

**WIRKUNG  
DES SYNTHETISCHEN PROTEASE-INHIBITORS CE-1037  
BEI DER DURCH  
GRANULOZYTENSTIMULATION AUSGELÖSTEN  
PULMONALEN PERMEABILITÄTSSTÖRUNG  
AM MODELL DER ISOLIERT VENTILIERTEN UND BLUTFREI  
PERFUNDIERTEN KANINCHENLUNGE**

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

vorgelegt von  
**José Ramón Fernández Alvarez**  
aus Frankfurt am Main

Giessen 2002

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin

Medizinische Klinik I

Leiter: Prof. Dr. med. H. Tillmanns

Klinische Pathophysiologie und Experimentelle Medizin

Leiter: Prof. Dr. med. H. Neuhof

des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Giessen

Betreuerin: Dr. med. I. Breil

Gutachter: Prof. Dr. med. H. Neuhof

Gutachter: Prof. Dr. med. L. Gortner

Tag der Disputation: 25.06.2003

Meinen Eltern und Großeltern gewidmet.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG</b>	<b>1 - 11</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODIK</b>	<b>12 - 31</b>
2.1	<u>Versuchstiere</u>	12
2.2	<u>Präparation und Organentnahme</u>	12 - 13
2.3	<u>Modell der isoliert ventilierten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge</u>	14 - 20
2.3.1	Perfusionssystem	14 - 16
2.3.2	Perfusionsmedium	17 - 18
2.3.3	Beatmungs- und Perfusionsmodus	19
2.3.4	Monitoring von Lungengewicht, Perfusionsdrücken, pH und Gaspartialdrücken	20
2.4	<u>Granulozyten und Immunglobuline</u>	21 - 25
2.4.1	Isolierung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten	21 - 22
2.4.1.1	Isolierungsmedien und Nährmedium	23
2.4.1.2	Granulozytenzählung	24
2.4.2	Herstellung von hitzeaggregierten Immunglobulinen	25
2.5	<u>Versuche</u>	26 - 30
2.5.1	Verwendete Substanzen	26
2.5.2	Versuchsgruppen	26
2.5.3	Versuchsablauf	27
2.5.4	Bestimmung des kapillären Filtrationskoeffizienten	28
2.5.5	Bestimmung der Elastasekonzentration	29

2.5.5.1	Reagenzien des Enzymimmunoassays	30
2.6	<u>Statistik</u>	31
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>32 - 53</b>
3.1	<u>Einleitung</u>	32
3.2	<u>Versuche</u>	33 - 53
3.2.1	Änderung des Lungengewichtes	33 - 40
3.2.2	Änderung des kapillären Filtrationskoeffizienten	41 - 51
3.2.3	Änderung der Elastasekonzentration	52 - 53
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>54 - 74</b>
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>75 - 76</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>77 - 106</b>
<b>7.</b>	<b>ABÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>107 - 108</b>
<b>8.</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>109</b>
<b>9.</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>110</b>

## 1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Das akute Lungenversagen (ARDS - Acute Respiratory Distress Syndrome) stellt eines der heute vorherrschenden Probleme der Intensivmedizin dar. Jeder dritte bis vierte auf hunderttausend pro Jahr erleidet diese Erkrankung, deren Letalität mit durchschnittlich 60 % sehr hoch ist und deren Prognose mit zunehmender Dauer der Ateminsuffizienz schlechter wird (171).

1967 wurde das ARDS erstmals durch Ashbaugh et al. aufgrund der Ähnlichkeit der Symptomatik mit dem Atemnotsyndrom des Neu- und Frühgeborenen (IRDS - Infant Respiratory Distress Syndrome) in der medizinischen Literatur als eigenständiges Krankheitsbild beschrieben. Gemäß der letzten Amerikanisch-Europäischen Konsensus-Konferenz zum Thema ARDS (1992) handelt es sich hierbei um eine beidseitige akute Funktionsstörung der Gasaustauschstrecke der Lunge ( $p_aO_2/F_iO_2 < 200$  mmHg, PEEP nicht berücksichtigt), die in Abwesenheit einer kardiogenen Verursachung nach unterschiedlichen Auslösern bei vorher lungengesunden Patienten ohne spezielle Prädisposition auftreten kann (185).

Auslösende Ursachen dieser unspezifischen Reaktion können unter anderen sein: Sepsis, Polytrauma, Verbrennung und Schock als primär extrapulmonale Faktoren sowie toxische Gase (z. B.  $NO_2$  und Rauchgas), hyperbarer Sauerstoff und Aspiration (z. B. Mageninhalt) als primär pulmonale Faktoren (74).

Unabhängig von seiner Genese lässt sich der Verlauf bis zum ARDS klinisch in vier typische kontinuierlich ineinander übergehende Phasen einteilen:

Nach einer akuten Lungenschädigung, deren Zeitpunkt häufig nicht sicher angegeben werden kann, folgt eine Latenzphase, die bis zu etwa drei Tagen anhalten kann. Bis dahin lassen sich eine z. T. progrediente Tachypnoe / Dyspnoe mit Normoxämie oder milder Hypoxämie und evtl. Hypokapnie beobachten. Das Röntgenbild ist normal oder zeigt eine bilaterale retikuläre Zeichnungsvermehrung (153, 162, 185).

Es folgt die Phase der manifesten respiratorischen Insuffizienz. Zunehmende Tachypnoe / Dyspnoe, Tachykardie, Zyanose und manchmal Bewusstseinsstörung beherrschen das Bild. Auskultatorisch werden jetzt feuchte Rasselgeräusche gehört. Eine progrediente O<sub>2</sub>-refraktäre Hypoxämie, Normo- / Hyperkapnie zusammen mit beidseitigen diffusen milchglasartigen Infiltraten komplettieren das Bild. Diese Phase hält etwa eine Woche an und führt schließlich in die chronische / terminale Phase über (153, 162, 185).

Die Mehrzahl der Patienten ist nun beatmet. O<sub>2</sub>-refraktäre Hypoxämie und Hyperkapnie haben zugenommen. Komplikationen wie Pneumothorax und Pneumonie, die das radiologische Bild der Lunge überlagern, als auch Sepsis und Multiorganversagen können folgen und zum Tode führen. Aber auch ein chronischer Verlauf über mehrere Monate mit Erholung der Lungenfunktion ist möglich (153, 162, 185).

Pathophysiologisch kommt es unabhängig vom auslösenden Agens zu einem progredienten Permeabilitäts-Lungenödem:

Unter normalen Bedingungen ist der hydrostatische Druck in den alveolären Kapillaren höher als im Interstitium der Alveolarsepten. Es kommt zu einer Flüssigkeitsverschiebung in den interstitiellen Raum. Die alveolären Kapillarendothelien sind relativ impermeabel für Proteine, so

dass eine geringere Eiweißkonzentration in der Flüssigkeit des Interstitiums resultiert. Die so entstehende kolloid-osmotische Druckdifferenz zwischen Alveolarkapillaren und alveolärem Interstitium bewirkt einen Rückstrom von Flüssigkeit in die Kapillaren. Da normalerweise die hydrostatisch wirksamen Kräfte größer sind als die osmotischen Kräfte, entsteht somit ein Netto-Strom von Flüssigkeit ins Interstitium. Diese wird von den lymphatischen Gefäßen aufgenommen und in die Blutzirkulation zurückgeführt (162, 185).

Beim Permeabilitäts-Lungenödem besteht nun eine vermehrte Durchlässigkeit für Flüssigkeit und Proteine im Bereich der alveolären Kapillarendothelien bei z. T. niedrigerem hydrostatischem Druck. Es kommt zu einem verstärkten Strom an Flüssigkeit mit einem Proteingehalt ähnlich dem des Plasmas ins Interstitium der Alveolarsepten. Wenn die Clearance-Kapazität der Lymphgefäße überschritten ist, kommt es zur progredienten Flüssigkeitsansammlung in diesem Bereich. Ist dieses zusätzliche „Reservoir“ gefüllt, tritt Flüssigkeit auch in die Alveolen, deren Epithelien ebenfalls durchlässiger werden (die Alveolarepithelien sind unter normalen Bedingungen weniger permeabel als die Kapillarendothelien) (162, 185).

Die beschriebene Verbreiterung der Alveolarsepten führt zu einer verringerten Compliance und funktionalen Residualkapazität der Lunge. Die Atemarbeit und das Totraumvolumen nehmen zu. Durch die entstehende Hypoxämie kommt es zur pulmonalen Vasokonstriktion, die eine Erhöhung des pulmonalen Gefäßwiderstandes bewirkt. Hierdurch wird die rechtsventrikuläre Herzfunktion beeinträchtigt. Mit zunehmender Dilatation des rechten Ventrikels kann es zur Verschiebung des Ventrikelseptums nach links kommen, aus der ein reduziertes linksventrikuläres enddiastolisches Volumen resultiert (ventrikuläre Interdependenz). Dadurch wird auch die linksventrikuläre Herzfunktion beeinträchtigt. Aber auch eine pulmonale Vasodilatation tritt auf, so dass

eine Verschlechterung der Ventilations-Perfusions-Verteilung mit verstärkter Shuntbildung eintritt. Diese verstärkt wiederum die Hypoxämie und erhöht die linkskardiale Volumenbelastung. Aufgrund dieses Vorganges und der ventrikulären Interdependenz kann der linksatriale Druck ansteigen und zu einer Erhöhung des hydrostatischen Druckniveaus in der mikrovaskulären Lungenstrombahn führen. Dies hat zur Konsequenz, dass die Flüssigkeitseinlagerung in der Lunge weiter zunimmt (162, 185).

Je nachdem, ob es sich um eine inhalativ (pulmonal) oder hämatogen (extrapulmonal) wirksame Noxe handelt, steht die Schädigung der Alveolarepithelien oder der alveolären Kapillaren am Anfang eines biphasischen Prozesses (Riede et al., 1989). Die hierbei ablaufenden pathologisch-anatomischen Veränderungen lassen sich in eine kontinuierlich ineinander übergehende exsudative Früh- und proliferativ-fibrosierende Spätphase einteilen:

In der exsudativen Initialphase der Erkrankung zeigt sich aufgrund primär reversibler funktioneller Veränderungen in der Mikrozirkulation und den Mikrogefäßen der Lunge eine starke kapilläre Blutstauung und ein alveolär-interstitielles Ödem, welches sich im Verlauf auf das peribronchovaskuläre Interstitium erstreckt. Neben dem veränderten Gefäßtonus beobachtet man hier eine Lockerung der "inter-endothelialen junctions" durch eine veränderte Form der kapillären Endothelzellen und alveolären Epithelzellen. In dieser Phase nimmt der Volumenanteil der Alveozyten Typ I am Einheitsvolumen des Lungenparenchyms ab und die Alveozyten Typ II erhalten einen Volumenzuwachs. Während sich die geschädigten Alveozyten Typ I bereits teilweise von ihrer Unterlage ablösen, sind die Alveozyten Typ II erst geschwollen. Im Verlauf kommt es nach und nach zur Nekrose der Lungenkapillarendothelien und der Alveolarepithelien, in deren Rahmen die Zellkontakte der genannten

Zellen irreversibel zerstört werden. Die Ausbreitung des Ödems verstärkt sich. Eine starke Granulozytensequestration neben anderen Blutzellen ist erkennbar. Es bilden sich Mikrothromben in den Lungenkapillaren bestehend aus polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN), Thrombozyten und Fibrinbelägen, die auch im Interstitium und den zerstörten Alveolarräumen zusammen mit Zelldetritus u. a. gefunden werden und zur Bildung von hyalinen Membranen in den Alveolen beitragen. Nach ca. drei Tagen lässt sich eine Proliferation der Alveozyten Typ II feststellen, die als intermitotische Zellen sich in ca. 48 Stunden in Alveozyten Typ I (postmitotische Zellen) verwandeln können. Diese Reservezellhyperplasie führt zu einer Verbreiterung der Alveolenwand und damit der Diffusionstrecke. Außerdem sind die regenerierten Alveozyten Typ II in ihrem Aufbau primitiver. Sie produzieren kaum Surfactant. Die Lungenentfaltung ist verschlechtert. Die Alveolarsepten sind an Gefäßen verarmt. In den Alveolen sowie dem alveolären und peribronchovaskulären Interstitium weicht das Exsudat zunehmend einem Zellinfiltrat, welches neben einzelnen Rundzellen (Lymphozyten und Plasmazellen) aus Fibroblasten besteht. Es tritt eine Fibroblastenproliferation ein, welche nach ca. einer Woche zur Fibrosierung der Alveolen, Alveolarsepten und des peribronchovaskulären Bindegewebes überleitet (proliferativ-fibrosierende Spätphase) (1, 4, 21, 81, 131, 135, 143, 157, 162).

Pathogenetisch verantwortlich für die genannten Vorgänge ist die Aktivierung humoraler Mediatorsysteme und „inflammatorisch-kompetenter“ Zellen (PMN, Makrophagen, Thrombozyten und Lymphozyten) über endogene (z. B. Bakterienprodukte und Gewebsnekrosen) und exogene (z. B. chemische Agenzien und in situ liberierte mikrobielle Agenzien bei lokaler Besiedlung der Lunge mit Keimen) Stimuli. Die zeitliche Abfolge, die Hierarchie und die quantitative

Bedeutung der einzelnen inflammatorischen Abläufe sind noch weitgehend unklar (185).

Bei Auslösung des ARDS über ein systemisches Geschehen (z. B. Sepsis und Polytrauma) werden die drei klassischen humoralen Kaskadensysteme (Komplement-, Kinin-Kallikrein- und Koagulations-Fibrinolyse-System) stark aktiviert (Belew et al., 1978; Yamamoto et Cochrane, 1981; Neuhof et Lasch, 1984). Diese sind funktionell so miteinander verknüpft, dass die Aktivierung eines einzelnen zu einer je nach auslösender Ursache unterschiedlich starken Aktivierung der anderen führt (136). Neben ihren systemspezifischen Funktionen sind sie imstande, bestimmte Zellen (z. B. Granulozyten, Makrophagen, Thrombozyten und Mastzellen) zu stimulieren (31, 98, 182, 198, 213, 214) und die Bildung von Arachidonsäure-Metaboliten in Lungengewebe und Kapillarendothelien zu bewirken (80, 140, 141, 177, 184), so dass es zur Ausschüttung bzw. Produktion von stark gefäßwirksamen Mediatoren kommt (Neuhof et al., 1987). Einige der Komponenten aus den drei klassischen humoralen Kaskadensystemen sind sogar imstande den Gefäßtonus und die vaskuläre Permeabilität direkt zu beeinflussen (8, 222, 225).

Die aktivierten Faktoren des Komplement-Systems C3a und C5a sind beispielsweise in großem Ausmaß an den initialen hämodynamischen Reaktionen beteiligt (10, 195). Beide induzieren eine Histaminausschüttung aus Mastzellen und basophilen Granulozyten. Außerdem wirken sie stark aktivierend und chemotaktisch auf Granulozyten und mononukleäre Zellen (30, 31, 81). Neben diesen gibt es weitere Stimuli aus den klassischen Kaskadensystemen, wie Plasma Kallikrein (Wachtvogel et al., 1983) Hagemann Faktor XIIa (Wachtvogel et al., 1986) und das Fibrinogenspaltprodukt D (Manwaring et Curreri, 1982), die die Granulozyten und den Arachidonsäure-Metabolismus aktivieren. Aber auch porenbildende Bakterientoxine (Suttorp et al., 1986)

und Zytokine (Goldblum et al., 1987; Shalaby et al., 1987) haben diese Wirkung. Die Exsudation von Fibrin-Monomeren in die Alveolen führt zu einer starken Dysregulation der Surfactant-Funktion und in der Folge zu Mikroatelektasen (181). Die von den drei klassischen humoralen Systemen freigesetzten Mediatoren werden bei den verschiedenen Erkrankungen, die zum ARDS führen, häufig in unphysiologisch hohen Konzentrationen gefunden (64, 137, 166).

Im Gegensatz zu den beim ARDS initial meist reversiblen Störungen der vaskulären Permeabilität kommt es nun aufgrund einer zunehmenden irreversiblen Schädigung der kapillären und alveolären Schrankenfunktion durch die Aktivität der Granulozyten und Makrophagen zu einer nahezu druckunabhängigen Filtration in die Lunge (19, 136, 205):

Dies geschieht, indem sich stimulierte polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) an das Endothel der Mikrogefäße der Lunge heften (169), wo sie je nach Stimulus Proteasen (z. B. Elastase und Kathepsine) ausschütten können, die neben anderen Substanzen Fibronectin spalten und die Basalmembran zerstören (48). Weiterhin synthetisieren die PMN Leukotriene und andere Lipxygenaseprodukte mit permeabilitätssteigerndem Effekt (136). Reaktive O<sub>2</sub>-Produkte (z. B. O<sub>2</sub>- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), gebildet im Rahmen des "respiratory burst" oder durch ausgeschüttete Myeloperoxidase und Lactoferrin, haben eine zusätzlich permeabilitätssteigernde und direkt zytotoxische Wirkung auf die Endothelzellen (90, 188, 204, 211). Außerdem inaktivieren die reaktiven O<sub>2</sub>-Metaboliten neben anderen Enzym-Inhibitoren den  $\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitor ( $\alpha_1$ -PI), wodurch sie die idealen Bedingungen für die zerstörerische Aktivität der freigesetzten Proteasen in der Lunge schaffen. Diese Ereignisse lassen sich auch in den Alveolen von Patienten mit akutem Lungenversagen beobachten (29). Erhöhte Plasmaspiegel der Elastase, Myeloperoxidase und des Lactoferrin dienen als Marker der

Granulozytenaktivität im Rahmen von Sepsis und Polytrauma (Jochum et al., 1986; Dittmer et al., 1986).

