die pH-Werte des Perfusates und des Rattenblutes wurden mittels des Blutgasanalysegerätes AVL Hb 995 bestimmt.

3.3.4 Berechnung des Kapillären Filtrationskoeffizienten

In Anlehnung an die Arbeit von R. Drake et al. [4] konnte innerhalb einer Kaskade aus dem pulmonal arteriellen Druckerhöhung $\Delta\text{PAP}_{\text{Kaskade}}$, dem Lungengewicht g , dem Gewichtsanstieg $\Delta g_{\text{Kaskade}}$ und der Zeitdifferenz $\Delta t_{\text{Kaskade}}$ der KFC bestimmt werden. Dabei galt:

$$\text{KFC} = \Delta g_{\text{Kaskade}} / (\Delta t_{\text{Kaskade}} * g * \Delta\text{PAP}_{\text{Kaskade}} * 100) \text{ [ml / (min * gramm * mmHg)]}$$

3.3.5 Bestimmung der Nass-Trocken-Relation

Nach Versuchsende (siehe Versuchsablauf) wurden Beatmung und Perfusion gestoppt, *der linke Lungenunterlappen* proximal mit einer Pinzette umfasst und auf der proximalen Seite mit einer Schere vom Rest der Lunge getrennt. Danach wurde der abgetrennte Lungenunterlappen gewogen und 3 Tage in einem Brutschrank getrocknet. Der getrocknete Lungenunterlappen wurde erneut gewogen und die WD bestimmt, indem das Nassgewicht durch das Trockengewicht geteilt wurde.

3.3.6 Einteilung und Speicherung der Messwerte

Die gemessenen Größen ließen sich in kontrollierte und nicht-kontrollierte Werte einteilen, die ab dem Versuchsstart ($t = 0$) kontinuierlich auf dem Monitor sichtbar gemacht und in der Rechereinheit (Pentium 2) gespeichert wurden.

Zu den kontrollierten Werten zählten

- der mLVP
- der PEEP

Zu den nichtkontrollierten Werten, die zu den Ergebnissen dieser Arbeit führten, zählten

- der mPAP
- die Gewichtszunahme der Lunge Δg
- der TNF-alpha-Spiegel im Pefusat
- die Nass-Trocken-Relation WD
- der KFC

WD und KFC wurden berechnet (vgl. Abschnitt 3.3.5: Bestimmung der Nass-Trocken-Relation und Abschnitt 3.3.4; Berechnung des Kapillären Filtrationskoeffizienten).

3.4 Durchführung der Experimente

Der Priming-Effekt und Unterschiede zwischen einer spezifischen versus einer unspezifischen PDE-Inhibition sollen untersucht werden.

(vgl. Abschnitt 3: Ziele dieser Arbeit)

3.4.1 Priming-Effekt

Zur Darstellung des Priming-Effektes erhielten die Ratten 3 Stunden vor dem Beginn der Lungenpräparation 2,5 mg/kg LPS intravenös. Die Lunge wurde dann präpariert und in den Perfusionskreislauf eingebunden.

Die Messwertregistrierung begann bei $t = 0$.

3.4.2 Unterschiede zwischen spezifischer PDE-2-Inhibition und unspezifischer PDE-Inhibition

Die Unterschiede wurden an Ratten untersucht, die mit LPS vorbehandelt waren (LPS 2,5 mg/kg) und deren Lungen über das Perfusat zuerst den PDE-Inhibitor EHNA ($t = 15$), dann PLY ($t = 50$) erhielten.

3.4.2.1 Spezifische Inhibition der PDE-2

Um die Einflüsse einer spezifischen Inhibition der PDE-2 zu untersuchen, wurde 1 μM EHNA zum Perfusat gegeben.

3.4.2.2 Unspezifische Inhibition der PDE

Um die Einflüsse einer unspezifischen PDE-Inhibition zu untersuchen, wurde 10 μM EHNA zum Perfusat gegeben.

3.5 Statistik

3.5.1 Shapiro-Wilk-Test

Test auf Normalverteilung:

Zunächst wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test geprüft, ob die Parameter mPAP, Δg , KFC und WD mit einer Wahrscheinlichkeit von mindestens 95% aus normal verteilten Grundgesamtheiten stammen ($\alpha = 5\%$). Die Nullhypothese H_0 lautete: Die erhobenen Daten stammen aus einer normal verteilten Grundgesamtheit. Die Alternativhypothese H_1 lautete: Die erhobenen Daten stammen *nicht* aus einer normal verteilten Grundgesamtheit. Als Entscheidungskriterium, ob die Alternativhypothese H_1 angenommen werden konnte, wurde der p-Wert zu Grunde gelegt: Wenn $p < 5\%$ war, wurde H_1 angenommen.

Dabei wurde von 2 Grundgesamtheiten ausgegangen: Die eine bestand aus Tieren ohne, die andere mit LPS-Vorbehandlung. Für beide Kollektive ergaben sich folgende p-Werte:

mPAP	$p > 0,05$: H_0 wurde beibehalten,	normal verteilt
Δg	$p < 0,05$: H_1 wurde angenommen,	<i>nicht</i> normal verteilt
KFC	$p > 0,05$: H_0 wurde beibehalten	normal verteilt
WD:	$p > 0,05$: H_0 wurde beibehalten	normal verteilt

3.5.2 Student's T-Test

Für mPAP, KFC und WD wurde aufgrund der Ergebnisse des Shapiro-Wilk-Testes (siehe Abschnitt 3.5.1) der zweiseitige Student's T-Test für unverbundene Stichproben angewandt. Die Nullhypothese H_0 lautete: Es gibt keinen Unterschied zwischen den Erwartungswerten μ_1 und μ_2 zweier Versuchsgruppen zum Versuchszeitpunkt t , die Versuchsgruppen unterscheiden sich nicht: $H_0: \mu_1 = \mu_2$. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha = 5\%$ festgelegt. Als Entscheidungskriterium, ob die Alternativhypothese H_1 mit $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$ angenommen werden konnte, wurde der p-Wert zu Grunde gelegt: Wenn p kleiner als α war ($p < 0,05$), wurde die Alternativhypothese H_1 angenommen (die Versuchsgruppen unterscheiden sich).

3.5.3 Mann-Whitney-U-Test

Für Δg wurde aufgrund der Ergebnisse des Shapiro-Wilk-Testes (siehe Abschnitt 3.5.1) der zweiseitige Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben angewandt. Die Nullhypothese H_0 lautete: Es gibt *keinen* Unterschied zwischen den Medianen x_1 und x_2 zweier Versuchsgruppen zum Versuchszeitpunkt t , die Versuchsgruppen unterscheiden sich nicht: $H_0: x_1 = x_2$

Als Signifikanzniveau wurde $\alpha = 5\%$ festgelegt. Als Entscheidungskriterium, ob die Alternativhypothese H_1 mit $H_1: x_1 \neq x_2$ angenommen werden konnte, wurde der p-Wert zu Grunde gelegt: Wenn p kleiner als α war ($p < 0,05$), wurde die Alternativhypothese H_1 angenommen (die Versuchsgruppen unterscheiden sich).

ERGEBNISSE

mPAP

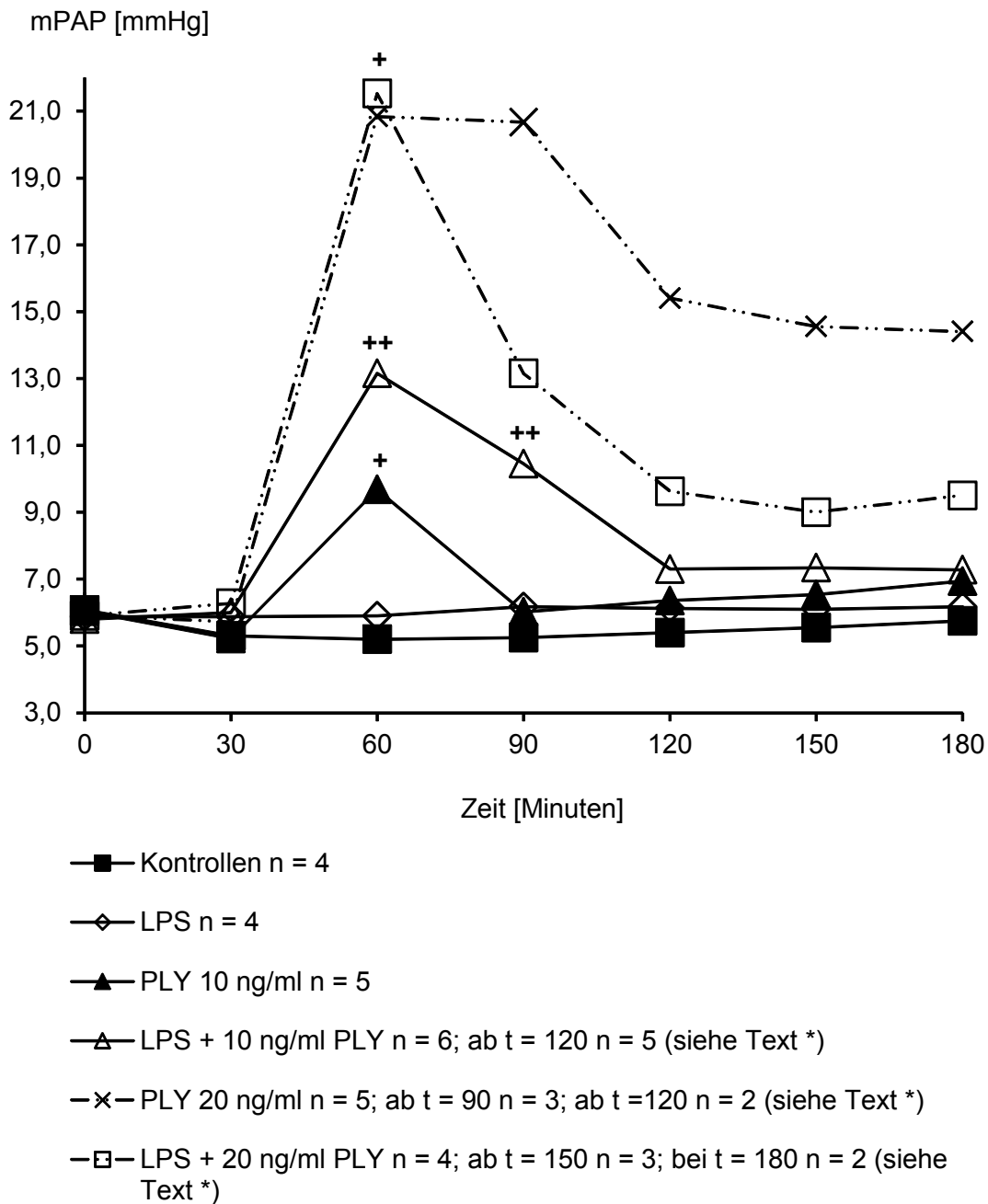
4. Ergebnisse

4.1 Mittlerer Pulmonalarterieller Druck

4.1.1 Priming-Effekt (mPAP)

Abb. 5: Darstellung der Mittelwerte als Symbole. Signifikanzen sind mit + und ++ gekennzeichnet.