Neben den Granulozyten, denen eine zentrale Stellung in der Pathogenese des ARDS zugeschrieben wird (205), sind es auch die Makrophagen in den Alveolen, den Gefäßen und dem umliegenden Bindegewebe, die zu den potenten Bildungsstätten von Proteasen (z. B. Elastase), toxischen O<sub>2</sub>-Produkten und Arachidonsäure-Metaboliten gehören (134). Im Unterschied zu den PMN setzen sie ihre Mediatoren verzögert frei und resynthetisieren diese kontinuierlich, so dass ihre Freisetzung verlängert wird (136, 143). Sie produzieren außerdem Komplement-Faktoren und Zytokine, wie z. B. Interleukin I (IL-1) und Tumornekrosefaktor (TNF) (108), die aktivierend auf Fibroblasten wirken (136) und die Bindung von PMN an Endothelzellen sowie die Freisetzung weiterer Mediatoren wie z. B. Plättchen-aktivierender Faktor (PAF) fördern (9, 44, 50, 132, 154). Zusammen mit anderen Stimuli (z. B. Fibrin[ogen]spaltprodukte) sollen sie an der bindegewebigen Umwandlung der Lunge in der proliferativen Phase des ARDS beteiligt sein (136). Die gesteigerte Aktivität der Makrophagen lässt sich durch erhöhte Spiegel an Neopterin im Plasma nachweisen (198).

Klinische Beobachtungen und experimentelle Ergebnisse geben Grund zur Annahme, dass bei den genannten humoralen und zellulären Veränderungen die Proteasen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des ARDS spielen:

Zum einen sind sie Bestandteile der drei klassischen Kaskadensysteme, die durch selektive Proteolyse aktiviert und kontrolliert werden, zum anderen zerstören sie die pulmonalen Kapillar- und Alveolarwände durch unspezifische Proteolyse (143). Für die genannten strukturellen Schäden an den Mikrogefäßen der Lunge und an den Alveolen wird in erster Linie das Enzym Elastase unter den lysosomalen Proteasen der Granulozyten

und Makrophagen verantwortlich gemacht (142). Smedley et al. (1986) konnten eine durch Elastase verursachte Erhöhung der Permeabilität an kultivierten Endothelzellmonolayern der Lunge nachweisen. Die Inaktivierung vom  $\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitor durch reaktive  $O_2$ -Produkte scheint dabei die größte unterstützende Wirkung in der Zerstörung der vaskulären und alveolären Schrankenfunktion zu haben (142). Zaslow et al. (1983) wiesen nach, dass  $\alpha_1$ -PI über Oxidation durch  $H_2O_2$  und Myeloperoxidase aus stimulierten Granulozyten inaktiviert wird. Diese Vermutungen werden durch die in Bronchiallavage-Sekreten von Patienten mit ARDS gemessene Aktivität an freier PMN-Elastase in Anwesenheit von inaktiviertem  $\alpha_1$ -PI bestätigt (Cochrane et al., 1983).

Die humane Neutrophilen-Elastase (HNE) wurde 1968 erstmalig von Janoff und Scherer beschrieben. Sie ist eine Serinprotease (201), die in aktiver Form (89) in den azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten gespeichert wird (52, 63, 88) und bei verschiedenen entzündlichen Stimuli von PMN sezerniert wird (126, 127). HNE ist das mengenmäßig vorherrschende Enzym unter den lysosomalen Proteinase (88). In einer Million PMN befinden sich etwa 4 - 7  $\mu g$  der humanen Neutrophilen-Elastase (88). Dies entspricht einer intrazellulären Konzentration von 36 - 58  $\mu mol/l$  (207) und einer Serumkonzentration von etwa 60 - 120  $\mu g/l$  (88). HNE besitzt ein Molekulargewicht von 33000 (62) und weist drei Isoenzyme (218) auf, die sich auch in den Thrombozyten (110), Alveolarmakrophagen und im Pankreas nachweisen lassen (82). Ihre Aminosäuresequenz und ihre kristalline Struktur sind ebenso bekannt (218) wie ihr Wirkungsoptimum (pH: 7,5 - 9,0) (62).

Die physiologische Funktion der humanen Neutrophilen-Elastase liegt in der Abwehr von Mikroorganismen und in der Digestion von Phagozytoseprodukten (11). Die Freisetzung und extrazelluläre

proteolytische Aktivität dieses Enzyms wird unter normalen Bedingungen durch seinen natürlichen Inhibitor  $\alpha_1$ -PI stark kontrolliert. Neben einer Vielfalt von entzündlichen Erkrankungen kommt es auch beim ARDS zu einem Zusammenbruch dieses Regulationsmechanismus (13, 83, 84, 124). Als Folge kommt es zu einer ungehinderten proteolytischen Aktivität der Elastase. Dabei zeichnet sich das Enzym durch eine äußerst niedrige Substratspezifität aus, wobei es bevorzugt hinter den Aminosäureresten Valin, Methionin und Alanin spaltet (62, 88). Zu seinen Substraten zählen zahlreiche Strukturelemente aus dem Lungengewebe wie z. B. Elastin (85), welches nur von Elastase gespalten wird (62), Fibronectin (24, 63, 65, 87), Surfactant, Proteoglykan und Kollagen I - IV (63, 119) (62). Aber auch einige Protease-Inhibitoren werden von der Elastase gespalten: Antithrombin III,  $\alpha_2$ -Plasmin-Inhibitor und C1-Inaktivator. Zahlreiche Faktoren des Komplement-Systems (92), des Koagulations-Fibrinolyse-Systems (172) und des Kinin-Kallikrein-Systems (128) sowie Immunglobuline (46) können im nativen Zustand proteolytisch zerstört werden. Auf diese Weise kommt es neben der direkten Elastasewirkung auf die Lunge auch zu einer indirekten über die drei klassischen Kaskadensysteme (86, 119).

Die physiologischen Inhibitoren der humanen Neutrophilen-Elastase sind das  $\alpha_2$ -Makroglobulin (MG 725000), das  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin (MG 69000) und der  $\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitor (MG 55000) (62, 88), wobei letztgenannter die höchste Affinität zur Elastase besitzt (49, 146, 148). Mit einer Plasmakonzentration von 54  $\mu\text{mol/l}$  ( $290 \pm 45 \text{ mg/dl}$ ) ist der  $\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitor auch mengenmäßig dominierend (62, 209), so dass 90 % unter normalen Bedingungen an Elastase gebunden sind (62, 71, 146, 148). Daneben existieren auch Protease-Inhibitoren an den Schleimhäuten und in den Körperflüssigkeiten (38, 147, 168, 206).

Insgesamt wird ersichtlich, von welcher entscheidender Bedeutung ein Ungleichgewicht zwischen den Proteasen, speziell Elastase, und den Protease-Inhibitoren, vor allem  $\alpha_1$ -PI, für die Pathogenese des ARDS ist. Diese gestörte Balance spielt nicht nur beim akuten Lungen- bzw. multiplen Organversagen eine entscheidende Rolle (135), sondern beispielsweise auch bei der Polyarthrit (24, 62, 223) und dem obstruktiven Lungenemphysem (49, 62, 82, 124). Es wird deutlich, wie dringend notwendig es ist, einen Protease-Inhibitor zu entwickeln, der unter Berücksichtigung der Zusammenhänge zwischen den genannten Systemen, eine Kontrolle dieser folgenschweren entzündlichen Reaktion in der Lunge gewährt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, am Modell der isoliert ventilierten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge, die Wirkung des synthetischen Protease-Inhibitors CE-1037 auf ein durch Granulozytenstimulation ausgelöstes Lungenödem zu untersuchen.

## **2. MATERIAL UND METHODIK**

### **2.1 Versuchstiere**

Zur Organspende wurden 28 Kaninchen beiderlei Geschlechts mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 2971 g (Standardfehler 42 g) verwendet. Alle Tiere wurden von den Behringwerken, Marburg geliefert, erhielten eine Altromin<sup>®</sup>-Standarddiät als Nahrung und waren medikamentös nicht vorbehandelt.

### **2.2 Präparation und Organentnahme**

Nach Einführung einer Verweilkanüle (Butterfly 25 G, Abbott Ireland Ltd., Sligo, Rep. of Ireland ) in die Ohrvene wurde das Tier mit durchschnittlich 70,6 mg/KGw (Standardfehler 1,2 mg/KGw) einer 1:1 Verdünnung von Pentobarbital-Natrium (Nembutal<sup>®</sup>, Sanofi Ceva, Hannover, Deutschland) und isotoner Natriumchloridlösung narkotisiert. Anschließend erhielt es 1000 I.E. Heparin-Natrium (Liquemin<sup>®</sup>, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) zur Antikoagulation und wurde in Rückenlage bei ausreichender Relaxation fixiert.

Dann wurden dem Kaninchen zur Lokalanästhesie 200 mg H<sub>2</sub>O-freies Lidocainhydrochlorid (10 ml Xylocain<sup>®</sup> 2 %, Astra Chemicals GmbH, Wedel/Holstein, Deutschland) in das subcutane Fettgewebe unterhalb des Kehlkopfes injiziert. Es folgte die Tracheotomie und Kanülierung der Luftröhre mit einem ca. 5 cm langen PVC-Tubus, der über ein Y-Stück mit einem inspiratorischen und expiratorischen Schlauch verbunden war. Mit Hilfe einer Starling-Pumpe (Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen,

Deutschland) wurde eine kontinuierliche kontrollierte Beatmung mit Raumluft gewährleistet. Je nach pH des Blutes wurde CO<sub>2</sub> beigemischt. Anschließend erfolgte eine Laparotomie mittels Rippenbogenrandschnitt und eine ventrolaterale Ablösung des Zwerchfells. Nach Sternotomie wurde der Thorax eröffnet und der Thymus sowie das Perikard zur Darstellung von Aorta und Arteria pulmonalis reseziert.

Die Gefäße wurden in ihrem proximalen Anteil stumpf freipräpariert und mit losen Ligaturen umschlungen. Sodann wurde die Arteria pulmonalis unterhalb der Pulmonalklappe inzidiert, der zuführende Perfusionskatheter (Innendurchmesser 3,5 mm) ca. 1 cm vorgeschoben und eingebunden. Nun wurde die Aorta ca. 0,5 cm oberhalb der Aortenklappe eingeschnitten und nach instrumenteller Sprengung der Aorten- und Mitralklappe der rückführende Perfusionskatheter (Innendurchmesser 6 mm) retrograd über Aorta und linken Ventrikel in den linken Vorhof eingebracht und mit zwei Ligaturen am Aortenstumpf fixiert. Zusätzlich wurde das Herz in der Ventilebene durch eine weitere Schlinge gerafft, um eine Füllung der Ventrikel zu vermeiden.

Im Anschluss daran wurde das Herz-Lungen-Präparat mittels Durchtrennung von Trachea, Ösophagus, Vena cava superior und inferior sowie des bindegewebigen Halteapparates aus dem Thorax entnommen und in einer befeuchteten Wärmekammer freihängend an einer Wägezelle befestigt.

## **2.3 Modell der isoliert ventilierten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge**

### **2.3.1 Perfusionssystem**

Lungenmodell und Perfusionssystem wurden von Neuhof, Noack und Hoffmann (1985) entwickelt (Abb. 1):

Das Herz-Lungen-Präparat befand sich freihängend an einer elektronischen Waage in einer feucht-temperierten doppelglaswandigen Kammer.

Vier doppelglaswandige Behälter, ein Haupt- und drei Reservebehälter, mit einem Fassungsvermögen von 200 ml dienten als Perfusionsreservoir. Diese waren so hintereinandergeschaltet, dass je nach Stellung der Drei-Wege-Hähne an deren Auslass der Inhalt eines jeden, entweder in den zuführenden Schenkel des Systems geleitet oder über ein Ablaufrohr verworfen werden konnte. Durch diese Anordnung wurde es möglich, das Perfusionsmedium schnell aufzufüllen beziehungsweise auszutauschen, ohne den Perfusionskreislauf zu unterbrechen.

Im geschlossenen Kreislauf befand sich das Hauptreservoir zum Perfusionssystem hin geöffnet, und die Reservebehälter waren geschlossen. Von dem Hauptgefäß wurde das Perfusat mittels einer Rollerpumpe (Master Flex<sup>®</sup>, Cole & Palmer Instruments Co., Chicago, USA) mit regulierbarer Förderleistung (Pulsed Logic Flow Meter, Biotronics Laboratories, Zumikon, Schweiz) über einen Mikrofilter (Porengröße 40 µm, Pall-Ultipor Mikrofilter, Pall Biomedica, Portsmouth, Großbritannien) und eine Blasenfalle in den arteriellen Schenkel via Art. pulmonalis und Lunge gepumpt.

Nach Passage der Lungenstrombahn floss das Perfusionsmedium über den im linken Vorhof positionierten venösen Schenkel und das höhenverstellbare Kaskadensystem zum Hauptreservoir zurück.

Mit Hilfe dieser, zum atmosphärischen Druck hin offenen, Kaskadenvorrichtung konnte das hydrostatische Druckgefälle zwischen linkem Vorhof und Raumluft verändert und so der linke Vorhofdruck beliebig eingestellt werden. Dies wurde erreicht, indem einige Kaskaden geschlossen bzw. geöffnet oder die gesamte Vorrichtung in ihrer Höhe verstellt wurde.

Die doppelglaswandige Struktur der Perfusatbehälter sowie der Feuchtkammer wurde von destilliertem Wasser durchströmt und mit Hilfe eines Thermostats (Thermomix UB, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) auf 37 °C konstant gehalten. So konnte eine gleichbleibende physiologische Temperatur des Perfusionsmediums von 37 °C sichergestellt werden.

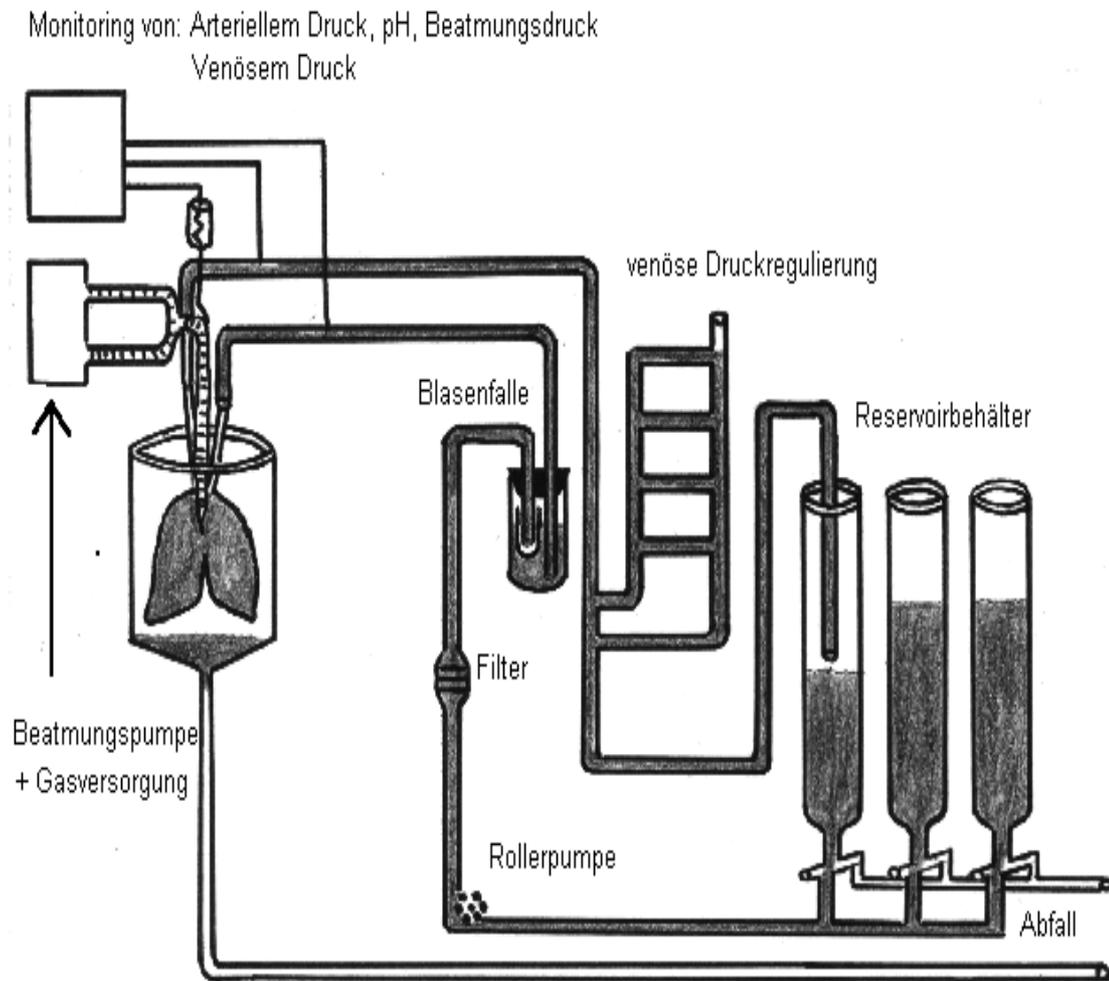


Abb. 1  
Schematische Darstellung des Modells der isoliert ventilerten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge.