Priming mit LPS +/- PLY: mPAP



ERGEBNISSE

mPAP

Abb. 5:

PLY führte per se mit 10 und 20 ng/ml zu einem signifikanten Druckanstieg bei $t = 60$ (Student's T-Test: $p < 0,05$, Vergleich mit Kontrollen; Signifikanzen mit + gekennzeichnet), während eine alleinige Vorbehandlung mit LPS (ohne PLY) keinen Druckanstieg ergab (Student's T-Test $p > 0,05$, Vergleich mit Kontrollen).

Darstellung des Priming-Effektes mit 10 ng/ml PLY:

Bei $t = 60$ und $t = 90$ war der mPAP bei Lungen aus mit LPS vorbehandelten Tieren signifikant höher als bei Lungen, die auch PLY erhielten, aber nicht mit LPS vorbehandelt waren (Student's T-Test: $p < 0,05$, Vergleich zwischen PLY 10 ng/ml und LPS + 10 ng/ml PLY; Signifikanzen mit ++ gekennzeichnet). Mit 20 ng/ml PLY kam es wegen eines massiven Lungenödems zu relativ vielen Versuchsabbrüchen. Der Priming-Effekt konnte in der Gruppe 20 ng/ml PLY nicht belegt werden (Student's T-Test: $p > 0,05$, Vergleich zwischen PLY 20 ng/ml und LPS + 20 ng/ml PLY).

*Die Anzahl n der ventilier- und perfundierbaren Lungen reduzierte sich wegen massiver Ödementwicklung.

ERGEBNISSE

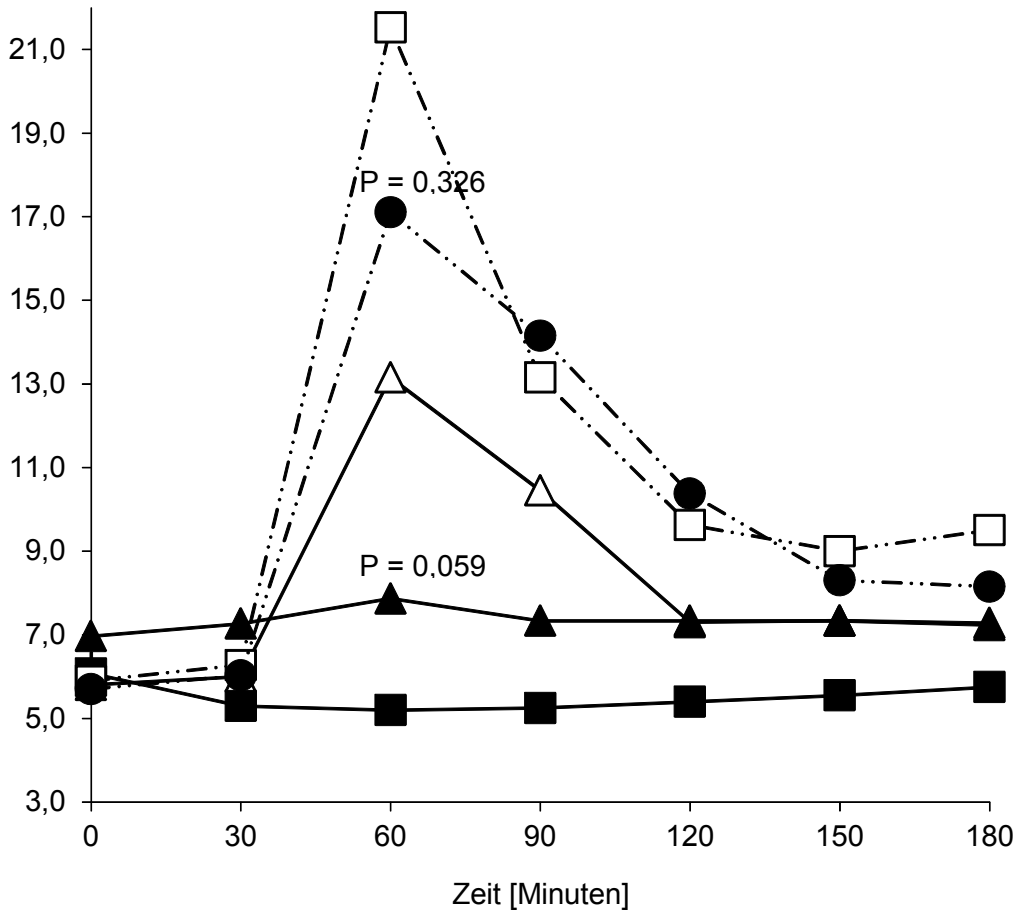
mPAP

4.1.2 Spezifische Inhibition der PDE-2 (mPAP)

Abb. 6: Darstellung der Mittelwerte als Symbole.

Spezifische PDE-2-Inhibition: mPAP

mPAP [mmHg]



—■— Kontrollen n = 4

—△— LPS + 10 ng/ml PLY n = 6; ab t = 120 n = 5 (siehe Text *)

—▲— LPS + 10 ng/ml PLY + 1 µM EHNA n = 3

—□— LPS + 20 ng/ml PLY n = 4; ab t = 150 n = 3; bei t = 180 n = 2 (siehe Text *)

—●— LPS + 20 ng/ml PLY + 1 µM EHNA n = 4; bei t = 180 n = 2 (siehe Text *)

ERGEBNISSE

mPAP

Abb. 6:

Durch eine spezifische PDE-2-Inhibition mit 1 μM EHNA konnte bei mit LPS vorbehandelten Tieren Folgendes erreicht werden:

Mit 10 ng/ml PLY gab es bei $t = 60$ einen Trend zur Senkung des mPAP. Das Signifikanzniveau wurde knapp verfehlt (Student's T-Test: $p = 0,059$, Vergleich zwischen LPS + 10 ng/ml PLY und LPS + 10 ng/ml PLY + 1 μM EHNA).

Mit 20 ng/ml PLY gab es bei $t = 60$ einen Trend zur Senkung des mPAP (Student's T-Test: $p = 0,326$, Vergleich zwischen LPS + 20 ng/ml PLY und LPS + 20 ng/ml PLY + 1 μM EHNA).

* Die Anzahl n der ventilier- und perfundierbaren Lungen reduzierte sich wegen massiver Ödementwicklung.

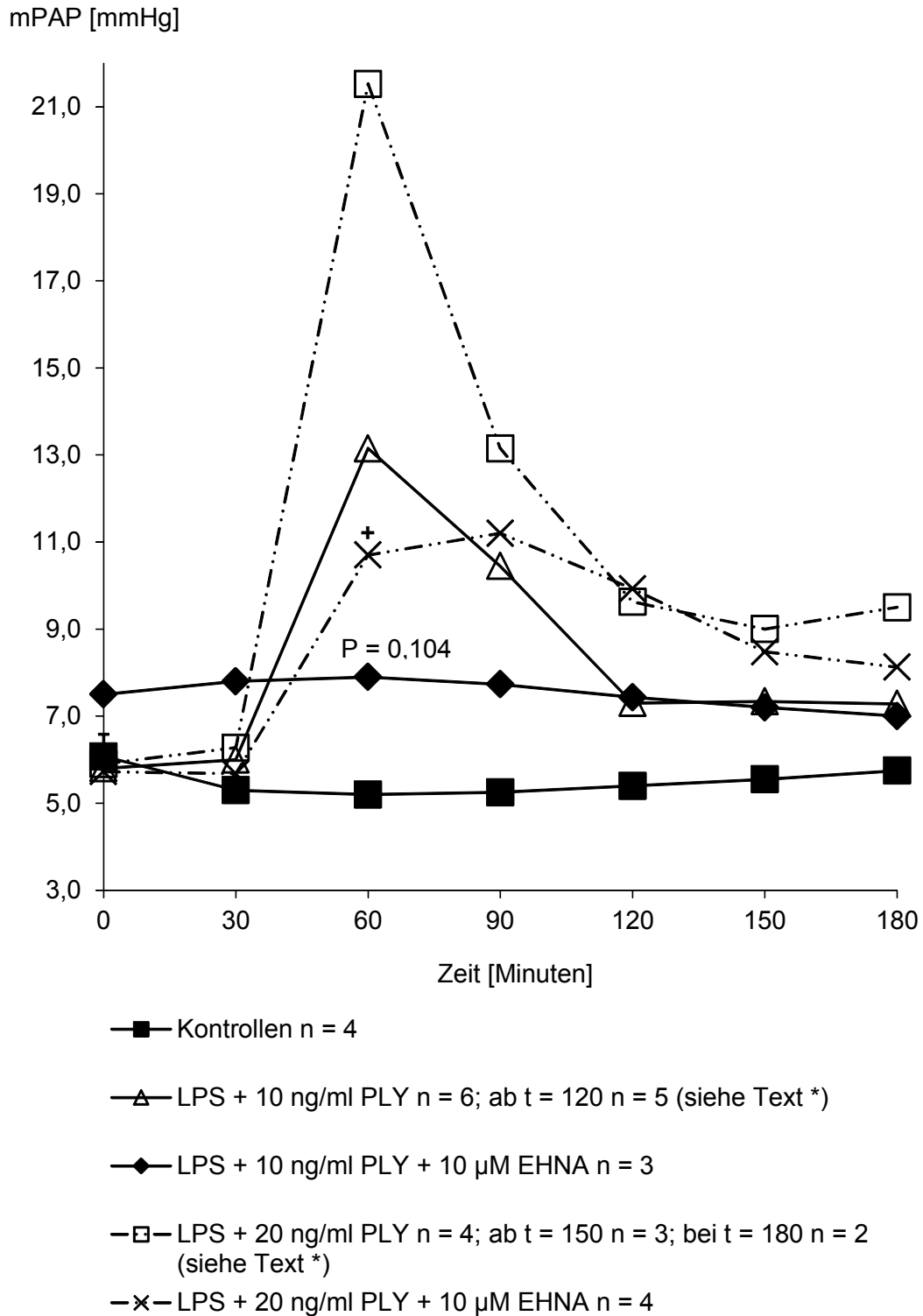
ERGEBNISSE

mPAP

4.1.3 Unspezifische Inhibition der PDE (mPAP)

Abb. 7: Darstellung der Mittelwerte als Symbole. Signifikanzen sind mit + gekennzeichnet.

Unspezifische PDE-Inhibition: mPAP



ERGEBNISSE

mPAP

Abb. 7:

Durch eine unspezifische PDE-Inhibition mit 10 μ M EHNA ergab sich bei mit LPS vorbehandelten Tieren Folgendes:

Mit 10 ng/ml PLY konnte der mPAP nicht signifikant gesenkt werden, es gab allenfalls einen Trend zur Senkung des mPAP (Student's T-Test: $p = 0,104$, Vergleich zwischen LPS + 10 ng/ml PLY und LPS + 10 ng/ml PLY + 10 μ M EHNA).

Mit 20 ng/ml PLY konnte der mPAP bei $t = 60$ signifikant gesenkt werden (Student's T-Test: $p < 0,05$, Vergleich zwischen LPS + 20 ng/ml PLY und LPS + 20 ng/ml PLY + 10 μ M EHNA; Signifikanzen mit + gekennzeichnet).

* Die Anzahl n der ventilier- und perfundierbaren Lungen reduzierte sich wegen massiver Ödementwicklung.