### 2.3.2 Perfusionsmedium

Zur Perfusion wurde eine Krebs-Henseleit-HES-Pufferlösung (KHHP) mit zusätzlich 4 g Humanalbumin verwendet:

#### Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-HES-Pufferlösung (KHHP):

65,0 Volumenanteile HAES-steril 10 %<sup>®</sup> (MG 200000, Fresenius AG, Bad Homburg, Deutschland)

20,0 Volumenanteile Elektrolytlösung A

12,5 Volumenanteile NaHCO<sub>3</sub> 0,9 %

2,50 Volumenanteile Glucose-Lösung 10 % (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)

20 ml Humanalbumin 20 % Behring<sup>®</sup> (Behringwerke AG, Marburg, Deutschland) pro Liter KHHP (4 g/l)

#### Zusammensetzung der Elektrolytlösung A:

NaCl 122,5 mmol/l = 7,156 g/l

CaCl<sub>2</sub> x H<sub>2</sub>O 15,76 mmol/l = 1,750 g/l

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5,511 mmol/l = 0,750 g/l

MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O 14,18 mmol/l = 1,350 g/l

KCl 16,93 mmol/l = 1,262 g/l

Aqua destillata 1l

#### Errechnete Elektrolytkonzentration im KHHP:

Na<sup>+</sup> 138,0 mmol/l

Cl<sup>-</sup> 110,8 mmol/l

K<sup>+</sup> 4,50 mmol/l

Ca<sup>++</sup> 2,38 mmol/l

Mg<sup>++</sup> 1,33 mmol/l

PO<sub>4</sub><sup>-</sup> 1,10 mmol/l

Die Osmolarität betrug ca. 300 mosmol/l (Mikro-Osmometer, Roebling Messtechnik, Berlin, Deutschland). Der pH des Perfusionsmediums wurde durch Zugabe von  $\text{NaHCO}_3$  auf 7,3 - 7,4 eingestellt. Des Weiteren wurde der kolloid-osmotische Druck (KOD) mit Hilfe eines Onkometers (Onkometer BMT 921, Thomae, BMT Messtechnik GmbH, Berlin, Deutschland) kontrolliert und mit destilliertem Wasser auf Werten zwischen 23 und 25 mmHg konstant gehalten.

### **2.3.3 Beatmungs- und Perfusionsmodus**

Als Grundeinstellungen für die gesamte Beatmung wurden ein physiologisches Atemminutenvolumen von 750 ml pro Minute (Hubvolumen: 25 ml, Beatmungsfrequenz: 30 Hübe pro Minute) und ein positiver endexpiratorischer Druck (PEEP) von 1 cm Wassersäule gewählt. Während und nach der Präparation wurde die Lunge mit Raumluft beatmet. Der Beatmungsluft wurde reines CO<sub>2</sub> je nach pH beigemischt. Damit ließ sich dieser ebenso wie der pCO<sub>2</sub> und der pO<sub>2</sub> auf physiologische arterielle Werte (pH = 7,39, pO<sub>2</sub> = 80 - 90 mmHg, pCO<sub>2</sub> = 32 - 37 mmHg) einstellen.

Die Perfusion setzte unmittelbar nach Entnahme und Befestigung des Herz-Lungen-Präparates an der Waage ein. Die bis hierhin verstrichene Ischämiezeit durch Unterbrechung des Lungenkreislaufs betrug durchschnittlich acht Minuten. Das Herz-Lungen-Präparat wurde zunächst bei einem Flow von 40 ml/min mit 1000 ml Perfusionsmedium im offenen System gespült. Dieses geschah, indem das zurückfließende Perfusat vom Hauptreservoir in einen Auffangbehälter verworfen und frisches aus den Reservebehältern in das System transportiert wurde. Anschließend wurde der Kreislauf geschlossen und mit einem Gesamtvolumen von 200 ml perfundiert. Im Intervall von fünf Minuten wurde der Flow um jeweils 40 ml/min bis zu einer dem physiologischen Herzminutenvolumen entsprechenden endgültigen Flussrate von 200 ml/min gesteigert. Danach erfolgte eine nochmalige Spülung im offenen System mit 600 ml Perfusat, um noch eventuell vorhandene, während der Präparation freigesetzte, vasoaktive Substanzen zu eliminieren. Nun wurde im geschlossenen System mit einem Flow von 200 ml/min weiterperfundiert. Während der Druck im linken Vorhof mit Hilfe des Kaskadensystems konstant bei 0 mmHg gehalten wurde, betrug der Perfusionsdruck in der Arteria pulmonalis durchschnittlich 7,9 mmHg (Standardfehler 0,15 mmHg).

#### **2.3.4 Monitoring von Lungengewicht, Perfusionsdrücken, pH und Gaspartialdrücken**

Mit Hilfe einer elektronischen Waage (Typ U 1, Messbereich 0 - 500 g, Messgenauigkeit  $\pm 0,1$  g) mit Messverstärker (KWS 3073, Hottinger-Baldwin Messtechnik, Gießen, Deutschland), an der das Herz-Lungen-Präparat freihängend befestigt war, wurde das Lungengewicht erfasst.

Für die Druckmessung in der Arteria pulmonalis und im linken Vorhof waren beide Perfusionskatheter mit Innenkathetern (Innendurchmesser 0,5 mm) ausgestattet, deren Spitze sich jeweils in der Öffnungsebene der Katheter befand. Über ein Y-Stück waren die mit physiologischer Kochsalzlösung luftblasenfrei gefüllten Messkatheter an einem Druckaufnehmer (Combitrans Monitoring Set, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) angeschlossen.

Um eine permanente Messung des pH zu gewährleisten, wurde ein Teil des Perfusats über einen Bypass aus dem arteriellen Schenkel einer Messkammer mit Temperatur- und pH-Elektrode (pH-Meter, Typ pH 537, WTW, Weilheim, Deutschland) zugeführt und anschließend wieder in den venösen Schenkel abgegeben (Durchflussmessung). Zusätzlich konnten pH sowie  $pO_2$  und  $pCO_2$  durch Probeentnahmen zu beliebig festgesetzten Zeitpunkten an einem Blutgasanalysator (ABL 330 Acid Base Laboratory, Fa. Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) ermittelt werden.

Perfusionsdrücke, Lungengewicht und pH wurden kontinuierlich mit Hilfe eines Multipenrecorders (Rikadenki Kogyo Co., Ltd., Tokyo, Japan) aufgezeichnet.

## **2.4 Granulozyten und Immunglobuline**

### **2.4.1 Isolierung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN)**

Die im folgenden beschriebene Methode wurde von Hjorth et al. (1981) entwickelt:

100 ml venöses menschliches Blut wurde von gesunden Probanden in fünf 20 ml-Spritzen entnommen. Diese waren zur Antikoagulation mit je 2 ml einer Heparin-Natrium Verdünnung (200 µl Liquemin<sup>®</sup> auf 10 ml isotoner NaCl-Lsg., 100 I.E. / ml) gefüllt.

Im Anschluss wurden zwanzig 13 ml-Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit jeweils 4 ml 55 % Percoll<sup>®</sup>-Lösung gefüllt. Daraufhin wurden je 4 ml 67 % Percoll<sup>®</sup> mittels einer Kunststoff-Auslaufpipette untergeschichtet. Nachdem alle Röhrchen mit 4 ml Blut aufgefüllt waren, erfolgte die erste Zentrifugation (Rotixa/RP, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland) für 20 Minuten bei 25 °C (1400 U/min, 60 s Anlaufzeit und 2 min Bremszeit, 460 g).

Anschließend wurde die gebildete Plasmaphase und ein Drittel der oberen Percollschicht abgesaugt und verworfen. Die sich darunter befindende PMN-haltige Percollschicht wurde aus jeweils fünf Röhrchen mit einer Eppendorf-Pipette vorsichtig abgehoben und in einem mit warmen HBSS-gefüllten 50 ml-Behälter (Blue Max<sup>™</sup>, Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA) resuspendiert.

Diese Suspension wurde ebenfalls zentrifugiert (5 min bei 25 °C, 1720 U/min, keine Brems- und keine Anlaufzeit, 480 g), ihr Überstand abgesaugt und der gewaschene PMN-haltige Rest auf zwei HBSS-haltige Plastikröhrchen verteilt.

Nach der folgenden dritten Zentrifugation (5 min bei 25 °C, 1720 U/min, keine Brems- und keine Anlaufzeit, 480 g) wurde wiederum der nicht

verwertbare Anteil verworfen, die Granulozyten in ihrer verbleibenden Lösung aufgeschüttelt und mit einem Nährmedium versehen.

Es folgte die Inkubation der Zellen in einem beheizten Wasserbad (Köttermann, Hänigsen, Deutschland) für 90 Minuten bei 37 °C und 1 l/min Gasgemisch (CO<sub>2</sub> 4,56 Vol. %, O<sub>2</sub> 14,53 Vol. %, N<sub>2</sub> 80,91 Vol. %, Messer Griesheim, Griesheim, Deutschland).

Im Anschluss daran kam eine weitere Reinigung (5 min bei 25 °C, 1720 U/min, keine Brems- und keine Anlaufzeit, 480 g), nach der die gesamte PMN-Lösung in einem Plastikröhrchen gesammelt und mit HBSS aufgefüllt wurde.

Nach der nun folgenden fünften und letzten Zentrifugation (5 min bei 25 °C, 1720 U/min, keine Brems- und keine Anlaufzeit, 480 g) wurden die Zellen in eine mit Perfusat gefüllte 10 ml-Spritze aufgezogen.

### 2.4.1.1 Isolierungsmedien und Nährmedium

Zur Isolierung der PMN wurde eine Percoll<sup>®</sup>-Lösung mit unterschiedlichen Dichtegradienten und Hanks Hepes Puffer<sup>®</sup> verwendet:

Zusammensetzung von Percoll<sup>®</sup> (Polyvinylpyrrolidon-beschichtete Silikon-Partikel, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Schweden) mit unterschiedlichen Dichtegradienten:

55 % (d = 1,077 kg/l):	55 ml Percoll <sup>®</sup> (d = 1,130 kg/l), 10 ml NaCl 1,5 mol/l, 35 ml Aqua destillata
67 % (d = 1,095 kg/l):	67 ml Percoll <sup>®</sup> (d = 1,130 kg/l), 10 ml NaCl 1,5 mol/l, 23 ml Aqua destillata
NaCl 1,5 mol/l:	87,66 g NaCl in 1l Aqua destillata

Hanks Hepes Puffer<sup>®</sup>:

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

Zusammensetzung des Nährmediums für die Inkubation der PMN:

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

#### **2.4.1.2 Granulozytenzählung**

PMN-Suspension wurde in einer Leukomischpipette bis zur Marke 1,0 und dann mit Türks-Lösung (Essigsäure-Gentianaviolettlösung, Merck Diagnostica, Darmstadt, Deutschland) bis zur Marke 11,0 aufgezogen. Anschließend wurde die Pipette für 10 Minuten mit einem Pipettenschüttelgerät (Assistent, Deutschland) geschüttelt. Danach konnten mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer die Granulozyten unter dem Mikroskop ausgezählt werden. Dabei wurde für jede Zählkammer aus der Summe der vier Gruppenquadrate der Mittelwert gebildet. Aus den beiden Zahlen wurde wiederum der Mittelwert errechnet und mit dem Umrechnungsfaktor 25 multipliziert. Der so erhaltene Wert gibt die Anzahl der Granulozyten pro Mikroliter Blut an.

Die Zählung ergab, dass durchschnittlich  $193 \pm 17 \times 10^6$  PMN pro 100 ml menschliches Blut separiert wurden.

#### **2.4.2 Herstellung von hitzeaggregierten Immunglobulinen**

Als Stimulus für die PMN wurde hitzeaggregiertes Immunglobulin der Klasse G (IgG) verwendet, welches nach der Methode von Henson et al. (1972) hergestellt wurde:

Menschliches Immunglobulin (95 % IgG, Beriglobin<sup>®</sup>, Behringwerke AG, Marburg, Deutschland) wurde mit einer Phosphat-Puffer-Lösung (0,15 mol NaCl in Phosphat-Puffer, pH 7,0) auf eine Konzentration von 5 mg/ml verdünnt.

Anschließend wurde es im beheizten Wasserbad bei 63 °C 5 - 80 Minuten lang inkubiert und intermittierend geschüttelt bis eine Aggregatbildung deutlich zu sehen war.

Dieser Ansatz wurde in der Kühlzentrifuge für 30 Minuten (15000 U/min, keine Brems- und keine Anlaufzeit) zentrifugiert.

Zuletzt wurde der Niederschlag (unlösliches IgG) mit KHHP resuspendiert und portioniert eingefroren.

## 2.5 Versuche

### 2.5.1 **Verwendete Substanzen**

Zu 200 ml Perfusat wurde ein "Cocktail" bestehend aus folgenden Substanzen in den entsprechenden Gruppen pro Versuch gegeben:

- |                  |   |
|------------------|---|
| 0,6 ml (1 mg/ml) | Dimetindenmaleat (Fenistil <sup>®</sup> , Zyma GmbH, München, Deutschland), H <sub>1</sub> -Rezeptorantagonist                          |
| 0,5 ml (1 mg/ml) | Cimetidinhydrochlorid (Tagamet <sup>®</sup> , SmithKline Beecham Pharma GmbH, München, Deutschland), H <sub>2</sub> -Rezeptorantagonist |
| 2 ml (1 mg/ml)   | Diclofenac-Natrium (Voltaren <sup>®</sup> , Geigy, Wehr, Deutschland), Cyclo- und Lipoxigenaseblocker                                   |
| 2 ml (4,6 mg/ml) | WEB 2086 (Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Deutschland), PAF-Antagonist   |

Zusätzlich wurden in den jeweiligen Gruppen pro Versuch verabreicht:

- |                                 |  |
|---------------------------------|--|
| 4 ml (40 mg/ml)                 | hitzeaggregierte Immunglobuline vom Menschen (Beriglobin <sup>®</sup> , Behringwerke AG, Marburg, Deutschland) |
| $193 \pm 17 \times 10^6$        | PMN pro 100 ml menschliches Blut   |
| 4 ml Bolus + 3,3 ml/h (1 mg/ml) | CE-1037 (Cortech, Denver, USA), Elastase-Inhibitor   |

### 2.5.2 **Versuchsgruppen**

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

### **2.5.3 Versuchsaufbau**

Für die Versuche wurden nur solche Lungen verwendet, bei denen nach einer 30-minütigen Steady-State Phase die Perfusionsdrücke, das Lungengewicht sowie die Beatmungsparameter konstant geblieben waren. Hierbei wurde noch zur weiteren Beurteilung der Lunge das Aussehen des Organs herangezogen.

Während dieser Zeit wurde bei allen Experimenten mit Ausnahme der Kontrollgruppe und der Gruppe 6 nach fünf Minuten der Inhibitor-Cocktail als Bolus in das Perfusat gegeben. Damit sollte der Einfluss von Histamin, Arachidonsäure-Metaboliten und PAF (Plättchen-aktivierender Faktor) auf den Gefäßwiderstand und die Ödembildung verhindert werden. Der Elastase-Inhibitor CE-1037 wurde bei den entsprechenden Versuchsreihen fünf Minuten nach Beginn der Steady-State Phase als Bolus und dann bis zum Ende der Versuche weiter über einen Perfusor dem System kontinuierlich zugeführt. Nach weiteren zehn Minuten wurden dann bei den Gruppen 4, 5 und 6 die PMN, die sich in einer mit Perfusat gefüllten 10 ml-Spritze befanden, in den arteriellen Schenkel des Perfusionssystems injiziert. Diese Vorgehensweise sollte ihnen eine gleichmäßige Verteilung in der Lungenstrombahn gewährleisten, bevor sie durch hitzeaggregiertes IgG stimuliert wurden.

Im Anschluss an die Steady-State Phase wurde bei allen Versuchsreihen zum Zeitpunkt null der Filtrationskoeffizient ermittelt. Nach weiteren fünf Minuten wurde allen außer der Kontrollgruppe IgG zugegeben. Anschließend folgten bei sämtlichen Versuchsgruppen weitere Bestimmungen des Filtrationskoeffizienten zu den Zeitpunkten 15, 30, 60, 75, 90, 120 min. Hierfür wurden das Gewicht, der pulmonal-arterielle Druck und der pulmonal-venöse Druck kontinuierlich gemessen. Für die spätere Ermittlung der Elastasekonzentration sowie für die Messungen am Blutgasanalysator wurden gleichzeitig Perfusatproben entnommen.

#### **2.5.4 Bestimmung des kapillären Filtrationskoeffizienten**

Als Indikator für die kapilläre Permeabilität der Lunge wurde der kapilläre Filtrationskoeffizient ( $K_{fc}$ ) nach Drake et al. (1980) vor und nach Ödeminduktion ermittelt. Dieser beschreibt das Verhältnis zwischen der Netto-Flüssigkeitsfiltration und dem Gleichgewicht von hydrostatischen und onkotischen Kräften an der kapillären Membran.

Zur gravimetrischen  $K_{fc}$ -Bestimmung wurde der pulmonal-venöse Druck (PVD) für sieben Minuten auf 7,5 mmHg angehoben. Unter dieser Druckerhöhung kam es zum Flüssigkeitseinstrom ins Gewebe, der über die Zunahme des Lungengewichts quantifiziert wurde. Hierbei wurden der rasche Gewichtsanstieg während der ersten zwei Minuten und der schnelle Abfall nach Beendigung der PVD-Erhöhung als Gefäßfüllungseffekt betrachtet. Die so erlangte Gewichtszunahme pro Minute (Filtration) wurde auf den pulmonal-kapillären Druck (PKD) und 100 g Feuchtgewicht (FG) der Lunge bezogen. Hieraus ließ sich dann der kapilläre Filtrationskoeffizient errechnen:

$$\text{Filtration/PKD/Lungenfeuchtgewicht} = \text{ml/min/mmHg/100 g}$$

Da der PKD nicht gemessen werden konnte, wurde er anhand der folgenden Formel berechnet:

$$\text{PKD} = \text{PVD} + 0,44 \times (\text{PAD} - \text{PVD})$$

(PAD = pulmonal-arterielle Druck)

Das Feuchtgewicht der Lunge (FG) wurde ausgehend vom Körpergewicht errechnet:

$$\text{FG} = \text{Körpergewicht (g)} \times 0,0024$$

In vorausgegangen Experimenten von Effros et al. (1981) war diese Konstante, korrigiert um das Gefäßfüllungsvolumen, als Relationsfaktor zwischen Körpergewicht des Kaninchens und Lungenfeuchtgewicht ermittelt worden.