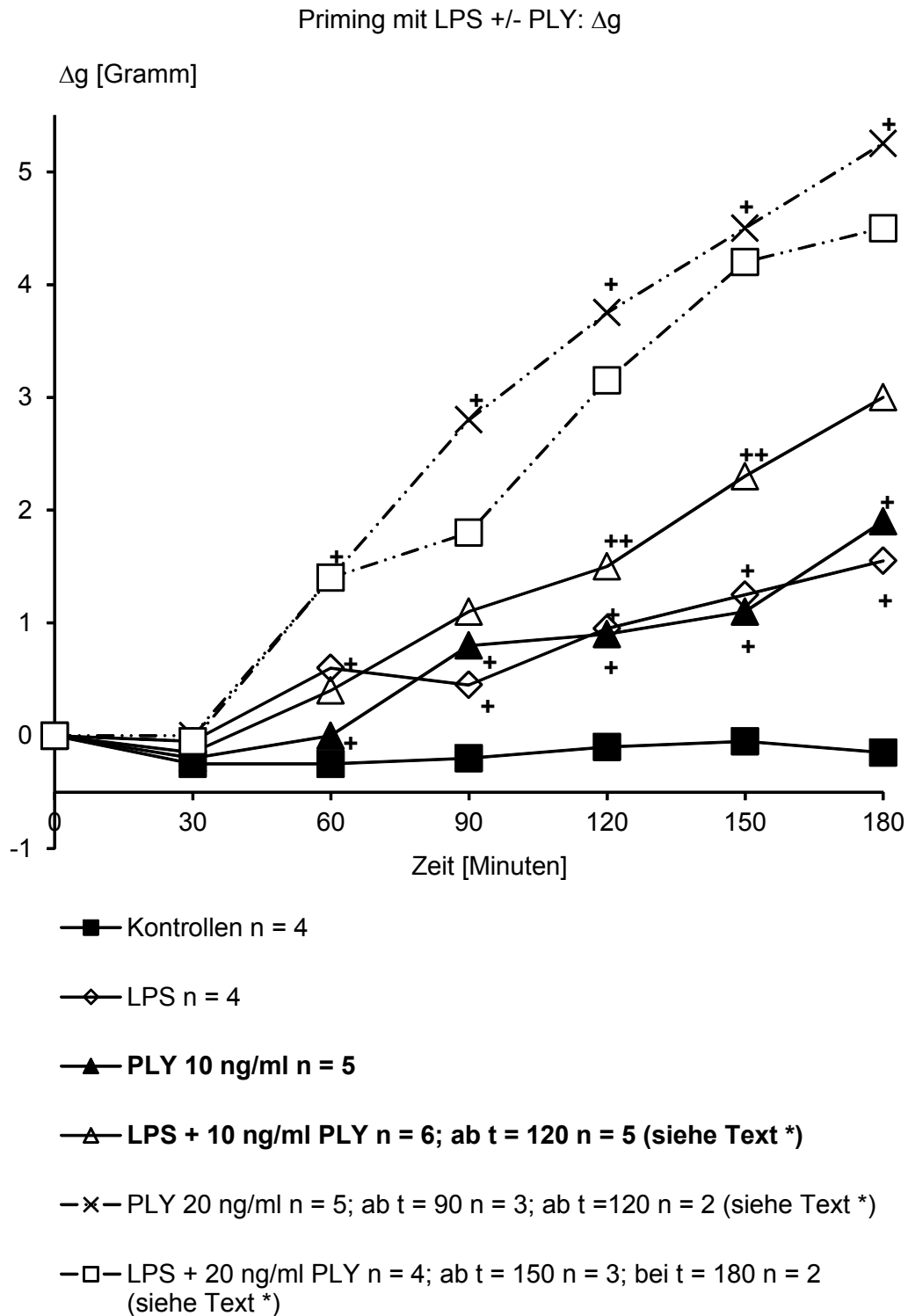
ERGEBNISSE

Δg

4.2 Gewichtszunahme der Lunge

4.2.1 Priming-Effekt (Δg)

Abb. 8: Darstellung der Mediane als Symbole. Signifikanzen sind mit + und ++ gekennzeichnet.



ERGEBNISSE

Δg

Abb. 8:

Mit PLY 10 oder 20 ng/ml per se und bei mit LPS vorbehandelten Tieren ohne PLY kam es ab $t = 60$ zu einem signifikanten Anstieg von Δg (U-Test: $p < 0,05$, Vergleich mit Kontrollen; Signifikanzen mit + gekennzeichnet).

Darstellung des Priming-Effektes mit 10 ng/ml PLY:

Bei $t = 90$ gab es bei Δg bei Lungen aus mit LPS vorbehandelten Tieren einen Trend, höher zu sein als bei Lungen, die auch PLY erhielten, aber nicht mit LPS vorbehandelt waren. Dieser Unterschied war bei $t = 120$ und $t = 150$ signifikant (U-Test: $p < 0,05$, Vergleich zwischen PLY 10 ng/ml und LPS + 10 ng/ml PLY; Signifikanzen mit ++ gekennzeichnet).

Mit 20 ng/ml PLY kam es wegen eines massiven Lungenödems zu vielen Versuchsabbrüchen. Der Priming-Effekt konnte in der Gruppe 20 ng/ml PLY nicht gezeigt werden (U-Test: $p > 0,05$, Vergleich zwischen PLY 20 ng/ml und LPS + 20 ng/ml PLY).

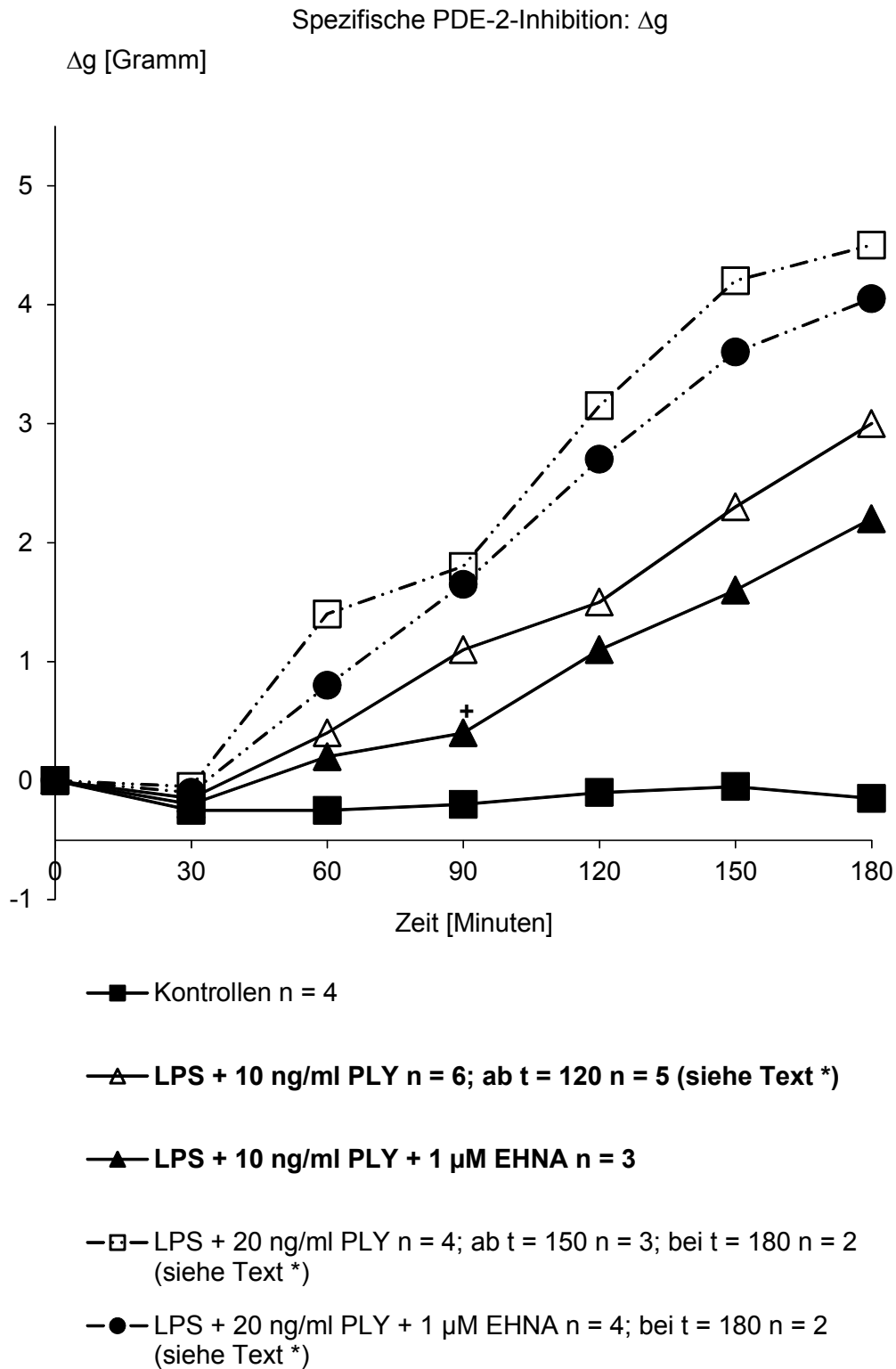
* Die Anzahl n der ventilier- und perfundierbaren Lungen reduzierte sich wegen massiver Ödementwicklung.

ERGEBNISSE

Δg

4.2.2. Spezifische Inhibition der PDE-2 (Δg)

Abb. 9: Darstellung der Mediane als Symbole. Signifikanzen sind mit + gekennzeichnet.



ERGEBNISSE

Δg

Abb. 9:

Durch eine spezifische PDE-2-Inhibition mit 1 μM EHNA konnte bei mit LPS vorbehandelten Tieren Folgendes erreicht werden:

Mit 10 ng/ml PLY wurde Δg bei $t = 90$ signifikant gesenkt (U-Test: $p < 0,05$, Vergleich zwischen LPS + 10 ng/ml PLY und LPS + 10 ng/ml PLY + 1 μM EHNA; Signifikanzen mit + gekennzeichnet).

Mit 20 ng/ml PLY konnte Δg nicht signifikant gesenkt werden (U-Test: $p > 0,05$, Vergleich zwischen LPS + 20 ng/ml PLY und LPS + 20 ng/ml PLY + 1 μM EHNA).