### **2.5.5 Bestimmung der Elastasekonzentration**

Die entnommenen Perfusatproben wurden für 10 Minuten (20 °C, 3000 U/min, keine Anlauf- und keine Bremszeit, 1500 g) leukozytenfrei zentrifugiert und der Überstand in Eppendorf-Hütchen pipettiert.

Zur Bestimmung der Elastasekonzentration diente ein von Neumann et al. (1984) entwickelter heterogener Enzymimmunoassay (EIA) (12589 PMN Elastase<sup>®</sup>, Merck, Darmstadt, Deutschland). Das Grundprinzip des EIA besteht darin, dass im ersten Schritt die Proben mit einem im Überschuss vorhandenen  $\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitor ( $\alpha_1$ -PI) eine Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert werden. Anschließend wird der PMN-Elastase- $\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitor-Komplex mit seinem PMN-Elastase-Teil durch an die Wand gekoppelte Antikörper (Ak) spezieller Röhrchen gebunden. Danach werden mit alkalischer Phosphatase (AP) markierte Antikörper zugesetzt, die mit dem  $\alpha_1$ -PI-Teil des Komplexes reagieren. Nach Auswaschen der überschüssigen AP-markierten Antikörper (Ak) wird die enzymatische Aktivität der über Immunkomplexe gebundenen AP photometrisch bestimmt. Die Menge an gebildetem Farbstoff ist der Konzentration an PMN-Elastase- $\alpha_1$ -PI direkt proportional.

### 2.5.5.1 Reagenzien des Enzymimmunoassays

$\alpha_1$ -PI-Lösung:	50 $\mu$ l (12,5 mg/ml)
Kalibratoren:	Gelatinehaltiger TRIS-Puffer 20 $\mu$ mol, PMN-Elastase- $\alpha_1$ -PI-Komplex, Stabilisatoren, je 2 x 5 ml
Kontrollplasma:	Humanplasma für die Bestimmung des PMN-Elastase- $\alpha_1$ -PI-Komplexes, 500 $\mu$ l
Probenverdünnungsmedium:	Phosphat-Puffer 20 mmol/l (pH 7,5), Stabilisatoren, Konservierungsmittel, 100 ml
Waschlösung:	Wasser, Detergenz, Konservierungsmittel, 100 ml
AP-Substrat:	20 $\mu$ mol 4-Nitrophenylphosphat, Füllstoffe pro Tablette, 10 Tabletten
AP-Puffer:	Diethanolamin 1 mol/l (pH 9,8), MgCl <sub>2</sub> 0,5 mmol/l, 100 ml
Stopplösung:	NaOH 2 mol/l, 50 ml
Ak-beschichtete Röhrchen:	Anti-PMN-Elastase-(human)-Antikörper vom Schaf, 4 Aluminiumbeutel à 24 Polystyrol-Röhrchen
Ak-Enzym-Konjugat:	Anti- $\alpha_1$ -PI-(human)-Antikörper vom Kaninchen gekoppelt mit alkalischer Phosphatase, Konservierungsmittel, 3,7 ml
Ak-Enzym-Konjugat-Puffer:	TRIS 0,25 mmol (pH 7,5), MgCl <sub>2</sub> 0,05 mmol, Stabilisatoren, 2 x 25 ml

## 2.6 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm Statgraphics® (STSC Inc., USA) durchgeführt und von Herrn J. Reitze, MoReData GmbH, mit dem Programm SPSS® 10.0.7 (SPSS Inc., USA) überprüft.

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

Als Ergebnis der Analysen wurde das errechnete Signifikanzniveau (Fehler 1. Art, Irrtumswahrscheinlichkeit oder p-Wert) angegeben. Es bezeichnet diejenige Wahrscheinlichkeit, mit der man irrtümlich eine richtige Hypothese ablehnt. Sie stellt ein Kriterium der Güte des Faktoreinflusses dar. In dieser Arbeit wurde mit dem Signifikanzniveau von 5 % gearbeitet. Ergebnisse mit p-Werten zwischen 0,05 und 0,01 wurden als signifikant bezeichnet, Werte < 0,01 als hochsignifikant.

Alle Parameter wurden in den vier Gruppen mit  $n = 6$  Versuchen auf Normalverteilung getestet. In keiner Gruppe und bei keinem Parameter konnte die Hypothese der Normalverteilung auf dem Signifikanzniveau von 5 % verworfen werden. Die Parameter können daher als (multi-) normalverteilt gelten.

Es wurden folgende  $H_0$ -Hypothesen überprüft:

1. Die Therapie hat keinen Einfluss auf das jeweils beobachtete Merkmal (Gruppenunterschiedsanalyse).
2. Das jeweils beobachtete Merkmal verändert sich nicht innerhalb des Untersuchungszeitraums (Zeitverlaufsanalyse).
3. Das zeitliche Verhalten der Merkmale ist bei allen Versuchen gleich (Profilanalyse).

Die  $H_1$ -Hypothesen verneinen die zugehörigen  $H_0$ -Hypothesen.

### **3. ERGEBNISSE**

#### **3.1 Einleitung**

Zur Quantifizierung der Flüssigkeitsextravasation und kapillären Permeabilität in der Lunge vor und nach Ödeminduktion wurden bei sämtlichen Versuchsreihen die Gewichtszunahme, der pulmonal-arterielle Druck und der pulmonal-venöse Druck kontinuierlich über einen Zeitraum von zwei Stunden gemessen. Aus diesen Variablen ließ sich der kapilläre Filtrationskoeffizient ( $K_{fc}$ ) als Indikator für die mikrovaskuläre Permeabilität errechnen.

Um die einzelnen Reihen besser miteinander vergleichen zu können, wurde das Gewicht der Lungen zu Beginn der Versuche auf null Gramm abgeglichen und die Differenz der Filtrationskoeffizienten ( $t = 15, 30, 60, 75, 90, 120$  min) zum Ausgangswert ( $t = 0$  min) gebildet ( $dK_{fc}$ ). Durch die Untersuchung von entnommenen Perfusatproben nach 0, 30, 60, 90 und 120 Minuten konnte die Elastasekonzentration als Indikator für die Aktivierung von Granulozyten in der Lungenstrombahn erfasst werden.

Die Änderungen des Lungengewichtes, des kapillären Filtrationskoeffizienten ( $dK_{fc}$ ) und der Elastasekonzentration wurden tabellarisch und grafisch veranschaulicht. Hierfür wurde aus Darstellungsgründen bei den Gruppen mit  $n = 6$  Versuchen der arithmetische Mittelwert mit Standardfehler verwendet. In den Gruppen mit  $n = 2$  Versuchen wurden die Einzelwerte entsprechend aufgeführt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden jeweils zwei Versuchsgruppen gemeinsam mit der Kontrollgruppe dargestellt.

## **3.2 Versuche**

### **3.2.1 Änderung des Lungengewichtes**

In der Kontrollgruppe (Gruppe 1, n = 6) wurden die Lungen 120 Minuten ohne Zugabe von Substanzen kontinuierlich und normal perfundiert.

In Gruppe 2 (n = 6) wurde der Einfluss von hitzeaggregierten IgG-Antikörpern aus Beriglobin<sup>®</sup> und von Inhibitoren der nicht-proteolytischen Mediatoren auf das Lungengewicht untersucht: Es wurde Fenistil<sup>®</sup> (Histamin<sub>1</sub>-Rezeptorantagonist), Tagamet<sup>®</sup> (Histamin<sub>2</sub>-Rezeptorantagonist), Voltaren<sup>®</sup> (Cyclo- und Lipoxxygenaseblocker) und WEB 2086 (PAF-Antagonist), die im weiteren Verlauf als Inhibitor-Cocktail zusammengefaßt werden, zusammen als Bolus appliziert.

In Gruppe 3 (n = 2) wurde der Einfluss auf das Lungengewicht bei zusätzlicher kontinuierlicher Gabe des Elastase-Inhibitors CE-1037 zum Inhibitor-Cocktail und zu IgG untersucht.

	<b>Gruppe 1</b>	<b>Gruppe 2</b>	<b>Gruppe 3</b>	
<b>Zeit (min)</b>	<b>Änderung des Lungengewichtes (g)</b>	<b>Änderung des Lungengewichtes (g)</b>	<b>Änderung des Lungengewichtes (g) (2 Einzelversuche)</b>	
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00	0,00
15	0,50 ± 0,21	1,63 ± 0,55	-0,30	0,30
30	1,22 ± 0,47	2,20 ± 0,86	0,00	0,80
60	1,90 ± 0,92	2,42 ± 1,11	0,30	0,30
75	2,67 ± 1,20	3,15 ± 1,47	0,70	0,90
90	3,67 ± 1,42	4,40 ± 1,95	2,00	1,90
120	4,33 ± 1,93	5,88 ± 2,46	2,50	4,20

Tab. 1

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler bei Gruppe 1 (Kontrollgruppe ohne Zugabe von Substanzen, n = 6) und Gruppe 2 (Cocktail und IgG, n = 6) sowie Einzelwerte bei Gruppe 3 (Cocktail, CE-1037 und IgG, n = 2).

Sowohl bei Gruppe 1 als auch bei den Gruppen 2 und 3 ließ sich eine geringe, langsame Gewichtszunahme der Lunge erkennen. Gruppe 2 zeigte mit  $5,88 \pm 2,46$  g den höchsten Gewichtsanstieg nach 120 Minuten, gefolgt von Gruppe 1 und Gruppe 3. Nach 120 Minuten Versuchszeit war der Gewichtsanstieg in Gruppe 1 und 2 nicht signifikant.

Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Gruppe 1 und Gruppe 2 wurde nicht festgestellt (Tab. 1, Abb. 2).

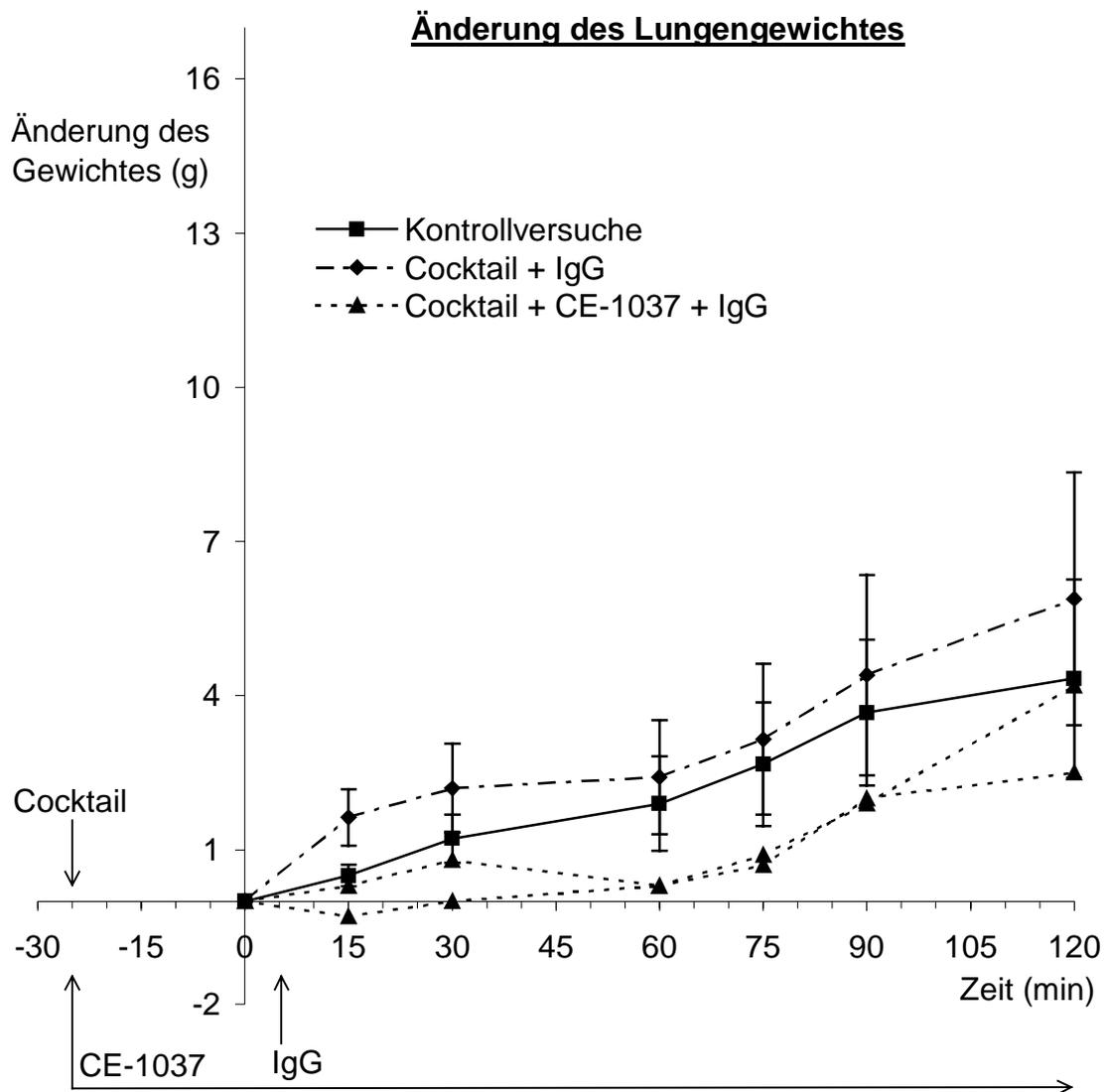


Abb. 2  
 Änderung des Lungengewichtes über zwei Stunden im Anschluss an eine Steady-State Phase von 30 Minuten, während der die Substanzen (außer IgG) appliziert wurden: Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler bei Gruppe 1 (Kontrollgruppe ohne Zugabe von Substanzen, n = 6) und Gruppe 2 (Cocktail und IgG, n = 6) sowie Einzelwerte bei Gruppe 3 (Cocktail, CE-1037 und IgG, n = 2).

In Gruppe 4 (n = 6) wurde geprüft, inwieweit die Applikation des Inhibitor-Cocktails (H<sub>1</sub>/H<sub>2</sub>-Rezeptorantagonist, Cyclo-/Lipoxygenaseblocker und PAF-Antagonist) einen Einfluss auf die Gewichtsentwicklung der Lunge hat, nachdem in der Lungenstrombahn humane polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) durch humane hitzeaggregierte IgG-Ak stimuliert wurden.

In Gruppe 5 (n = 6) wurde untersucht, inwieweit, nach vorangehender Gabe des Inhibitor-Cocktails, die zusätzliche kontinuierliche Applikation des Elastase-Inhibitors CE-1037 einen Einfluss auf die Gewichtsveränderung der Lunge hat, nachdem in der Strombahn humane polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) durch humane hitzeaggregierte IgG-Ak stimuliert wurden.

	<b>Gruppe 1</b>	<b>Gruppe 4</b>	<b>Gruppe 5</b>
<b>Zeit</b> (min)	<b>Änderung des Lungengewichtes (g)</b>	<b>Änderung des Lungengewichtes (g)</b>	<b>Änderung des Lungengewichtes (g)</b>
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
15	0,50 ± 0,21	0,95 ± 0,37	0,75 ± 0,44
30	1,22 ± 0,47	1,50 ± 0,93	0,57 ± 0,47
60	1,90 ± 0,92	2,87 ± 1,51	0,10 ± 0,46
75	2,67 ± 1,20	5,57 ± 2,05	0,12 ± 0,40
90	3,67 ± 1,42	8,35 ± 2,50	0,32 ± 0,49
120	4,33 ± 1,93	13,83 ± 3,36	0,20 ± 0,43

Tab. 2

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler bei Gruppe 1 (Kontrollgruppe ohne Zugabe von Substanzen, n = 6), Gruppe 4 (Cocktail, PMN und IgG, n = 6) und Gruppe 5 (Cocktail, CE-1037, PMN und IgG, n = 6).

In Gruppe 1 nahm das Gewicht bis zum Ende kontinuierlich geringfügig zu (siehe Seite 34 - 35). In Gruppe 4 kam es zu einer langsamen geringfügigen Gewichtszunahme über 60 Minuten. Danach stieg das Lungengewicht stärker an. Das dabei zu den einzelnen Zeitpunkten gemessene Gewicht war signifikant erhöht im Vergleich zu dem jeweils vorangehenden Wert ( $p < 0,05$ ). Nach 120 Minuten war die größte Zunahme aller Versuchsgruppen mit  $13,83 \pm 3,36$  g erreicht. Gruppe 5 wies eine ähnlich geringe Zunahme wie Gruppe 1 in den ersten 15 Minuten auf, um dann langsam wieder auf niedrigere Werte abzufallen. Dabei zeigte sich eine im Vergleich zu dem vorhergehenden Wert signifikante Gewichtsabnahme mit  $0,1 \pm 0,46$  g nach 60 Minuten ( $p < 0,05$ ).

Das Lungengewicht in Gruppe 4 und 5 unterschied sich nach 120 Minuten hochsignifikant ( $p < 0,01$ ) (Tab. 2, Abb. 3).