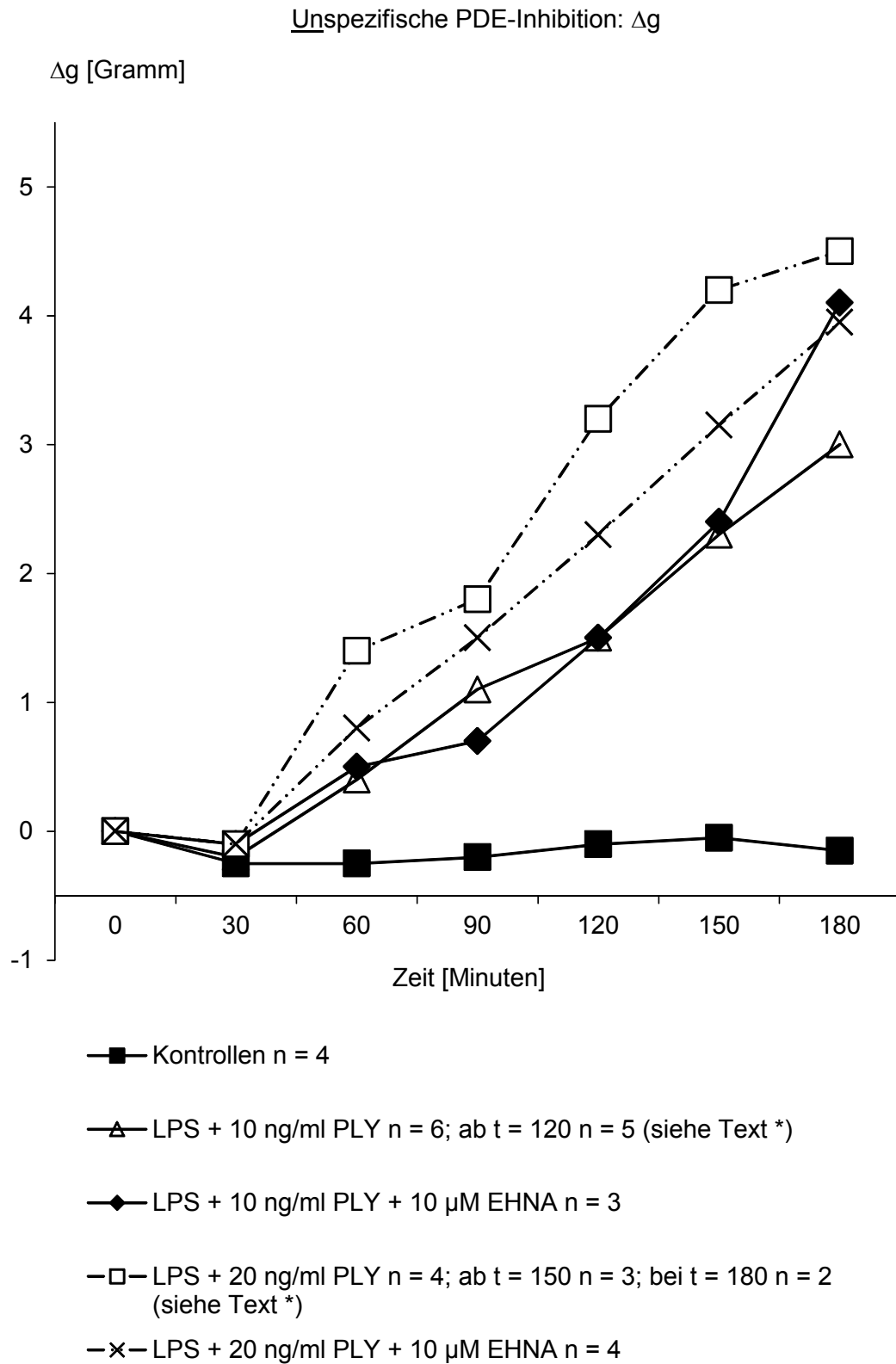
* Die Anzahl n der ventilier- und perfundierbaren Lungen reduzierte sich wegen massiver Ödementwicklung.

ERGEBNISSE

Δg

4.2.3 Unspezifische Inhibition der PDE (Δg)

Abb. 10: Darstellung der Mediane als Symbole.



ERGEBNISSE

Δg

Abb. 10:

Durch eine unspezifische PDE-Inhibition mit 10 μM EHNA konnte bei mit LPS vorbehandelten Tieren, die 10 ng/ml PLY oder 20 ng/ml PLY erhielten, Δg nicht signifikant gesenkt werden (U-Test: $p > 0,05$, Vergleich zwischen LPS + 10 ng/ml PLY und LPS + 10 ng/ml PLY + 10 μM EHNA und Vergleich zwischen LPS + 20 ng/ml PLY und LPS + 20 ng/ml PLY + 10 μM EHNA).

*Die Anzahl n der ventilier- und perfundierbaren Lungen reduzierte sich wegen massiver Ödementwicklung.

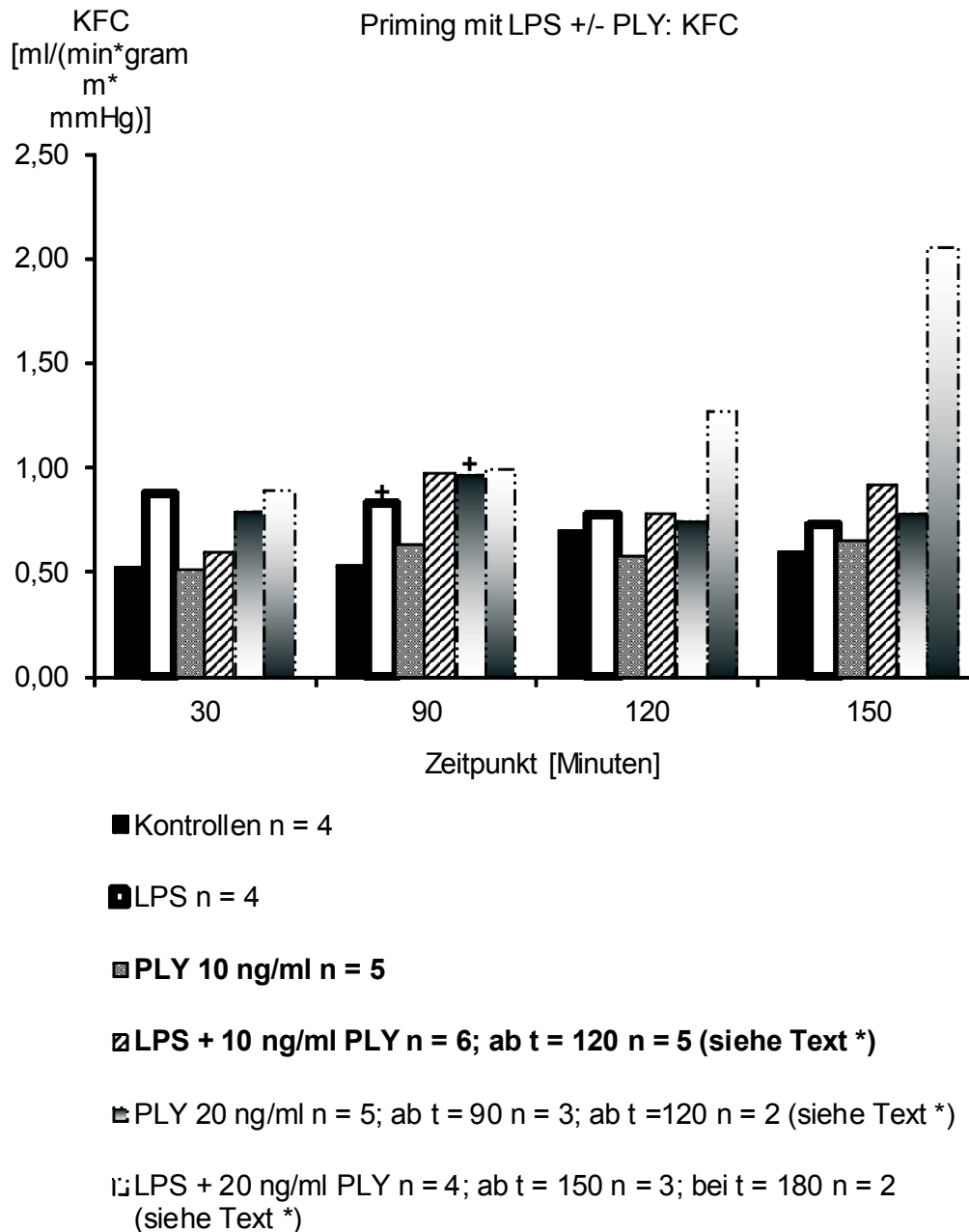
ERGEBNISSE

KFC

4.3 Kapillärer Filtrationskoeffizient

4.3.1 Priming-Effekt (KFC)

Abb. 11: Darstellung der Mittelwerte als Balken. Signifikanzen sind mit + gekennzeichnet.



ERGEBNISSE

KFC

Abb. 11:

Bei mit PLY 20 ng/ml und bei mit LPS vorbehandelten Tieren ohne PLY kam es bei $t = 90$ zu einem signifikanten Anstieg des KFC (Student's T-Test: $p < 0,05$, Vergleich mit Kontrollen; Signifikanzen mit + gekennzeichnet).

Der Priming-Effekt konnte für den KFC mit 10 ng/ml oder 20 ng/ml PLY nicht gezeigt werden (Student's T-Test: $p > 0,05$, Vergleich zwischen PLY 10 ng/ml und LPS + 10 ng/ml PLY und Vergleich zwischen PLY 20 ng/ml und LPS + 20 ng/ml PLY).

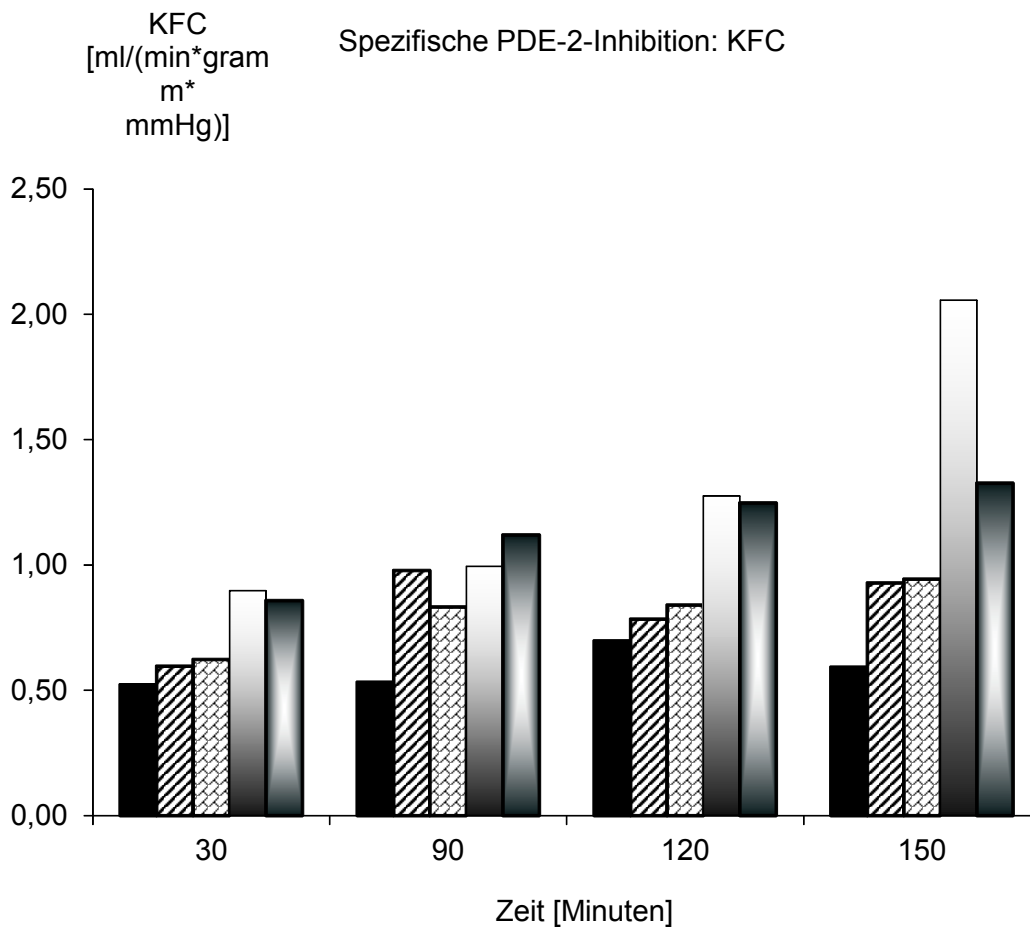
*Die Anzahl n der ventilier- und perfundierbaren Lungen reduzierte sich wegen massiver Ödementwicklung.

ERGEBNISSE

KFC

4.3.2 Spezifische Inhibition der PDE-2 (KFC)

Abb. 12: Darstellung der Mittelwerte als Balken.



■ Kontrollen n = 4

▨ LPS + 10 ng/ml PLY n = 6; ab t = 120 n = 5 (siehe Text *)

▩ LPS + 10 ng/ml PLY + 1 µM EHNA n = 3

□ LPS + 20 ng/ml PLY n = 4; ab t = 150 n = 3; bei t = 180 n = 2 (siehe Text *)

▣ LPS + 20 ng/ml PLY + 1 µM EHNA n = 4; bei t = 180 n = 2 (siehe Text *)

ERGEBNISSE

KFC

Abb. 12:

Durch eine spezifische Inhibition der PDE-2 mit 1 μM EHNA konnte der KFC bei mit LPS vorbehandelten Tieren, deren Lungenperfusat 10 ng/ml oder 20 ng/ml PLY enthielt, nicht signifikant gesenkt werden (Student's T-Test: $p > 0,05$, Vergleich zwischen LPS + 10 ng/ml PLY und LPS + 10 ng/ml PLY + 1 μM EHNA und Vergleich zwischen LPS + 20 ng/ml PLY und LPS + 20 ng/ml PLY + 1 μM EHNA).

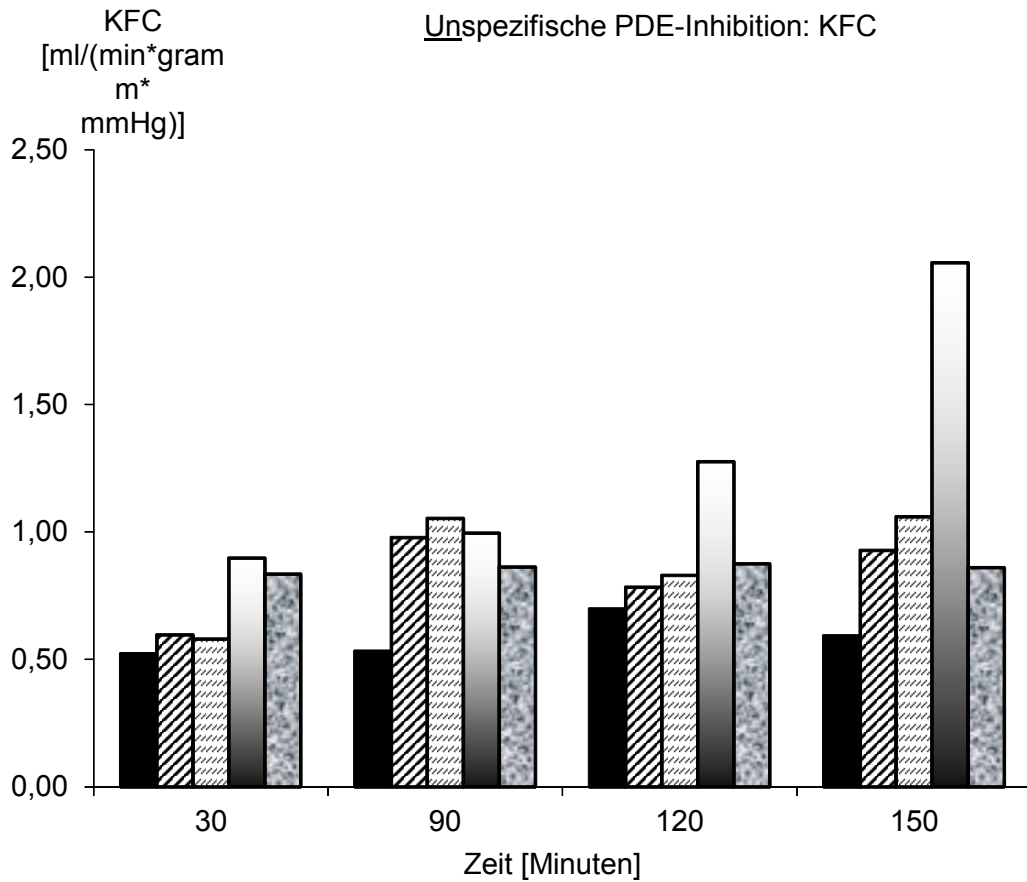
*Die Anzahl n der ventilier- und perfundierbaren Lungen reduzierte sich wegen massiver Ödementwicklung.

ERGEBNISSE

KFC

4.3.3 Unspezifische Inhibition der PDE (KFC)

Abb. 13: Darstellung der Mittelwerte als Balken.



■ Kontrollen n = 4

▨ LPS + 10 ng/ml PLY n = 6; ab t = 120 n = 5 (siehe Text *)

▩ LPS + 10 ng/ml PLY + 10 µM EHNA n = 3

□ LPS + 20 ng/ml PLY n = 4; ab t = 150 n = 3; bei t = 180 n = 2 (siehe Text *)

▤ LPS + 20 ng/ml PLY + 10 µM EHNA n = 4

ERGEBNISSE

KFC

Abb. 13:

Durch eine unspezifische PDE-Inhibition mit 10 μ M EHNA konnte der KFC bei mit LPS vorbehandelten Tieren, die 10 ng/ml oder 20 ng/ml PLY erhielten, nicht signifikant gesenkt werden (Student's T-Test: $p > 0,05$, Vergleich zwischen LPS + 10 ng/ml PLY und LPS + 10 ng/ml PLY + 10 μ M EHNA und Vergleich zwischen LPS + 20 ng/ml PLY und LPS + 20 ng/ml PLY + 10 μ M EHNA).

* Die Anzahl n der ventilier- und perfundierbaren Lungen reduzierte sich wegen massiver Ödementwicklung.

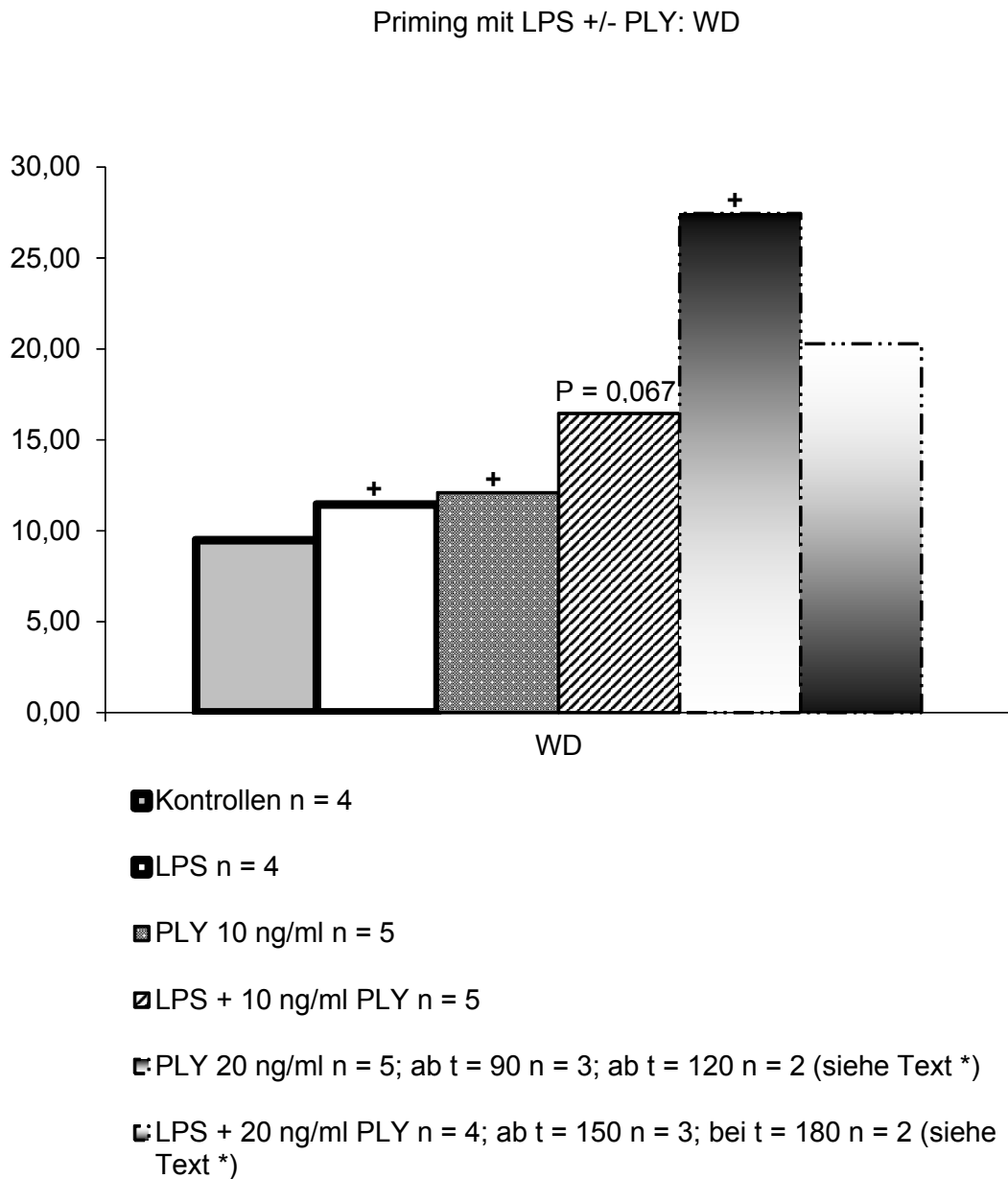
ERGEBNISSE

WD

4.4 Nass-Trocken-Relation

4.4.1 Priming-Effekt (WD)

Abb. 14: Darstellung der Mittelwerte als Balken. Signifikanzen sind mit + gekennzeichnet.



ERGEBNISSE

WD

Abb. 14

Bei mit PLY 10 oder 20 ng/ml und bei mit LPS vorbehandelten Tieren ohne PLY kam es zu einem signifikanten Anstieg der WD (Student's T-Test: $p < 0,05$, Vergleich mit Kontrollen; Signifikanzen mit + gekennzeichnet).

Darstellung des Priming-Effektes mit 10 ng/ml PLY: Es gab einen Trend, dass die WD bei Lungen aus mit LPS vorbehandelten Tieren höher war als bei Lungen, die auch PLY erhielten, aber nicht mit LPS vorbehandelt waren. Das Signifikanzniveau wurde knapp verfehlt (Student's T-Test: $p = 0,067$, Vergleich zwischen PLY 10 ng/ml und LPS + 10 ng/ml PLY).