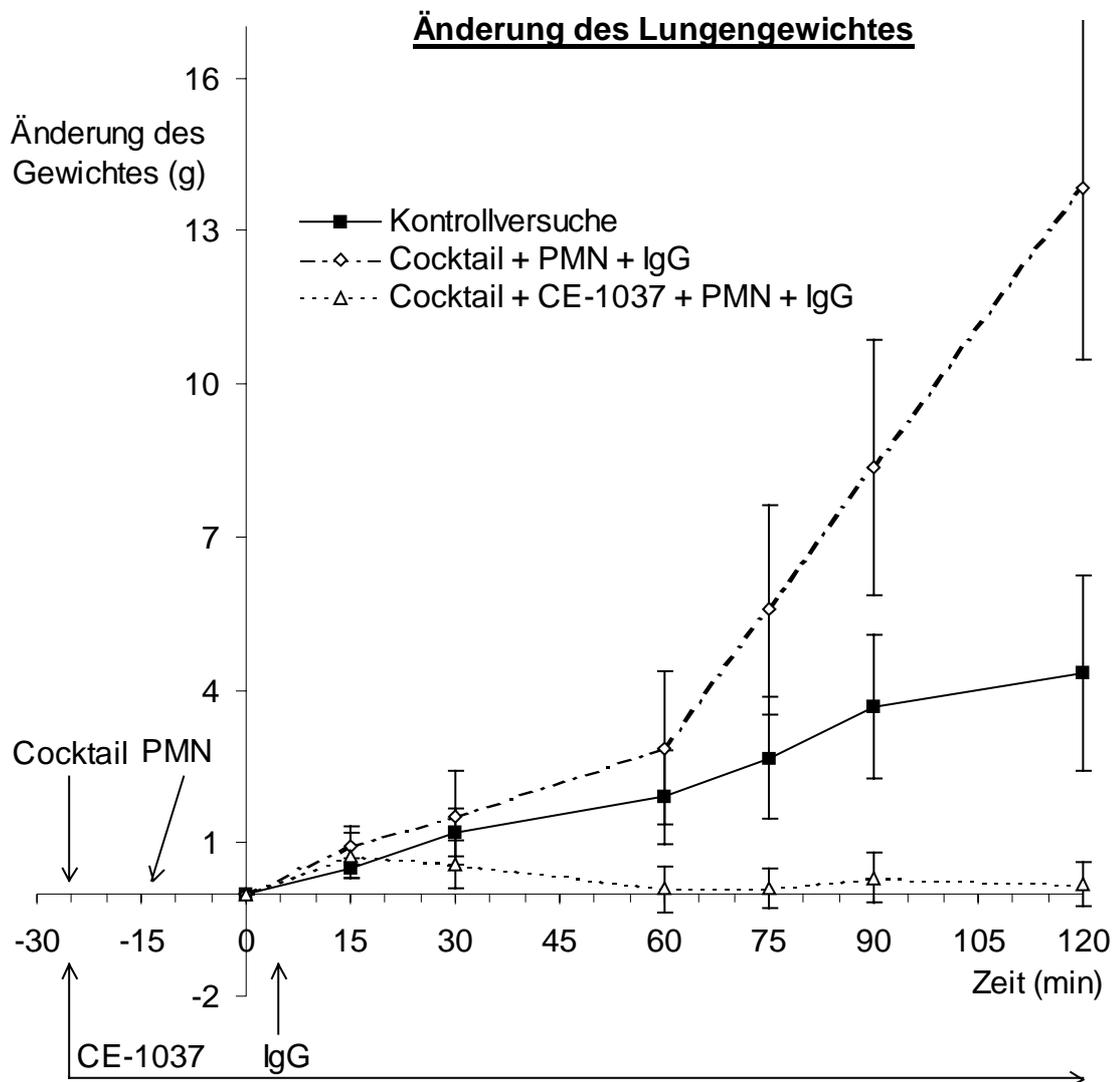


Abb. 3  
 Änderung des Lungengewichtes über zwei Stunden im Anschluss an eine Steady-State Phase von 30 Minuten, während der die Substanzen (außer IgG) appliziert wurden: Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler bei Gruppe 1 (Kontrollgruppe ohne Zugabe von Substanzen, n = 6), Gruppe 4 (Cocktail, PMN und IgG, n = 6) und Gruppe 5 (Cocktail, CE-1037, PMN und IgG, n = 6).

In Gruppe 6 (n = 2) sollte der Einfluss des Elastase-Inhibitors CE-1037 ohne vorangehende Applikation des Inhibitor-Cocktails (H<sub>1</sub>/H<sub>2</sub>-Rezeptorantagonist, Cyclo-/Lipoxygenaseblocker und PAF-Antagonist) auf die Änderung des Lungengewichtes nach Stimulation von humanen PMN durch hitzeaggregierte Immunglobuline in der Lungenstrombahn untersucht werden.

	<b>Gruppe 1</b>	<b>Gruppe 5</b>	<b>Gruppe 6</b>	
Zeit (min)	Änderung des Lungengewichtes (g)	Änderung des Lungengewichtes (g)	Änderung des Lungengewichtes (g) (2 Einzelversuche)	
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00	0,00
15	0,50 ± 0,21	0,75 ± 0,44	1,00	1,10
30	1,22 ± 0,47	0,57 ± 0,47	0,30	0,30
60	1,90 ± 0,92	0,10 ± 0,46	-0,10	-0,10
75	2,67 ± 1,20	0,12 ± 0,40	-0,10	0,00
90	3,67 ± 1,42	0,32 ± 0,49	0,00	0,00
120	4,33 ± 1,93	0,20 ± 0,43	0,50	-0,10

Tab. 3

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler bei Gruppe 1 (Kontrollgruppe ohne Zugabe von Substanzen, n = 6) und Gruppe 5 (Cocktail, CE-1037, PMN und IgG, n = 6) sowie Einzelwerte bei Gruppe 6 (CE-1037, PMN und IgG, n = 2).

In Gruppe 1 kam es zu einer kontinuierlich geringen Gewichtszunahme der Lunge bis zum Ende der Versuche (siehe Seite 34 - 35). Das Lungengewicht in Gruppe 5 wies eine ähnlich geringe Zunahme in den ersten 15 Minuten auf, um dann langsam wieder auf niedrigere Werte abzufallen (siehe Seite 37 - 38). Bei den beiden Versuchen der Gruppe 6 wurde eine ähnliche Gewichtsentwicklung wie bei Gruppe 5 gesehen.

Ein signifikanter Unterschied zwischen Gruppe 1 und Gruppe 5 wurde nicht festgestellt (Tab. 3, Abb. 4).

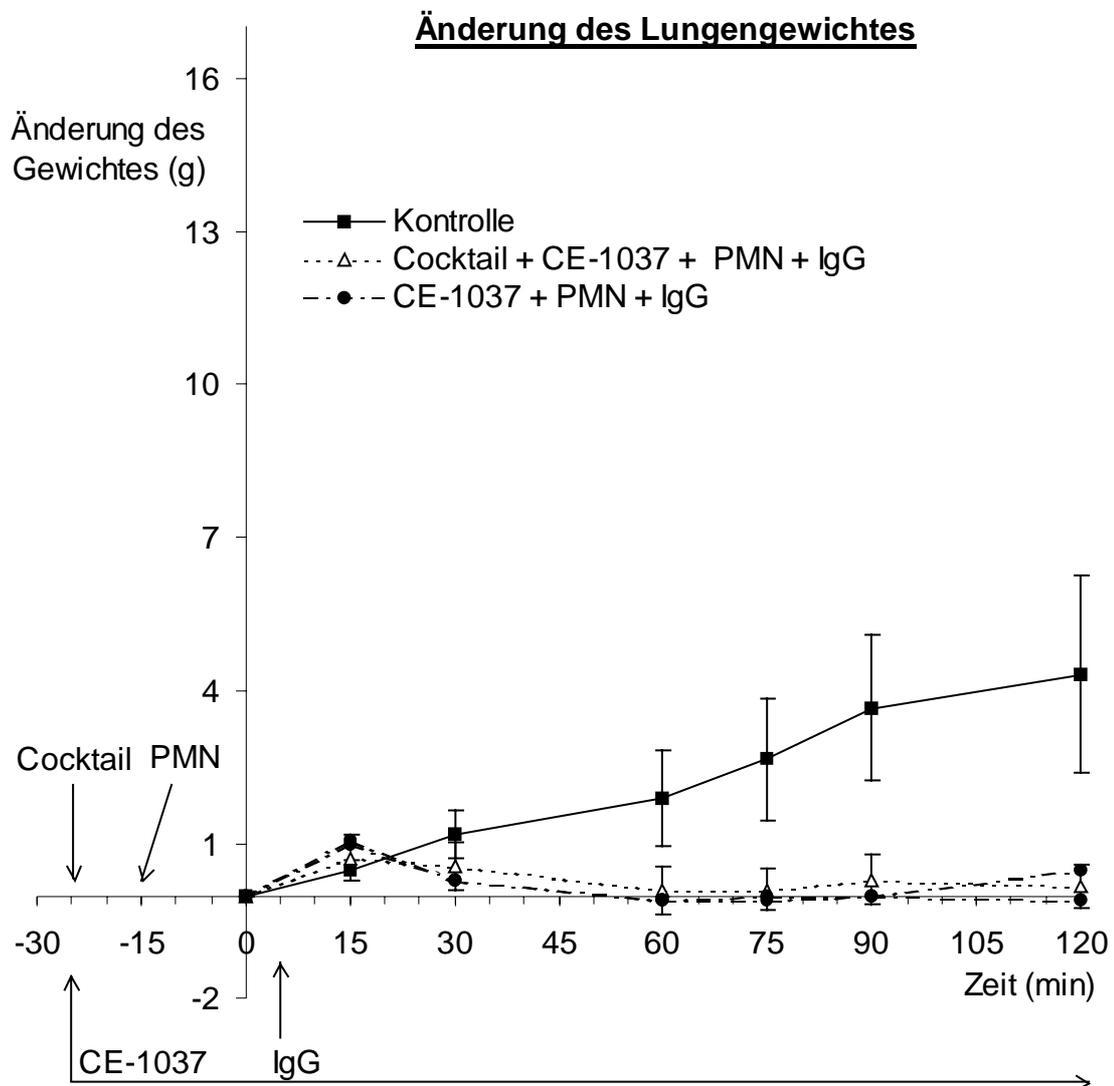


Abb. 4

Änderung des Lungengewichtes über zwei Stunden im Anschluss an eine Steady-State Phase von 30 Minuten, während der die Substanzen (außer IgG) appliziert wurden: Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler bei Gruppe 1 (Kontrollgruppe ohne Zugabe von Substanzen, n = 6) und Gruppe 5 (Cocktail, CE-1037, PMN und IgG, n = 6) sowie Einzelwerte bei Gruppe 6 (CE-1037, PMN und IgG, n = 2).

### **3.2.2 Änderung des kapillären Filtrationskoeffizienten**

In der Kontrollgruppe (Gruppe 1, n = 6) wurden die Lungen 120 Minuten ohne Zugabe von Substanzen kontinuierlich und normal perfundiert.

In Gruppe 2 (n = 6) wurde der Einfluss von hitzeaggregierten IgG-Antikörpern aus Beriglobin<sup>®</sup> und von Inhibitoren der nicht-proteolytischen Mediatoren auf den kapillären Filtrationskoeffizienten untersucht: Es wurde Fenistil<sup>®</sup> (Histamin<sub>1</sub>-Rezeptorantagonist), Tagamet<sup>®</sup> (Histamin<sub>2</sub>-Rezeptorantagonist), Voltaren<sup>®</sup> (Cyclo- und Lipoxygenaseblocker) und WEB 2086 (PAF-Antagonist), die im weiteren Verlauf als Inhibitor-Cocktail zusammengefaßt werden, zusammen als Bolus appliziert.

In Gruppe 3 (n = 2) wurde der Einfluss auf den kapillären Filtrationskoeffizienten bei zusätzlicher kontinuierlicher Gabe des Elastase-Inhibitors CE-1037 zum Inhibitor-Cocktail und zu IgG untersucht.

Tabelle 4 gibt eine Zusammenfassung der zur Berechnung des dKfc (Differenz des kapillären Filtrationskoeffizienten zum Ausgangswert) benötigten Variablen an:

Gruppe 1				Gruppe 2			Gruppe 3 (2 Einzelversuche)					
Zeit (min)	PKD (mmHg)	Filtration (ml/min/ 100g)	Kfc (ml/min/ mmHg/100g)	PKD (mmHg)	Filtration (ml/min/ 100g)	Kfc (ml/min/ mmHg/100g)	PKD (mmHg)		Filtration (ml/min/ 100g)		Kfc (ml/min/ mmHg/100g)	
0	10,24 ± 0,40	3,03 ± 0,38	0,30 ± 0,04	9,66 ± 0,24	3,59 ± 0,87	0,37 ± 0,09	8,79	7,96	2,02	2,00	0,23	0,25
15	10,04 ± 0,39	2,47 ± 0,22	0,25 ± 0,02	10,16 ± 0,27	2,68 ± 0,54	0,26 ± 0,05	9,20	8,54	2,02	1,69	0,22	0,19
30	10,08 ± 0,37	2,42 ± 0,15	0,24 ± 0,02	9,99 ± 0,19	2,61 ± 0,57	0,26 ± 0,06	8,87	8,38	2,02	2,62	0,23	0,31
60	10,13 ± 0,37	2,76 ± 0,29	0,27 ± 0,03	10,05 ± 0,24	3,04 ± 0,83	0,30 ± 0,08	9,14	8,44	2,02	2,32	0,22	0,27
75	10,07 ± 0,35	2,82 ± 0,45	0,28 ± 0,04	9,96 ± 0,29	3,79 ± 1,45	0,38 ± 0,14	8,39	8,51	2,02	5,25	0,24	0,61
90	9,94 ± 0,34	3,16 ± 0,53	0,32 ± 0,05	9,69 ± 0,36	4,51 ± 2,23	0,46 ± 0,21	8,65	8,60	2,29	6,48	0,26	0,75
120	10,05 ± 0,32	4,47 ± 0,95	0,58 ± 0,16	10,06 ± 0,29	9,78 ± 5,70	0,94 ± 0,52	8,64	8,90	4,97	8,49	0,58	0,95

Tab. 4

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler bei Gruppe 1 (Kontrollgruppe ohne Zugabe von Substanzen, n = 6) und Gruppe 2 (Cocktail und IgG, n = 6) sowie Einzelwerte bei Gruppe 3 (Cocktail, CE-1037 und IgG, n = 2); PKD (errechneter pulmonal-kapillärer Druck aus pulmonal-arteriellem und -venösem Druck), kapilläre Filtration (Flüssigkeitseinstrom ins Lungengewebe pro Minute bezogen auf 100 g Lungenfeuchtgewicht) und Kfc (kapillärer Filtrationskoeffizient als Quotient aus Filtration und PKD bezogen auf 100 g Lungenfeuchtgewicht).

	<b>Gruppe 1</b>	<b>Gruppe 2</b>	<b>Gruppe 3</b>	
Zeit (min)	Änderung des dKfc (ml/min/mmHg/100g)	Änderung des dKfc (ml/min/mmHg/100g)	Änderung des dKfc (ml/min/mmHg/100g) (2 Einzelversuche)	
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00	0,00
15	-0,05 ± 0,04	-0,11 ± 0,04	-0,01	-0,06
30	-0,06 ± 0,03	-0,11 ± 0,04	0,00	0,06
60	-0,03 ± 0,03	-0,07 ± 0,05	-0,01	0,02
75	-0,02 ± 0,05	0,01 ± 0,11	0,01	0,36
90	0,02 ± 0,05	0,09 ± 0,18	0,03	0,50
120	0,28 ± 0,16	0,57 ± 0,49	0,35	0,70

Tab. 5

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler bei Gruppe 1 (Kontrollgruppe ohne Zugabe von Substanzen, n = 6) und Gruppe 2 (Cocktail und IgG, n = 6) sowie Einzelwerte bei Gruppe 3 (Cocktail, CE-1037 und IgG, n = 2); dKfc (Differenz des kapillären Filtrationskoeffizienten zum Ausgangswert).

In den Gruppen 1 und 2 war nach ca. 75 Minuten Versuchszeit eine anfangs geringe, nach 90 Minuten stärkere kontinuierliche Zunahme des dKfc zu beobachten. Diese war jedoch in beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich zu den vorhergehenden Werten. Gruppe 3 zeigte in einem Versuch einen ähnlichen Verlauf, in dem anderen kam es bereits nach 60 Minuten zu einem starken kontinuierlichen Anstieg. Nach 120 Minuten war die kapilläre Permeabilität in Gruppe 3 in einem Versuch am höchsten, gefolgt von Gruppe 2 und dem zweiten Versuch der Gruppe 3. In der Kontrollgruppe war die geringste Zunahme des dKfc mit  $0,28 \pm 0,16$  ml/min/mmHg/100 g zu verzeichnen.

Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Gruppe 1 und Gruppe 2 wurde nicht festgestellt (Tab. 4 und 5, Abb. 5).