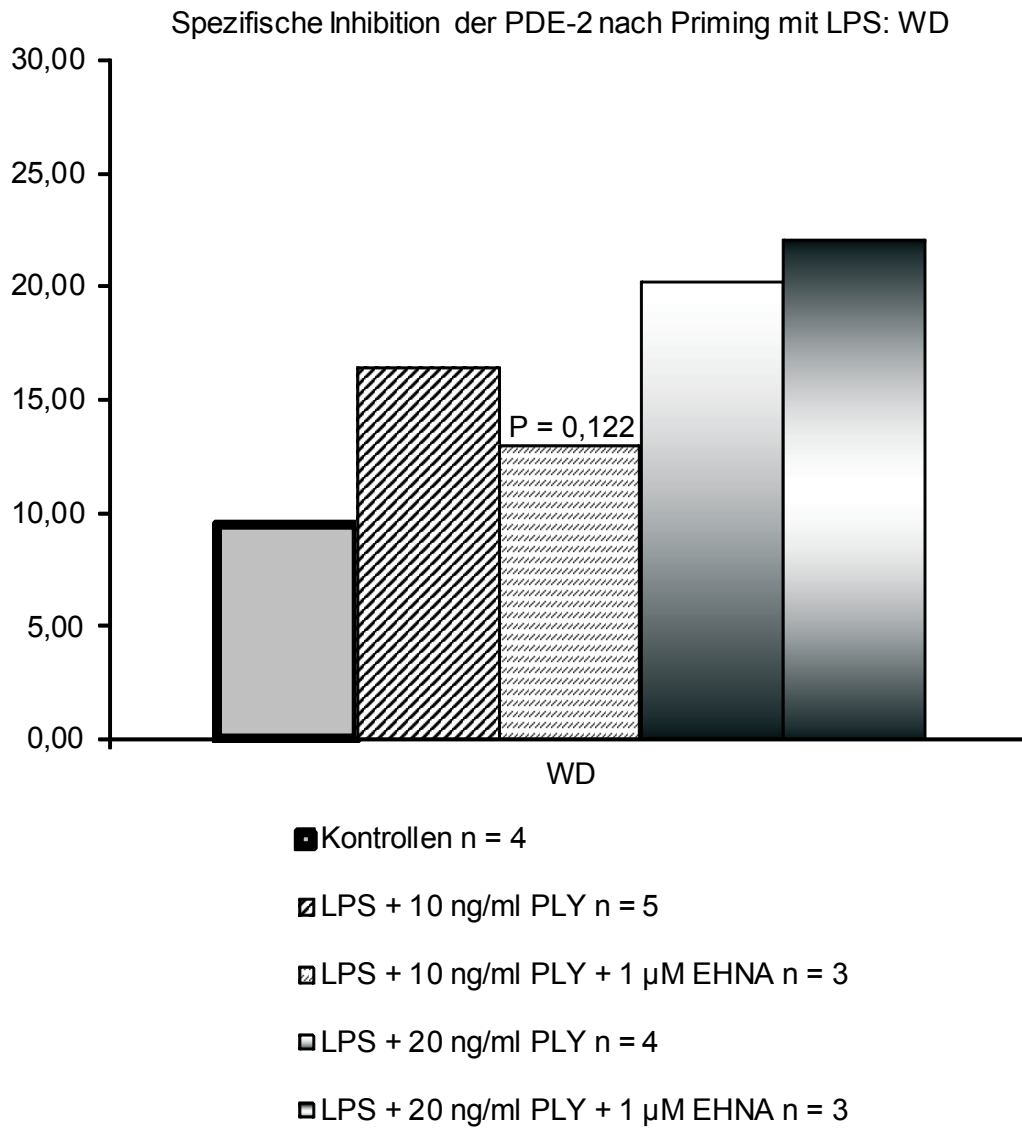
Mit 20 ng/ml PLY kam es wegen eines massiven Lungenödems zu vielen Versuchsabbrüchen*. Der Priming-Effekt konnte in der Gruppe 20 ng/ml PLY nicht gezeigt werden (Student's T-Test: $p > 0,05$, Vergleich zwischen PLY 20 ng/ml und LPS + 20 ng/ml PLY).

ERGEBNISSE

WD

4.4.2 Spezifische Inhibition der PDE-2 (WD)

Abb. 15: Darstellung der Mittelwerte als Balken.



ERGEBNISSE

WD

Abb. 15:

Durch eine spezifische Inhibition der PDE-2 mit 1 μM EHNA konnte bei mit LPS vorbehandelten Tieren, deren Lungenperfusat 10 ng/ml oder 20 ng/ml PLY erhielt, die WD nicht signifikant gesenkt werden (Student's T-Test: $p > 0,05$, Vergleich zwischen LPS + 10 ng/ml PLY und LPS + 10 ng/ml PLY + 1 μM EHNA und Vergleich zwischen LPS + 20 ng/ml PLY und LPS + 20 ng/ml PLY + 1 μM EHNA).

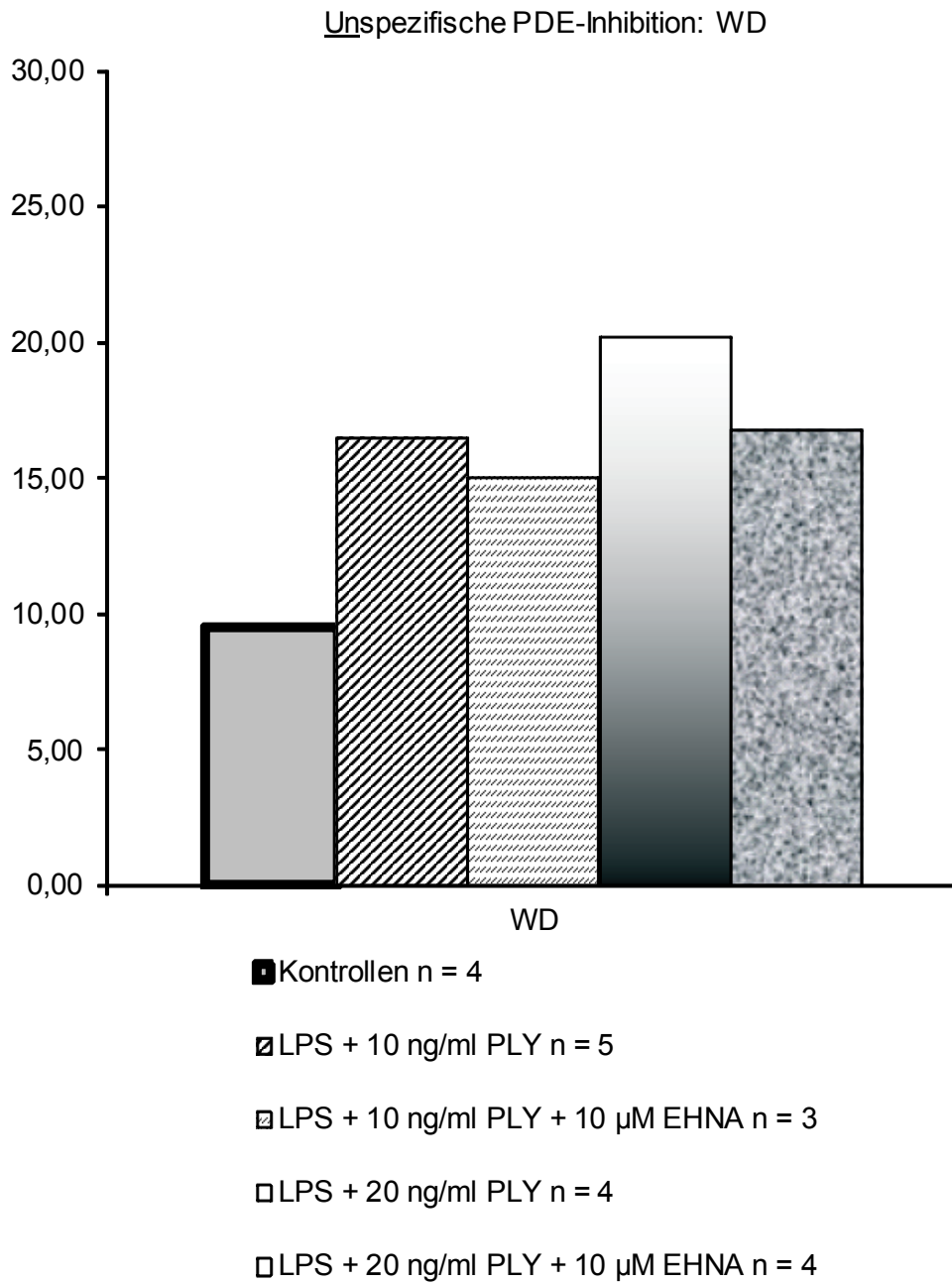
Durch eine spezifische PDE-2-Inhibition mit 1 μM EHNA konnte bei mit LPS vorbehandelten Tieren, die 10 ng/ml PLY erhielten, allerdings ein Trend zur Senkung der WD festgestellt werden (Student's T-Test: $p = 0,122$, Vergleich zwischen LPS + 10 ng/ml PLY und LPS + 10 ng/ml PLY + 1 μM EHNA).

ERGEBNISSE

WD

4.4.3 Unspezifische Inhibition der PDE (WD)

Abb. 16: Darstellung der Mittelwerte als Balken.



ERGEBNISSE

WD

Abb. 16:

Durch eine unspezifische Inhibition der PDE mit 10 μ M EHNA konnte WD bei mit LPS vorbehandelten Tieren, deren Lungenperfusat 10 ng/ml oder 20 ng/ml PLY erhielt, nicht signifikant gesenkt werden (Student's T-Test: $p > 0,05$, Vergleich zwischen LPS + 10 ng/ml PLY und LPS + 10 ng/ml PLY + 10 μ M EHNA und Vergleich zwischen LPS + 20 ng/ml PLY und LPS + 20 ng/ml PLY + 10 μ M EHNA).

ERGEBNISSE

TNF-alpha

4.5 TNF-alpha

TNF-alpha im Perfusat von Lungen aus mit LPS vorbehandelten Tieren:

Abb. 17: Darstellung der Mittelwerte als Symbole und der Standardabweichungen als vertikale Linien.