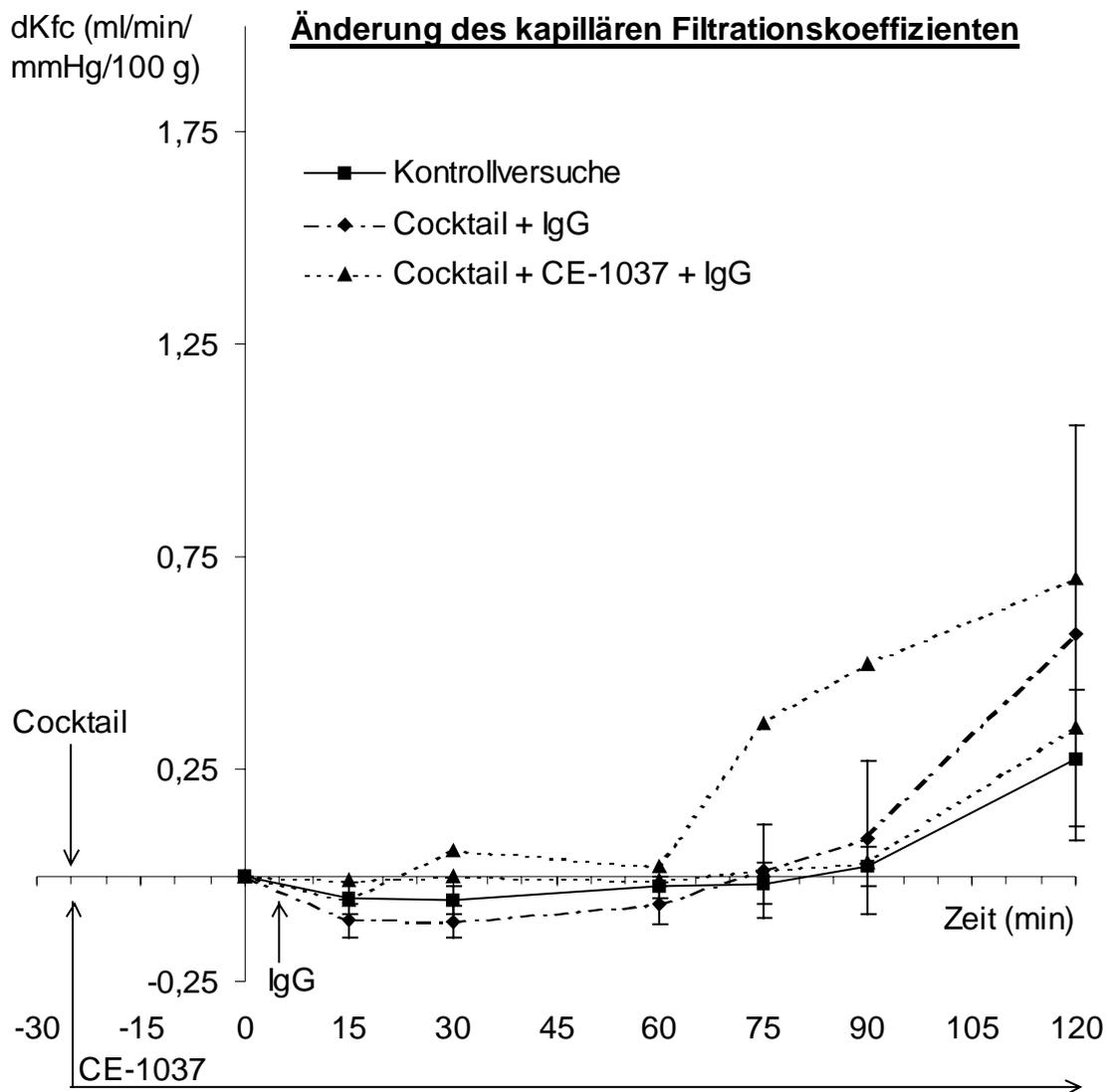


Abb. 5  
 Änderung des kapillären Filtrationskoeffizienten (dKfc) über zwei Stunden im Anschluss an eine Steady-State Phase von 30 Minuten, während der die Substanzen (außer IgG) appliziert wurden: Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler bei Gruppe 1 (Kontrollgruppe ohne Zugabe von Substanzen, n = 6) und Gruppe 2 (Cocktail und IgG, n = 6) sowie Einzelwerte bei Gruppe 3 (Cocktail, CE-1037 und IgG, n = 2).

In Gruppe 4 (n = 6) wurde geprüft, inwieweit die Applikation des Inhibitor-Cocktails (H<sub>1</sub>/H<sub>2</sub>-Rezeptorantagonist, Cyclo-/Lipoxygenaseblocker und PAF-Antagonist) einen Einfluss auf den kapillären Filtrationskoeffizienten der Lunge hat, nachdem in der Lungenstrombahn humane polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) durch humane hitzeaggregierte IgG-Ak stimuliert wurden.

In Gruppe 5 (n = 6) wurde untersucht, inwieweit, nach vorangehender Gabe des Inhibitor-Cocktails, die zusätzliche kontinuierliche Applikation des Elastase-Inhibitors CE-1037 einen Einfluss auf den kapillären Filtrationskoeffizienten der Lunge hat, nachdem in der Strombahn humane polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) durch humane hitzeaggregierte IgG-Ak stimuliert wurden.

Tabelle 6 gibt eine Zusammenfassung der zur Berechnung des dKfc (Differenz des kapillären Filtrationskoeffizienten zum Ausgangswert) benötigten Variablen an:

Zeit (min)	Gruppe 1			Gruppe 4			Gruppe 5		
	PKD (mmHg)	Filtration (ml/min/ 100g)	Kfc (ml/min/ mmHg/100g)	PKD (mmHg)	Filtration (ml/min/ 100g)	Kfc (ml/min/ mmHg/100g)	PKD (mmHg)	Filtration (ml/min/ 100g)	Kfc (ml/min/ mmHg/100g)
0	10,24 ± 0,40	3,03 ± 0,38	0,30 ± 0,04	10,03 ± 0,34	4,79 ± 1,28	0,48 ± 0,13	8,32 ± 0,60	2,99 ± 0,40	0,37 ± 0,06
15	10,04 ± 0,39	2,47 ± 0,22	0,25 ± 0,02	9,92 ± 0,23	3,89 ± 0,96	0,39 ± 0,10	8,34 ± 0,69	1,68 ± 0,17	0,21 ± 0,02
30	10,08 ± 0,37	2,42 ± 0,15	0,24 ± 0,02	9,88 ± 0,26	4,45 ± 1,04	0,46 ± 0,11	8,20 ± 0,63	1,74 ± 0,28	0,21 ± 0,03
60	10,13 ± 0,37	2,76 ± 0,29	0,27 ± 0,03	10,01 ± 0,28	7,14 ± 1,97	0,65 ± 0,20	8,13 ± 0,66	1,80 ± 0,32	0,22 ± 0,03
75	10,07 ± 0,35	2,82 ± 0,45	0,28 ± 0,04	10,01 ± 0,29	8,24 ± 2,23	0,83 ± 0,23	8,19 ± 0,65	2,07 ± 0,25	0,26 ± 0,04
90	9,94 ± 0,34	3,16 ± 0,53	0,32 ± 0,05	9,92 ± 0,30	11,13 ± 3,09	1,13 ± 0,32	8,12 ± 0,66	2,12 ± 0,39	0,26 ± 0,05
120	10,05 ± 0,32	4,47 ± 0,95	0,58 ± 0,16	10,04 ± 0,32	20,28 ± 5,61	2,03 ± 0,57	8,14 ± 0,62	3,12 ± 0,44	0,39 ± 0,06

Tab. 6

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler bei Gruppe 1 (Kontrollgruppe ohne Zugabe von Substanzen, n = 6), Gruppe 4 (Cocktail, PMN und IgG, n = 6) und Gruppe 5 (Cocktail, CE-1037, PMN und IgG, n = 6); PKD (errechneter pulmonal-kapillärer Druck aus pulmonal-arteriellem und -venösem Druck), kapilläre Filtration (Flüssigkeitseinstrom ins Lungengewebe pro Minute bezogen auf 100 g Lungenfeuchtgewicht) und Kfc (kapillärer Filtrationskoeffizient als Quotient aus Filtration und PKD bezogen auf 100 g Lungenfeuchtgewicht).

	<b>Gruppe 1</b>	<b>Gruppe 4</b>	<b>Gruppe 5</b>
<b>Zeit</b> (min)	<b>Änderung des dKfc</b> (ml/min/mmHg/100g)	<b>Änderung des dKfc</b> (ml/min/mmHg/100g)	<b>Änderung des dKfc</b> (ml/min/mmHg/100g)
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
15	-0,05 ± 0,04	-0,09 ± 0,05	-0,16 ± 0,05
30	-0,06 ± 0,03	-0,03 ± 0,06	-0,15 ± 0,06
60	-0,03 ± 0,03	0,16 ± 0,07	-0,15 ± 0,04
75	-0,02 ± 0,05	0,35 ± 0,10	-0,11 ± 0,04
90	0,02 ± 0,05	0,65 ± 0,19	-0,11 ± 0,05
120	0,28 ± 0,16	1,54 ± 0,44	0,02 ± 0,06

Tab. 7

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler bei Gruppe 1 (Kontrollgruppe ohne Zugabe von Substanzen, n = 6), Gruppe 4 (Cocktail, PMN und IgG, n = 6) und Gruppe 5 (Cocktail, CE-1037, PMN und IgG, n = 6); dKfc (Differenz des kapillären Filtrationskoeffizienten zum Ausgangswert).

In der Gruppe 1 war nach ca. 75 Minuten Versuchszeit eine anfangs geringe, nach 90 Minuten stärkere kontinuierliche Zunahme der kapillären Permeabilität bis zum Ende der Versuchszeit zu sehen. Eine signifikante Änderung des dKfc konnte nicht festgestellt werden. In Gruppe 4 stieg nach kurzzeitigem Abfall des dKfc in den ersten 15 Minuten die kapilläre Permeabilität kontinuierlich und zunehmend stärker bis zum Ende der Versuchszeit an. Die ab der 75. Minute ermittelten Werte waren signifikant unterschiedlich zu dem jeweils vorangehenden Wert derselben Gruppe ( $p < 0,05$ ). Der nach 120 Minuten errechnete dKfc war mit  $1,54 \pm 0,44$  ml/min/mmHg/100 g am höchsten von allen Versuchsgruppen. Gruppe 5 zeigte nach initialem Abfall des dKfc einen nahezu unveränderten Verlauf während 90 Minuten Versuchszeit, um nach 120 Minuten mit  $0,02 \pm 0,06$  ml/min/mmHg/100 g einen signifikanten Anstieg vorzuweisen ( $p < 0,05$ ).

Gruppe 4 unterschied sich in den zur Minute 60, 75 und 90 ermittelten dKfc-Werten hochsignifikant von Gruppe 1 und Gruppe 5 ( $p < 0,01$ ) (Tab. 6 und 7, Abb. 6).

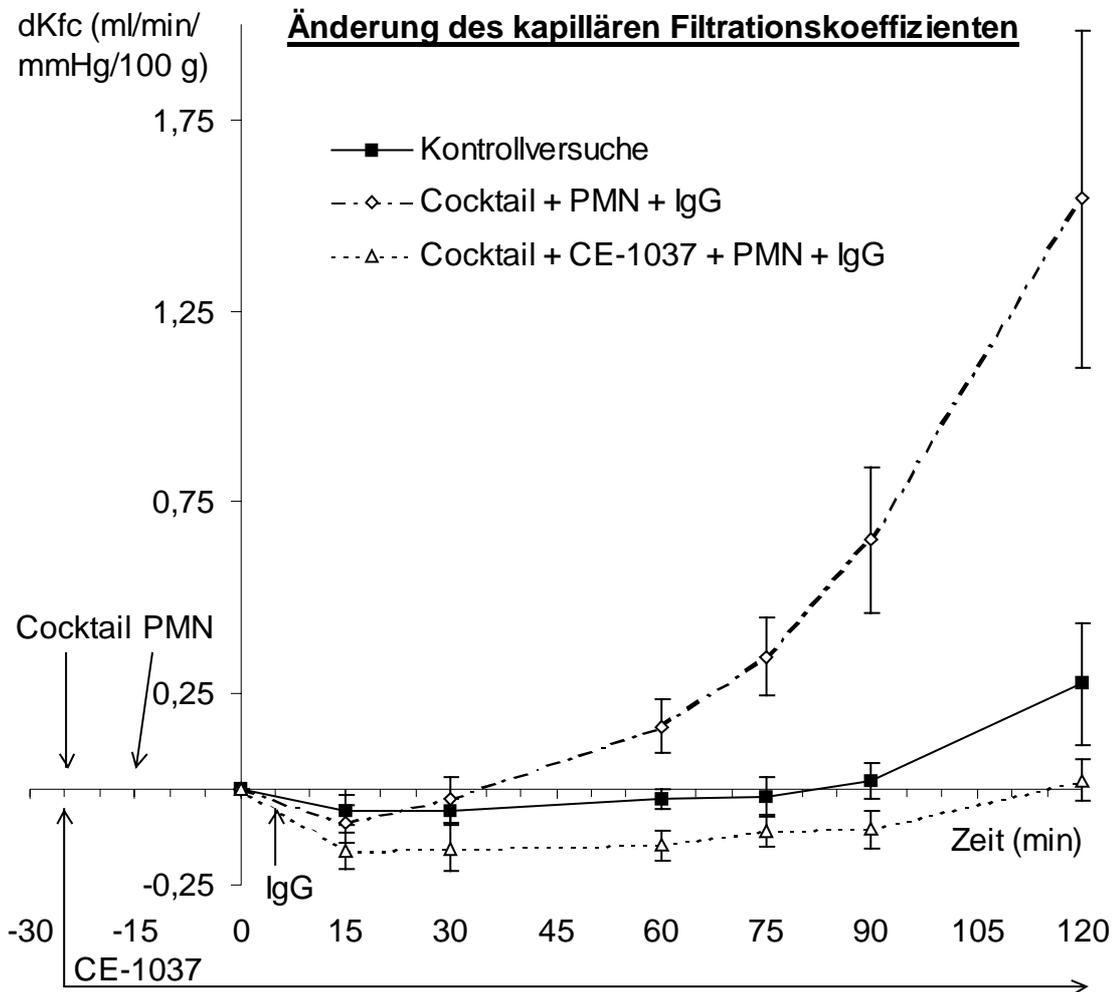


Abb. 6  
 Änderung des kapillären Filtrationskoeffizienten (dKfc) über zwei Stunden im Anschluss an eine Steady-State Phase von 30 Minuten, während der die Substanzen (außer IgG) appliziert wurden: Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler bei Gruppe 1 (Kontrollgruppe ohne Zugabe von Substanzen, n = 6), Gruppe 4 (Cocktail, PMN und IgG, n = 6) und Gruppe 5 (Cocktail, CE-1037, PMN und IgG, n = 6).

In Gruppe 6 (n = 2) sollte der Einfluss des Elastase-Inhibitors CE-1037 ohne vorangehende Applikation des Inhibitor-Cocktails (H<sub>1</sub>/H<sub>2</sub>-Rezeptorantagonist, Cyclo-/Lipoxygenaseblocker und PAF-Antagonist) auf die Änderung des kapillären Filtrationskoeffizienten nach Stimulation von humanen PMN durch hitzeaggregierte Immunglobuline in der Lungenstrombahn untersucht werden.

Tabelle 8 gibt eine Zusammenfassung der zur Berechnung des dKfc (Differenz des kapillären Filtrationskoeffizienten zum Ausgangswert) benötigten Variablen an:

Gruppe 1				Gruppe 5			Gruppe 6 (2 Einzelversuche)					
Zeit (min)	PKD (mmHg)	Filtration (ml/min/ 100g)	Kfc (ml/min/ mmHg/100g)	PKD (mmHg)	Filtration (ml/min/ 100g)	Kfc (ml/min/ mmHg/100g)	PKD (mmHg)		Filtration (ml/min/ 100g)		Kfc (ml/min/ mmHg/100g)	
0	10,24 ± 0,40	3,03 ± 0,38	0,30 ± 0,04	8,32 ± 0,60	2,99 ± 0,40	0,37 ± 0,06	6,59	9,08	2,53	2,73	0,38	0,30
15	10,04 ± 0,39	2,47 ± 0,22	0,25 ± 0,02	8,34 ± 0,69	1,68 ± 0,17	0,21 ± 0,02	7,14	9,92	2,27	1,58	0,32	0,16
30	10,08 ± 0,37	2,42 ± 0,15	0,24 ± 0,02	8,20 ± 0,63	1,74 ± 0,28	0,21 ± 0,03	7,28	9,83	2,15	2,59	0,29	0,26
60	10,13 ± 0,37	2,76 ± 0,29	0,27 ± 0,03	8,13 ± 0,66	1,80 ± 0,32	0,22 ± 0,03	7,16	9,51	2,53	2,59	0,35	0,27
75	10,07 ± 0,35	2,82 ± 0,45	0,28 ± 0,04	8,19 ± 0,65	2,07 ± 0,25	0,26 ± 0,04	7,06	9,48	3,28	2,73	0,47	0,29
90	9,94 ± 0,34	3,16 ± 0,53	0,32 ± 0,05	8,12 ± 0,66	2,12 ± 0,39	0,26 ± 0,05	7,02	9,32	3,54	2,29	0,50	0,24
120	10,05 ± 0,32	4,47 ± 0,95	0,58 ± 0,16	8,14 ± 0,62	3,12 ± 0,44	0,39 ± 0,06	7,33	9,27	5,05	3,16	0,69	0,34

Tab. 8

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler bei Gruppe 1 (Kontrollgruppe ohne Zugabe von Substanzen, n = 6) und Gruppe 5 (Cocktail, CE-1037, PMN und IgG, n = 6) sowie Einzelwerte bei Gruppe 6 (CE-1037, PMN und IgG, n = 2); PKD (errechneter pulmonal-kapillärer Druck aus pulmonal-arteriellem und -venösem Druck), kapilläre Filtration (Flüssigkeitseinstrom ins Lungengewebe pro Minute bezogen auf 100 g Lungenfeuchtgewicht) und Kfc (kapillärer Filtrationskoeffizient als Quotient aus Filtration und PKD bezogen auf 100 g Lungenfeuchtgewicht).

	<b>Gruppe 1</b>	<b>Gruppe 5</b>	<b>Gruppe 6</b>	
<b>Zeit (min)</b>	<b>Änderung des dKfc (ml/min/mmHg/100g)</b>	<b>Änderung des dKfc (ml/min/mmHg/100g)</b>	<b>Änderung des dKfc (ml/min/mmHg/100g) (2 Einzelversuche)</b>	
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00	0,00
15	-0,05 ± 0,04	-0,16 ± 0,05	-0,06	-0,14
30	-0,06 ± 0,03	-0,15 ± 0,06	-0,09	-0,04
60	-0,03 ± 0,03	-0,15 ± 0,04	-0,03	-0,03
75	-0,02 ± 0,05	-0,11 ± 0,04	0,09	-0,01
90	0,02 ± 0,05	-0,11 ± 0,05	0,12	-0,06
120	0,28 ± 0,16	0,02 ± 0,06	0,31	0,04

Tab. 9

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler bei Gruppe 1 (Kontrollgruppe ohne Zugabe von Substanzen, n = 6) und Gruppe 5 (Cocktail, CE-1037, PMN und IgG, n = 6) sowie Einzelwerte bei Gruppe 6 (CE-1037, PMN und IgG, n = 2); dKfc (Differenz des kapillären Filtrationskoeffizienten zum Ausgangswert).

In der Gruppe 1 war nach ca. 75 Minuten Versuchszeit eine anfangs geringe, nach 90 Minuten stärkere kontinuierliche Zunahme der kapillären Permeabilität bis zum Ende der Versuchszeit zu sehen. Eine signifikante Änderung des dKfc konnte nicht festgestellt werden. Gruppe 5 zeigte nach initialem Abfall des dKfc einen nahezu unveränderten Verlauf während 90 Minuten Versuchszeit, um nach 120 Minuten mit  $0,02 \pm 0,06$  ml/min/mmHg/100 g einen signifikanten Anstieg vorzuweisen ( $p < 0,05$ ). Bei einem Versuch der Gruppe 6 konnte ein ähnlicher Verlauf wie in Gruppe 5 beobachtet werden. Der andere Versuch unterschied sich durch eine bereits nach ca. 60 Minuten langsam kontinuierlich bis zum Versuchsende steigende kapilläre Permeabilität.

Ein signifikanter Unterschied zwischen Gruppe 1 und Gruppe 5 wurde nicht festgestellt (Tab. 8 und 9, Abb. 7).

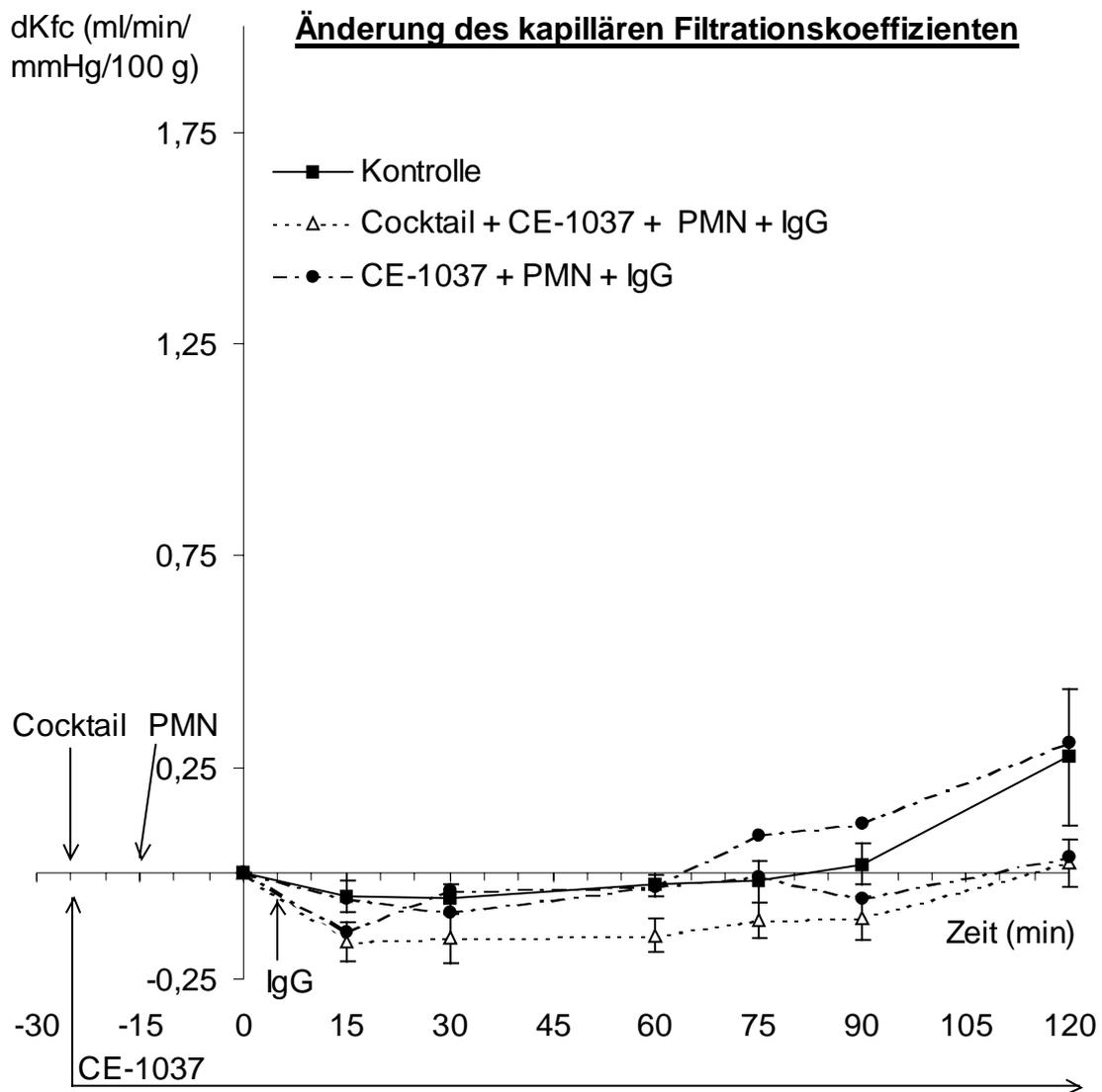


Abb. 7

Änderung des kapillären Filtrationskoeffizienten (dKfc) über zwei Stunden im Anschluss an eine Steady-State Phase von 30 Minuten, während der die Substanzen (außer IgG) appliziert wurden: Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler bei Gruppe 1 (Kontrollgruppe ohne Zugabe von Substanzen, n = 6) und Gruppe 5 (Cocktail, CE-1037, PMN und IgG, n = 6) sowie Einzelwerte bei Gruppe 6 (CE-1037, PMN und IgG, n = 2).

### 3.2.3 Änderung der Elastasekonzentration

	<b>Gruppe 1</b>	<b>Gruppe 2</b>	<b>Gruppe 4</b>	<b>Gruppe 5</b>
<b>Zeit (min)</b>	<b>Elastase-Konzentration (µg/l)</b>	<b>Elastase-Konzentration (µg/l)</b>	<b>Elastase-Konzentration (µg/l)</b>	<b>Elastase-Konzentration (µg/l)</b>
0	21,08 ± 2,44	32,17 ± 4,75	35,75 ± 1,89	36,16 ± 4,77
30	17,85 ± 1,90	32,75 ± 3,59	60,05 ± 7,29	59,89 ± 9,81
60	19,80 ± 1,06	35,34 ± 3,01	70,91 ± 4,33	77,72 ± 14,00
90	21,67 ± 2,30	34,23 ± 3,81	90,18 ± 11,87	99,04 ± 19,20
120	18,53 ± 1,16	36,63 ± 5,41	107,52 ± 15,24	101,51 ± 24,59

Tab. 10

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler bei Gruppe 1 (Kontrollgruppe ohne Zugabe von Substanzen, n = 6), Gruppe 2 (Cocktail und IgG, n = 6), Gruppe 4 (Cocktail, PMN und IgG, n = 6) und Gruppe 5 (Cocktail, CE-1037, PMN und IgG, n = 6).

Während 120 Minuten Versuchszeit zeigten Gruppe 1 und 2 eine nahezu unveränderte Elastasekonzentration, wobei in Gruppe 2 durchgehend etwas höhere Werte gemessen wurden. In beiden Gruppen kam es zu keinem signifikanten Anstieg der Elastasekonzentration. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen wurde nicht festgestellt.

Gruppe 4 und 5 wiesen einen fast identischen steilen Anstieg der Elastasekonzentration vom Beginn bis zum Ende der Versuchszeit auf. Hierbei wurde in Gruppe 4 nach 30 und 120 Minuten und in Gruppe 5 nach 30, 60 und 90 Minuten ein signifikanter Anstieg der Elastasekonzentration im Vergleich zu dem jeweils vorangehenden Wert ermittelt ( $p < 0,05$ ). Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen bestand nicht.

Zum Zeitpunkt  $t = 0$  min war die Elastasekonzentration der Gruppe 4 signifikant höher als die der Gruppe 1 ( $p < 0,05$ ). Ab der 30. Minute waren die Elastasekonzentrationen der Gruppe 4 und 5 hochsignifikant höher als die der Gruppe 1 und 2 ( $p < 0,01$ ) (Tab. 10, Abb. 8).

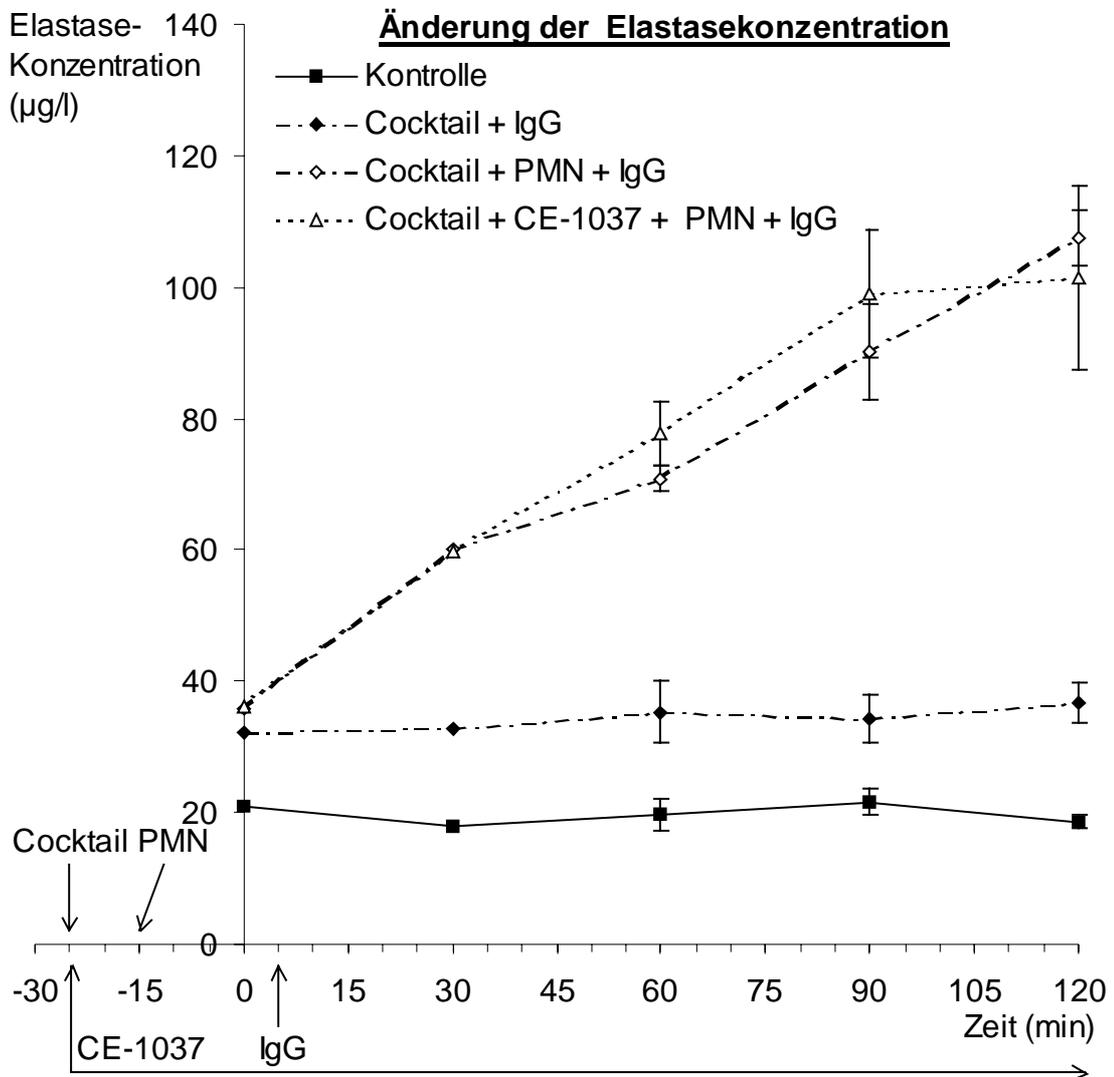


Abb. 8

Änderung der Elastasekonzentration im Perfusat über zwei Stunden im Anschluss an eine Steady-State Phase von 30 Minuten, während der die Substanzen (außer IgG) appliziert wurden: Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler bei Gruppe 1 (Kontrollgruppe ohne Zugabe von Substanzen, n = 6), Gruppe 2 (Cocktail und IgG, n = 6), Gruppe 4 (Cocktail, PMN und IgG, n = 6) und Gruppe 5 (Cocktail, CE-1037, PMN und IgG, n = 6).

#### 4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit konnten am Modell der isoliert ventilerten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge Hinweise gewonnen werden, dass durch Zugabe des synthetischen Elastase-Inhibitors CE-1037 die Entstehung eines durch Granulozytenstimulation ausgelösten Lungenödems verhindert werden kann.

Um die Wirkung des Inhibitors CE-1037 auf die von aktivierten humanen PMN ausgeschütteten Proteasen, besonders Elastase, zu untersuchen und die Interaktion mit den klassischen humoralen Kaskadensystemen zu vermeiden, wurde die isoliert ventilerte Kaninchenlunge mit einer zell- und plasmafreien Krebs-Henseleit-Lösung perfundiert.

Zur Vermeidung des Einflusses von vasoaktiven, den Gefäßtonus und die Permeabilität beeinflussenden nicht-proteolytischen Faktoren, erfolgte die Applikation eines Inhibitor-Cocktails, bestehend aus Diclofenac (Voltaren<sup>®</sup>), WEB 2086, Cimetidin (Tagamet<sup>®</sup>) und Dimetinden (Fenistil<sup>®</sup>): So wird durch Gabe des nichtsteroidalen Antiphlogistikums Diclofenac die Bildung von Arachidonsäure-Metaboliten durch die Cyclo- und Lipoxygenase nach Stimulation von PMN blockiert (100, 106, 174). Dadurch ließ sich der initiale Anstieg des pulmonal-arteriellen Drucks und der kapillären Flüssigkeitsextravasation verhindern. Für die hierbei auftretende pulmonale Vasokonstriktion wird in erster Linie Thromboxan (TXA<sub>2</sub>) verantwortlich gemacht (42, 121, 176, 178, 180). Dieses wird als Cyclooxygenaseprodukt der Arachidonsäure im Lungengewebe synthetisiert (179). Auslösender Stimulus ist wahrscheinlich eine Endothelläsion durch reaktive O<sub>2</sub>-Produkte aus dem "respiratory burst" (5, 12). Leukotriene und andere Lipoxygenaseprodukte erhöhen die

vaskuläre Permeabilität der Lungengefäße (17, 33, 54, 165). Sie fördern weiterhin die Chemotaxis, die Migration und die Adhärenz der Granulozyten an die Gefäßwand (54, 109, 121, 149, 197). Zu einem großen Anteil werden sie von den PMN selbst synthetisiert und freigesetzt (12, 14, 43, 45, 51, 58, 112, 123, 126, 133, 149, 175, 186, 202). Ihr Stellenwert im Rahmen des ARDS ist jedoch noch nicht völlig geklärt.

Darüber hinaus wurde durch die Gabe von WEB 2086 der Einfluss des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF) auf die Lungenstrombahn unterdrückt (25, 28, 41, 91, 101, 102, 127, 155, 163, 167, 191, 196, 216). PAF wird eine wichtige Rolle in der Pathogenese des ARDS und bestimmter Schockformen zugeschrieben (27, 69, 72, 125, 191, 196). So wurden in der Bronchioalveolarlavage-Flüssigkeit von ARDS-Patienten deutlich erhöhte Mengen an PAF gefunden (125). Worthen et al. (1983) konnten bereits in Kaninchenlungen erhöhte Mengen an PMN, Albumin und Wasser nach Applikation von PAF feststellen. Weiterhin enthält das Lungengewebe des Menschen spezifische PAF-Rezeptoren, die einen Zusammenhang dieses Mediators mit der Pathophysiologie einiger Erkrankungen der Lunge nahelegen (75). PAF wird neben den PMN von verschiedenen Zellpopulationen im Kaninchen und Menschen synthetisiert (27, 116, 117, 164, 216). Es wirkt chemotaktisch und aktivierend auf Leukozyten und Thrombozyten (15, 32, 105, 164, 217, 224). Außerdem erhöht es den Tonus und die Permeabilität der Lungengefäße direkt bzw. indirekt über die Bildung von Arachidonsäure-Metaboliten, wie Leukotrien C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>) und TXA<sub>2</sub>, im Lungengewebe (15, 25, 28, 34, 72, 73, 115, 127, 151, 163, 190, 224). PAF induziert aber auch die Bildung von reaktiven O<sub>2</sub>-Spezies, die seine Wirkung auf Endothelien zu modulieren scheinen (72, 167).