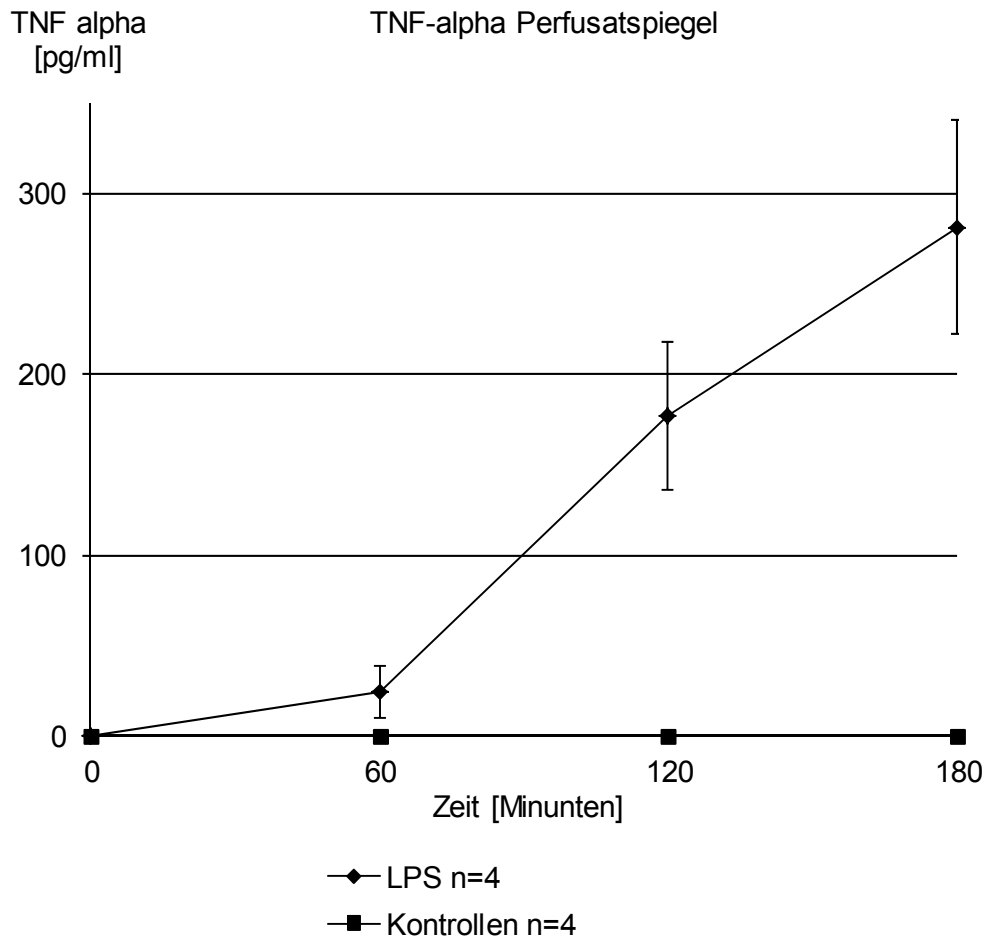


Abb. 17:

Im Gegensatz zu den Kontrollen war TNF-alpha im Perfusat von Lungen, die aus mit LPS vorbehandelten Tieren stammten, nachweisbar und stieg an.

5. Diskussion

Durch die Experimente wurden die Gewichtszunahme (Δg), die Nass-Trocken-Relation (WD), der mittlere Pulmonalarterielle Druck (mPAP) und der Kapilläre Filtrationskoeffizient (KFC) der *ex vivo* Rattenlunge unter dem Einfluss eines *in vivo* Endo- und eines *ex vivo* Exotoxins untersucht.

Durch *in vivo* **Priming mit LPS** konnte in dem *ex vivo* Modell der isoliert perfundierten und ventilerten Rattenlunge die Empfänglichkeit der *ex vivo* Rattenlunge auf PLY gesteigert werden. Dieser Effekt konnte anhand von **mPAP** und **Δg** eindeutig ($p < 0,05$) gezeigt werden (Abb. 5 und 8).

Pneumolysin (PLY) konnte als neues Exotoxin charakterisiert werden, das den mPAP und Δg in der *ex vivo* Rattenlunge signifikant ansteigen lässt (Abb. 5 und 8). Dies könnte zum einen durch die Eigenschaft eines Pore-forming-toxins bedingt sein, das Zellmembranschäden verursacht und dadurch die endotheliale Permeabilität erhöht. Zum anderen könnte PLY aber auch den intrazellulären Stoffwechsel der zyklischen Nukleotide verändern. Es gab Hinweise dafür, dass die spezifische PDE-2-Inhibition den mPAP und Δg bei mit LPS geprimten Tieren und später verabreichten PLY senken kann (Abb. 6 und 9). Diese Beobachtung ist mit Ergebnissen einer experimentellen Arbeit vereinbar, bei der eine PDE-2-Inhibition mikrovaskuläre Schäden einer Pneumokokken-Pneumonie gering halten kann [39].

Es konnte nachgewiesen werden, dass nach *in vivo* Priming mit LPS TNF-alpha im Perfusat der *ex vivo* Rattenlunge vermehrt auftrat (Abb. 17). Es war bekannt, dass durch TNF-alpha die PDE-2 in der Lunge vermehrt exprimiert wird, während sich die Aktivitäten anderer Phosphodiesterasen (PDE-3 und PDE-4) nicht entscheidend ändern [30].

Die vermehrte Expression der PDE-2 bewirkt eine Erhöhung der endothelialen Permeabilität [30]. Die Erhöhung der endothelialen Permeabilität ist ein entscheidender pathophysiologischer Faktor, der zur Entwicklung des ARDS beiträgt und eine hohe klinische Relevanz besitzt [19].

Dadurch wird es plausibel, statt einen unspezifischen PDE-Inhibitor, wie zum Beispiel Pentoxifyllin [29] oder Theophyllin [29] einen *spezifischen* PDE-2-Inhibitor, wie zum Beispiel EHNA in einer Dosierung von 1 μM [22, 23] einzusetzen.

DISKUSSION

Es konnte gezeigt werden, dass **die therapeutische Wirkung** einer *spezifischen* PDE-2-Inhibition durch eine **signifikante Senkung von Δg** bei Lungen aus mit LPS geprimten Tieren, die ex vivo 10 ng/ml PLY erhielten, erreicht werden konnte (Abb. 9). Durch die *spezifische* PDE-2-Inhibition gab es außerdem **einen Trend zur Senkung des mPAP** bei Lungen aus mit LPS geprimten Tieren, die ex vivo 10 oder 20 ng/ml PLY erhielten (Abb. 6).

Der Priming-Effekt, die Effekte der spezifischen PDE-2-Inhibition und der unspezifischen PDE-Inhibition konnten anhand des KFC nicht gezeigt werden. Der KFC hängt vom Gewichtsanstieg Δg und dem pulmonal arteriellen Druckanstieg mPAP ab [4].

Werden mPAP und Δg in die gleiche Richtung verändert (z.B. möglicherweise durch den spezifischen PDE-2-Inhibitor gesenkt), so wird der KFC nur wenig beeinflusst, da sich Δg (im Zähler) und ΔPAP (im Nenner) gegenseitig aufheben können [4]. Dadurch wird es plausibel, dass Priming-Effekt, spezifische PDE-2-Inhibition und unspezifische PDE-Inhibition nicht durch den KFC abgebildet werden konnten (Abb. 11, 12, 13).

Bei der Nass-Trocken-Relation (WD) gab es Hinweise für einen Priming-Effekt (Abb. 14). Die WD konnte weder durch eine unspezifische PDE-Inhibition noch durch eine spezifische PDE-2-Inhibition signifikant gesenkt werden (Abb. 15, 16), wobei es für die *spezifische* PDE-2-Inhibition mit 10 ng/ml PLY einen Trend zur Senkung gab (Abb. 15). Möglicherweise wäre eine signifikante Änderung durch die PDE-2-Inhibition erst bei Betrachtung des Gewichts *sämtlicher* Lungenlappen deutlich geworden.

In einer vorhergehenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Zunahme von intrazellulärem **cAMP** die **endotheliale Permeabilität reduzieren** und eine sepsis-bedingte Steigerung der Permeabilität gering halten kann [10]. Wird angenommen, dass Δg ein Maß für diese endotheliale Permeabilität ist, so lässt sich der therapeutische Erfolg der spezifischen PDE-2-Inhibition, nämlich die Senkung von Δg (Abb. 9), durch eine Erhöhung der endothelialen, intrazellulären Konzentration von cAMP erklären.

Außerdem konnte in einer vorhergehenden Arbeit gezeigt werden, dass erhöhte Konzentrationen von intrazellulärem **cGMP** zur **Relaxation der glatten Gefäßmuskelzelle** führen, wodurch eine Drucksenkung im Gefäß bewirkt wird [28].

DISKUSSION

Der mögliche Effekt auf den **mPAP** (Abb. 6) könnte daher durch eine intrazelluläre Erhöhung von **cGMP** durch die spezifische PDE-2-Inhibition verursacht sein.

Dass der mPAP bei geprimten Lungen und 20 ng/ml PLY mit einer *unspezifischen* PDE-Inhibition signifikant gesenkt werden konnte (Abb. 7), jedoch nicht signifikant bei der spezifischen PDE-2-Inhibition (Abb. 6), könnte daran liegen, dass bei einer fulminanten Schädigung durch 20 ng/ml PLY vermehrt andere Phosphodiesterasen als die PDE-2 aktiviert werden.

Ergo könnte PLY neben seiner bekannten Eigenschaft als Pore-forming-toxin [11] auch eine dosisabhängige, aktivierende Funktion auf unterschiedliche Phosphodiesterasen haben.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Die Sterblichkeitsrate von Patienten, die an einer Sepsis oder einem septischen Schock erkranken liegt trotz erheblicher Fortschritte in der anti-infektiösen und intensivmedizinischen Therapie der letzten Jahrzehnte immer noch zwischen 30 und 70%. Auslöser sind häufig bakterielle Mischinfektionen, insbesondere im Rahmen von nosokomialen Infekten. Eine der führenden pathophysiologischen Ereignisse im Verlauf des Infekt-assoziierten Multiorganversagens ist die durch den Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha) induzierte frühe Schrankenstörung, insbesondere die gesteigerte Permeabilität der alveoloepithelialen-vaskuloendothelialen Schranke der Lunge. In Vorarbeiten unserer und anderer Arbeitsgruppen konnte bereits gezeigt werden, dass dieser Effekt durch TNF-alpha über die Induktion der Phosphodiesterase-2 in Endothelzellen der pulmonalen Zirkulation ausgelöst wird. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb der therapeutische (Barriere-stabilisierende) Einfluss eines Phosphodiesterase-2 Hemmstoffes auf die vaskuläre und Gasaustauschfunktion der Lunge, in einem Ratten-Sepsis Modell untersucht. Hierzu wurde zunächst *in vivo* eine Präkonditionierung (Priming) durch einmalige Gabe von 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS) induziert. Im Anschluss erfolgte in einer standardisierten Präparation die Explantation der Lunge, welche anschließend isoliert ventiliert und perfundiert wurde. Die Effekte einer Bolusgabe von steigenden Dosierungen des Exotoxins Pneumolysin (PLY) von *Streptococcus pneumoniae* in Lungen, die durch LPS präkonditioniert waren wurden mit Lungen ohne Vorbehandlung verglichen. Weiterhin wurde der Therapeutische Einfluss von EHNA, eines PDE-2 Hemmstoffes auf die durch PLY induzierte Lungenschädigung untersucht. Die wesentlichen Ergebnisse der aktuellen Arbeit waren: 1. Eine *in vivo* Präkonditionierung mittels LPS führte zu einer verstärkten Lungenschädigung durch eine einmalige Bolusgabe von PLY *in vitro* (Priming), 2. Eine spezifische PDE-2 Hemmung mit 1 μM EHNA führte zu einer signifikanten Reduktion der Barrierschädigung und somit zur Funktionsverbesserung der Lungen und 3. eine unspezifische PDE Hemmung mit 10 μM führte eher zu einem Verlust der protektiven Wirkung. Zusammenfassend konnte somit in der vorliegenden Arbeit erstmals der schädigende Effekt des Exotoxins Pneumolysin auf die Funktion der Lunge aufgezeigt, welcher durch Vorbehandlung mit dem Endotoxin gram-negativer Bakterien sogar potenziert war. Die hier aufgezeigte experimentell therapeutische Wirksamkeit einer PDE-2 Hemmung mittels EHNA könnte den Weg für zukünftige klinische Studien in diesem für die Intensivmedizin wichtigen Feld bahnen.

7. Summary

Mortality rates in patients suffering from septicemia and septic shock remain high (30-70%) despite therapeutic advances in the past decades. Confounding factors are often mixed bacterial infections, particularly in relation to nosocomial infections. One of the leading pathophysiological events leading to multiple organ-failure, is the disturbance of the alveolo-epithelial and vasculo-endothelial barrier of the lung. This is mainly induced by transient induction of the tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha). In previous studies of this and other working groups it was shown that the impairment of barrier properties by TNF-alpha is mediated by an up-regulation of the phosphodiesterase-2 (PDE-2) in vascular endothelial cells. Thus we aimed to investigate on potential therapeutic effects of PDE-2 inhibition on vascular and gas exchange properties of the lung, in a rat lung injury model. For this we preconditioned (primed) rats *in vivo* with an injection of 2.5 mg/kg of lipopolysaccharide (LPS) and subsequently isolated their lungs and investigated them further in an isolated ventilated and perfused lung preparation. The effects of bolus injections of incremental dosages of the exotoxin pneumolysin (PLY), which is produced by streptococcus pneumonia, on native as well as LPS-primed lungs was investigated. Furthermore the therapeutic effect of EHNA, a selective PDE-2 inhibitor, on PLY induced lung injury was analyzed. The main results of the current work were that first, an *in vivo* priming with LPS resulted in an augmentation of the lung injury induced by PLY injections, second, a selective PDE2 inhibition with 1 μm EHNA significantly reduced the damage to the lung vascular barrier and resulted in subsequent improvement in lung function, and third, an unselective PDE2 inhibition with high dose of EHNA (10 μm) lost its protective properties. In summary, we could show that the exotoxin pneumolysin induces lung injury in an isolated organ model, which was augmented if the lungs were pretreated with endotoxin of gram-negative bacteria (so called priming effect). The therapeutic effects of a selective PDE2 inhibition as demonstrated with low doses of EHNA could justify the future investigation of this treatment approach for the prevention and/or treatment of lung injury in patients with bacterial infections and acute lung injury in the intensive care setting.

8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung/en
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
$\Delta\text{PAP}_{\text{Kaskade}}$	Änderung des pulmonal arteriellen Drucks innerhalb einer Kaskade
Δg	Gewichtszunahme der Lunge
$\Delta\text{g}_{\text{Kaskade}}$	Gewichtszunahme der Lunge innerhalb einer Kaskade
$\Delta\text{t}_{\text{Kaskade}}$	Zeitdifferenz innerhalb einer Kaskade
E. coli	Escherichia coli
EHNA	Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
g	Lungengewicht
IC50	Konzentration, bei der die halbmaximale Hemmung erreicht wird
I.E.	Internationale Einheiten
LPS	Lipopolysaccharid/e
(m)LVP	(mittlerer) linksventrikulärer Druck
(m)PAP	(mittlerer) Pulmonalarterieller Druck
(m)VP	(mittlerer) Beatmungsdruck
PDE	Phosphodiesterase
PEEP	Pulmonaler end-expiratorischer Druck
PFT	Pore-forming-toxin
PLY	Pneumolysin
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
TNF-alpha	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
WD	Wet-to-dry-ratio, Nass-Trocken-Relation

9. Literaturverzeichnis

1. **Craven DE et al.**
Epidemiology of Nosocomial Pneumonia. New Perspectives on an Old Disease.
Chest Vol. 108 No 2 Aug 1995 Suppl.
2. **Crimi E et al.**
Inflammation and the acute respiratory distress syndrome.
Best Pract Res Clin Anaesthesiol. 2004 Sep; 18(3):477-92.
3. **Doerfler ME et al.**
Bacterial Lipopolysaccharides Prime Human Neutrophils for
Enhanced Production of Leukotriene B₄.
The Journal of Clin. Invest., Vol. 83, March 1989, 970-977.
4. **Drake R et al.**
Estimation of the filtration coefficient of pulmonary exchange vessels.
Am J Physiol. 1978 Mar;234(3):H266-74.
5. **Dremsizov TT et al.**
Incidence and definition of sepsis and associated organ dysfunction.
Int J Artif Organs. 2004 May; 27(5):352-9.
6. **Feist W et al.**
Induction of tumor necrosis factor-alpha release by
lipopolysaccharide and defined lipopolysaccharide structures.
Immunobiology. 1989 Oct; 179(4-5):293-307.
7. **Gaynes R et al.**
Overview of Nosocomial Infections Caused by Gram-Negative Bacilli.
Clinical Infectious Diseases 2005; 41: 848 – 54.
8. **Giroir BP et al.**
The tissue distribution of tumor necrosis factor biosynthesis during
endotoxaemia.
J Clin Invest. 1992 Sep; 90(3):693-8.

9. **Goldblum SE et al.**

Tumor Necrosis Factor alpha-Induced Pulmonary Vascular Endothelial Injury.
Infect Immun. 1989 Apr; 57(4):1218-26.

10. **Hippenstiel S. et al.**

Adrenomedullin reduces endothelial hyperpermeability.
Circ Res. 2002 Oct 4; 91(7):618-25.

11. **Hirst RA et al.**

The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis.
Clin Exp Immunol 2004; 138; 195-201.

12. **Horgan MJ et al.**

TNF-alpha release in endotoxaemia contributes to neutrophil-dependent pulmonary edema.
Am J Physiol. 1993 Apr; 264(4 Pt 2):H1161-5.

13. **Houldsworth S et al.**

Pneumolysin Stimulates Production of Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin-1-beta by Human Mononuclear Phagocytes.
Infection and Immunity, Apr 1994, p. 1501-1503.

14. **Johnson J et al.**

Human recombinant tumor necrosis factor alpha infusion mimics endotoxaemia in awake sheep.
J Appl Physiol. 1989 Mar; 66(3):1448-54.

15. **Koga S et al.**

TNF modulates endothelial properties by decreasing cAMP.
Am J Physiol. 1995 May; 268(5 Pt 1):C1104-13.

16. **Maniatis NA et al.**

Endothelial pathomechanisms in acute lung injury.
Vascul Pharmacol. 2008 Oct-Dec; 49(4-6):119-33. Epub 2008 Jul 29.

17. Mannes GP et al.

Adult respiratory distress syndrome (ARDS) due to bacteraemic pneumococcal pneumonia.

Eur Respir J. 1991 Apr;4(4):503-4.

18. Marks JD et al.

Plasma tumor necrosis factor in patients with septic shock. Mortality rate, incidence of adult respiratory distress syndrome, and effects of methylprednisolone administration.

Am Rev Respir Dis. 1990 Jan; 141(1):94-7.

19. Matthay M et al.

The Acute Respiratory Distress Syndrome: Pathogenesis and Treatment. Annu Rev Pathol. 2011 February 28; 6: 147 – 163.

20. Novak R et al.

Pathogenesis of pneumococcal pneumonia.

Semin Respir Infect. 1999 Sep; 14(3):209-17.

21. Peleg et al.

Hospital-Acquired Infections Due to Gram-negative Bacteria.

N Engl J Med. 2010 May 13; 362(19): 1804 – 13.

22. Podzuweit et al.

Isozyme selective inhibition of cGMP-stimulated cyclic nucleotide Phosphodiesterases by Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine. Cellular Signalling Vol. 7, No. 7: 733 – 38, 1995.

23. Rosman GJ et al.

Isolation and characterization of human cDNAs encoding a cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase.

Gene. 1997 May 20; 191(1):89-95.

24. Rubenfeld GD et al.

Incidence and outcomes of acute lung injury.

N Engl J Med 2005 Oct 20; 353(16): 1685 - 93.

25. **Rubins JB et al.**

Toxicity of pneumolysin to pulmonary alveolar epithelial cells.
Infect Immun. 1993 Apr; 61(4):1352-8.

26. **Rubins JB et al.**

Toxicity of pneumolysin to pulmonary endothelial cells in vitro.
Infect Immun. 1992 May; 60(5):1740-6.

27. **Russell JA et al.**

Molecular Mechanisms of Sepsis.
Contrib Microbiol. 2011; 17:48-85.

28. **Rybalkin SD et al.**

Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function.
Circ Res. 2003 Aug 22; 93(4):280-91.

29. **Schudt C. et al.**

PDE Isoenzymes as targets for anti-asthma drugs.
Eur Respir J, 1995, 8, 1179 – 1183.

30. **Seybold J et al.**

Tumor necrosis factor-alpha-dependent expression of phosphodiesterase 2:
role in endothelial hyperpermeability.
Blood. 2005 May 1; 105(9):3569-76. Epub 2005 Jan 13.

31. **Stone R.**

Search for sepsis drugs goes on despite past failures.
Science. 1994 Apr 15; 264(5157):365-7.

32. **Suttorp N et al.**

Role of phosphodiesterases in the regulation of endothelial permeability in vitro.
J Clin Invest. 1993 Apr; 91(4):1421-8.

33. **Van Amersfoort ES et al.**

Receptors, Mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic
shock.
Clin. Microbiol. Rev. 2003 Jul; 16(3):379-414.

34. Venet C et al.

Endotoxaemia in patients with severe sepsis or septic shock. Intensive Care Med (2000) 26:538-544.

35. Walmrath D, Ghofrani HA et al.

Endotoxin "Priming" Potentiates Lung Vascular Abnormalities in Response to Escherichia coli Hemolysin: An Example of Synergism between Endo- and Exotoxin. J Exp Med Vol. 180 No 4 1994.pp 1436-43.

36. Walmrath D, Ghofrani HA et al.

Synergism of Alveolar Endotoxin "Priming" and Intravascular Exotoxin Challenge in Lung Injury.

Am J Respir Crit Care Med Vol 154. pp 460-468, 1996.

37. Weiss et al.

Clinical characteristics at initial presentation and impact of dual therapy on the outcome of bacteremic Streptococcus pneumoniae pneumonia adults. Can Respir J Vol 11 No 8 November/December 2004: 589 – 93.

38. Welty-Wolf KE et al.

Bacterial Priming Increases Lung injury in Gram-negative Sepsis. Am J Respir Crit Care Med Vol 158. pp 610-619, 1998.

39. Witzentrath et al.

Phosphodiesterase 2 inhibition diminished acute lung injury in murine pneumococcal pneumonia. Crit Care Med 2009 Vol. 37, No. 2, 584 – 590.

40. Witzentrath et al.

Role of pneumolysin for the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia. Crit Care Med 2006 Vol. 34, No. 7, 1947 – 1954.

41. H. A. Ghofrani:

Synergismus zwischen Endotoxin-Priming und Exotoxin - Wirkung an der perfundierten Kaninchenlunge; Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen 1995

10. Ehrenwörtliche Erklärung

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

Gießen, 08.02.2013

Daniel Birtzfeld

11. Danksagung

Hiermit bedanke ich mich bei

- Herrn Prof. Dr. Werner Seeger
- Herrn Prof. Dr. Hossein Ardeschir Ghofrani
- Herrn Dr. Markus Gustaf Kohstall
- Herrn Prof. Dr. Ralph Schermuly
- Herrn Dr. Ayub Darji
- meinen Freunden und meiner Familie, insbesondere bei meiner Frau Inge,

die mir die vorliegende Arbeit ermöglicht und mich dabei unterstützt haben.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**



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: 978-3-8359-6252-1



9 783835 196252 1