Schließlich wurden durch Gabe des H<sub>1</sub>-Antagonisten Dimetinden und des H<sub>2</sub>-Antagonisten Cimetidin die Auswirkungen von Histamin auf das Gefäßbett der Lunge inhibiert. Am Beispiel eines durch Pseudomonas-

Sepsis ausgelösten ARDS am Schwein konnte die nützliche Wirkung von H<sub>1</sub>- und H<sub>2</sub>-Blockern bereits nachgewiesen werden (22, 192, 193). Damit ließen sich die, durch Histamin verursachten, initialen hämodynamischen Reaktionen verhindern. In zahlreichen Studien wurden die Effekte von Histamin auf den Widerstand und die Compliance der Lungengefäße untersucht (61, 76, 114, 159, 160). Histamin wird von den basophilen Granulozyten und Mastzellen gebildet und sezerniert. Letztere befinden sich im perivaskulären Lungenparenchym (59), wo sich ihre Zahl je nach den pathophysiologischen Bedingungen ändert (95). Stimulation von H<sub>1</sub>-Rezeptoren führt dann zur pulmonalen Vaso- und Bronchokonstriktion (16, 61, 76, 159, 204). Der Anstieg des pulmonal-kapillären Druckes erfolgt dabei über eine Erhöhung des postkapillären Widerstandes (61, 159, 160). Stimulation der H<sub>2</sub>-Rezeptoren führt zur pulmonalen Vasodilatation (7, 210) und zur Erhöhung der Gefäßpermeabilität (16, 103). Der Anstieg der mikrovaskulären Permeabilität erfolgt hierbei über eine vorübergehende Erweiterung der Zwischenzellabstände der venösen Endothelzellen (Majno et Palade, 1961; Rowley, 1964; Casley-Smith et Window, 1976).

Der zu untersuchende synthetische Protease-Inhibitor CE-1037 wurde als Inhibitor der humanen PMN-Elastase entwickelt. Für die Auslösung der pulmonalen Permeabilitätsstörung wurden daher humane PMN verwendet. Diese wurden nach der Methode von Hjorth et al. (1981) separiert, die als sehr präzise, schonend und nicht belastend für die funktionelle Aktivität der PMN gilt: Etwa 60 - 80 % der Leukozyten aus dem menschlichen Blut werden hierbei gewonnen (70, 113). Der Anteil der PMN an den Leukozyten beträgt dabei 94 - 100 % (113, 212). Über 95 % der Zellen sind vital und in ihrer Funktionsfähigkeit unbeeinträchtigt. Allerdings kommt es zu einer geringen Zellaktivierung während des Separationsverfahrens (70, 113, 212). Für die vorliegenden Versuche wurden durchschnittlich  $193 \pm 17 \times 10^6$  PMN aus 100 ml menschlichem

Vollblut separiert. Bei den Gruppen 4, 5 und 6 wurden dann die humanen PMN, die sich in einer mit Perfusat gefüllten 10 ml-Spritze befanden, nach ca. 15 Minuten der Steady-State Phase in den arteriellen Schenkel des geschlossenen Perfusionssystems injiziert. Bereits nach der ersten Passage durch das pulmonale Kapillarbett kommt es zu einem Leukozytentrapping von etwa 80 - 90 % der applizierten PMN, welches im Verlauf weiter zunimmt (111, 123, 189). Hierbei kommt es durch die Adhäsion zu keiner histologisch und physiologisch fassbaren Lungenparenchymschädigung (123, 189). Im Gegensatz zu den humanen PMN lassen sich Kaninchen-PMN nur zu einem geringeren Prozentsatz separieren (123). Sie werden dabei stärker aktiviert (123). Wird Kaninchenvollblut verwendet und ins Perfusionssystem gegeben, so ist außerdem erst nach 60. Minuten eine Leukozytenadhäsion von ca. 90 % im pulmonalen Gefäßbett nachweisbar (123). Schließlich liegen derzeit nur wenig Daten zur Beschaffenheit und Wirkung der PMN-Elastase aus Kaninchen-PMN vor (53, 94).

Als Stimulus für die humanen PMN wurde humanes hitzeaggregiertes IgG verwendet, welches nach der Methode von Henson et al. (1972) hergestellt wurde: Aggregatbildung durch Hitzeeinwirkung führt ebenso wie Antigenbindung zu einer Konformationsänderung des IgG-Moleküls ohne Einbuße der biologischen Aktivität des Proteins, speziell des Fc-Stücks (220). Menschliche PMN besitzen Oberflächenrezeptoren, mit denen sie das Fc-Stück humaner Immunglobuline binden (129). Insofern stellt hitzeaggregiertes IgG genauso einen physiologischen in vivo Stimulus dar wie aktivierte Komplementkomponenten, Immunkomplexe oder Bakterienpeptide (99). Hierbei kommt es bei Fc-Rezeptor-Kontakt zwischen dem unlöslichen, aggregierten IgG und der PMN-Oberfläche zur Phagozytose des IgG und zur Bildung eines Phagosoms. Dieses verschmilzt mit den Lysosomen, die ihre Enzyme in das neugebildete Phagolysosom degranulieren. Fc-Rezeptor-Kontakt kann aber auch nur

ein Membransignal bewirken, das dazu führt, dass die PMN ihre lysosomalen Enzyme durch Exozytose nach extrazellulär freisetzen ("regurgitation during feeding") (66, 67, 68, 219). Dieses geschieht insbesondere, wenn es sich dabei um nicht phagozytierbare Komplexe handelt, z. B. bei Adhärenz an das Endothel und bei frustraner Phagozytose. Gleichzeitig wird der "respiratory burst" in Gang gesetzt (57). Dieser erschöpft sich 15 - 30 Minuten nach Stimulation der PMN durch aggregiertes IgG. Danach werden nur noch minimale Mengen an O<sub>2</sub>-Radikale gebildet (45, 57, 123). O<sub>2</sub>-Radikale wirken nur im Moment ihrer Freisetzung, so dass nach Ablauf des "respiratory burst" keine weitere Wirkung von ihnen zu erwarten ist (47). Im Vergleich zu anderen PMN-Stimuli wirkt hitzeaggregiertes IgG schwach aktivierend auf den "respiratory burst", aber mittelstark auf die Freisetzung von lysosomalen Enzymen (57, 194). Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden 160 mg humane hitzeaggregierte Immunglobuline pro Versuch in den Gruppen 2 - 6 verwendet. Martin (1987) konnte bei seinen Versuchen in vitro und in vivo eine starke Stimulation der humanen PMN mit dieser Menge nachweisen. Untersuchungen zur selektiven Stimulierbarkeit von Kaninchen-PMN durch humane hitzeaggregierte Immunglobuline und andere Substanzen liegen nicht vor. Allerdings führt in dem hier vorliegenden Tiermodell die alleinige Gabe von 160 mg hitzeaggregierten IgG nicht zu einem Anstieg des Lungengewichtes während fünf Stunden Versuchszeit (123).

Für die Erfassung der kapillären Flüssigkeitsextravasation in die Lunge wurde neben der Lungengewichtszunahme der kapilläre Filtrationskoeffizient nach der Methode von Drake et al. (1980) bestimmt. Dieser beschreibt das Verhältnis zwischen der Netto-Flüssigkeitsfiltration und dem Gleichgewicht von hydrostatischen und onkotischen Kräften an der kapillären Membran. Für normale Kaninchenlungen wurden in der Literatur folgende K<sub>fc</sub>-Werte beschrieben: 0,18 (145), 1,01 - 1,82 (183),

0,87 (118) und 1,0 (215) ml/min/mmHg/100 g. Ein entscheidender Grund für die unterschiedlichen Kfc-Werte in der Literatur scheint, neben der Vielzahl an verschiedenen Techniken und Methoden, die unterschiedliche Zusammensetzung des Perfusats zu sein. Hierbei wird dem Gehalt an Protein im Perfusat eine entscheidende Rolle beigemessen (100). Aufgrund der Tatsache, dass proteinfreie Perfusionslösungen zu bis zu 50 % erhöhten Kfc-Werten führen, wurde dem hier verwendeten Medium 4 g Albumin pro Liter Perfusat hinzugefügt. Bei der hier verwendeten Methode waren nicht nur die absoluten Kfc-Werte von Interesse. Vielmehr ging es bei dieser Versuchskonstellation auch um die zeitlichen Veränderungen der Filtrationskoeffizienten vor bzw. nach Ödeminduktion und CE-1037-Applikation. Daher wurde, um die einzelnen Reihen besser miteinander vergleichen zu können, die Differenz der Filtrationskoeffizienten ( $t = 15, 30, 60, 75, 90, 120 \text{ min}$ ) zum Ausgangswert ( $t = 0 \text{ min}$ ) gebildet (dKfc).

Zur Bestimmung der Elastasekonzentration im Perfusat diente ein von Neumann et al. (1984) entwickelter heterogener Enzymimmunoassay. Dieser weist je nach Elastasekonzentration innerhalb eines Testansatzes einen Variationskoeffizienten von 4 - 8 % und zwischen zwei Testansätzen einen von 3 - 8 % auf (144). Der von dem genannten Autor angegebene Normalwertbereich für die Elastasekonzentration im Plasma wurde aus 43 gesunden Menschen (3 weibliche und 40 männliche) im Alter von 47 - 65 Jahren ermittelt. Er reicht von 50 - 181  $\mu\text{g/l}$  und hat einen Mittelwert von 97,5  $\mu\text{g/l}$  mit einer Standardabweichung von 25,8  $\mu\text{g/l}$ . Messungen der Elastasekonzentration beim Tier wurden mit diesem Assay nicht durchgeführt.

In Abwesenheit von chemischen Substanzen konnte in Gruppe 1 (Kontrollgruppe) bei konstanten Versuchsbedingungen während 120 Minuten Versuchszeit kein signifikanter Hinweis auf die Entwicklung eines Lungenödems festgestellt werden:

In der Kontrollgruppe (Gruppe 1) nahm zwar das Gewicht bis zum Ende geringfügig zu, diese Zunahme war jedoch statistisch nicht signifikant.

Der kapilläre Filtrationskoeffizienten (dKfc) war nach ca. 75 Minuten Versuchszeit ebenfalls kaum angestiegen. Erst nach 90 Minuten stieg er geringfügig kontinuierlich an. Diese Beobachtung war jedoch nicht statistisch signifikant. Die durchschnittlichen Kfc-Werte lagen hierbei zwischen 0,3 und 0,58 ml/min/mmHg/100 g. Damit entsprachen sie den in der Literatur bereits beschriebenen Werten für normale Kaninchenlungen (118, 145, 183, 215).

Während 120 Minuten Versuchszeit zeigte die Kontrollgruppe (Gruppe 1) eine nahezu unveränderte Elastasekonzentration ohne einen signifikanten Anstieg. Die ermittelten Werte betragen dabei 17,85 - 21,67 µg/l. Da in der Kontrollgruppe weder humane PMN noch andere Substanzen appliziert wurden, ist denkbar, dass es sich bei der gemessenen Elastase um das entsprechende Enzym aus Kaninchenleukozyten im Kapillarbett der Lunge handeln könnte. Untersuchungen von Ermert et al. (1993 und 1994) zur Bestimmung und Charakterisierung der intrakapillären Leukozyten am Modell der isoliert ventilerten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge unterstützen diese Annahme. Die Kaninchen-PMN stellten dabei mit  $1,41 \times 10^9$  Zellen die größte Population der Leukozyten dar. Bei ihren Untersuchungen fiel die Zahl der Granulozyten nach einer Perfusionszeit von ca. 30 Minuten auf  $1,37 \times 10^9$  und nach ca. drei Stunden auf  $0,69 \times 10^9$  ab. Diese Werte spiegelten annähernd die zu vermutende Zahl an pulmonal intrakapillär sessilen Kaninchen-PMN bei den hier vorgestellten Versuchen wieder, berücksichtigt man zusätzlich die Steady-State Phase von 30 Minuten vor Versuchsbeginn. Allerdings gibt es bei Kaninchen-PMN kaum Angaben in der Literatur zur Menge und biochemischen Struktur lysosomaler Proteinasen. Kaninchen-Leukozyten haben zwar auch Serinproteasen mit Elastase-Aktivität, die durch den  $\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitor und die

synthetischen Inhibitoren der humanen Leukozyten-Elastase annähernd wie beim Menschen blockiert werden (53, 94). Normwerte für die Elastasekonzentration von Kaninchen-PMN in dem hier verwendeten Tiermodell und Messverfahren liegen jedoch nicht vor, so dass eine artifiziell gemessene Konzentration der Kaninchen-Elastase durchaus denkbar wäre. Ebenso könnte es sich um die Messung kreuzreagierender Stoffe des Kaninchens handeln. Es musste dennoch angenommen werden, dass eine kurzanhaltende Stimulation der intravasal in den Lungenkapillaren der Kaninchen festsitzenden PMN stattgefunden hatte, die zur Freisetzung von Elastase geführt hatte. Im Rahmen der Organentnahme kam es nämlich zu einer durch die Präparationstechnik unvermeidlichen Ischämiezeit von bis zu maximal 10 Minuten sowie zu einer geringfügigen Traumatisierung der Lungen. Aus in vitro Untersuchungen ist bekannt, dass nach einer Anoxie-Phase von 30 Minuten mit folgender Reoxygenation sowie nach Trauma eine Dysfunktion der mikrovaskulären Endothelzellen beobachtet wird, die bei Zugabe von PMN durch Elastase verstärkt wird (78, 79, 93). In vivo Versuche an der isoliert ventilierten und perfundierten Lunge zeigen nach einer Ischämiezeit von 60 Minuten und anschließender Reperfusion mit leukozytenfreiem Blut einen geringgradigen Anstieg des K<sub>fc</sub>, der sich durch einen Elastase-Inhibitor senken lässt (97).

Weitere Einflussfaktoren für die geringgradige Zunahme des Gewichtes und des dK<sub>fc</sub> könnten einzelne nicht-proteolytische Mediatoren, z. B. Leukotriene, gewesen sein. Sie werden auf verschiedene Stimuli wie etwa Hypoxie unterschiedlich stark ausgeschüttet bzw. gebildet (77, 162, 173, 186, 221). Im Zusammenhang mit der häufigen pulmonal-venösen Druck-Erhöhung zur Bestimmung des kapillären Filtrationskoeffizienten führen sie zu einem geringen Gewichtsanstieg (100). Ohne hydrostatische Belastung wird in der verwendeten Versuchsanordnung keine Gewichtseinlagerung über vier Stunden festgestellt (45, 123).

Letztlich scheint am vorliegenden Tiermodell unter den beschriebenen Bedingungen die Konzentration der genannten Mediatoren so niedrig zu sein, dass ihre biologische Wirksamkeit vernachlässigbar sein könnte (123).

In Gruppe 2 wurden die genannten Beobachtungen durch die zusätzliche Applikation eines Inhibitor-Cocktails bestehend aus Diclofenac, Cimetidin, Dimetinden und WEB 2086 (Inhibitoren der nicht-proteolytischen Mediatoren) sowie durch die Gabe von hitzeaggregierten Immunglobulinen nicht signifikant beeinflusst:

Der Verlauf der Gewichtsentwicklung, der Änderung des  $dK_{fc}$  und der Elastasekonzentration bei Zugabe von hitzeaggregierten IgG und eines Inhibitor-Cocktails (Gruppe 2) war nahezu identisch zur Gruppe ohne Substanzen-Applikation (Kontrollgruppe). Bei allen drei Variablen kam es zu keiner signifikanten Zunahme der Werte, auch nicht nach Gabe der Immunglobuline. Allerdings lagen das Lungengewicht und die Elastasekonzentration durchgehend etwas höher als in der Kontrolle (Gruppe 1). Die Werte des kapillären Filtrationskoeffizienten ( $dK_{fc}$ ) stiegen erst ab der 75. Minute höher an. Ein signifikanter Unterschied von Lungengewicht,  $dK_{fc}$  und Elastasekonzentration zwischen beiden Gruppen bestand nicht. Daher konnte der Schluss gezogen werden, dass die hitzeaggregierten Immunglobuline und die Substanzen des Cocktails keinen ödeminduzierenden Effekt hatten.

Im Gegenteil, aufgrund der Inhibitoren der nicht-proteolytischen Mediatoren wäre tendenziell eine geringere Gewichtseinlagerung als in der Kontrolle (Gruppe 1) zu erwarten gewesen. Eine Erklärung könnte sein, dass die Stimulation der Kaninchen-PMN eventuell etwas stärker war als in der Kontrollgruppe. Ein Hinweis hierfür war die vergleichsweise höhere Elastasekonzentration. Eine mangelnde Wirksamkeit des Cocktails schien jedoch aufgrund der anfangs diskutierten Punkte nicht ursächlich in Frage zu kommen. Lediglich Diclofenac könnte in der

vorliegenden Dosis von 2 mg nur unzureichend die Wirkung von Leukotrienen und anderen Lipoxygenaseprodukten gehemmt haben und damit zu einer leicht verstärkten Flüssigkeitseinlagerung beigetragen haben (100, 106).

Die geringen Veränderungen der untersuchten Variablen während der Versuchszeit, nachdem die Immunglobuline und der Inhibitor-Cocktail (Gruppe 2) injiziert worden waren, wurden folglich auf die gleichen Pathomechanismen wie in der Kontrollgruppe zurückgeführt.

Die Ergebnisse der Gruppe 3 zeigten keinen ödeminduzierenden Effekt durch die Applikation des Elastase-Inhibitors CE-1037 zusätzlich zum Inhibitor-Cocktail und zu den hitzeaggregierten IgG. Das Lungengewicht und der dKfc waren tendenziell niedriger als in der vorangegangenen Kontrollgruppe bzw. Gruppe mit Inhibitor-Cocktail und IgG alleine (Gruppe 1 und 2). Dies wurde als Hinweis auf die Hemmung der Elastase aus den Kaninchen-PMN und ihre pathophysiologische Bedeutung gewertet.

Fasst man die bisher diskutierten Punkte zusammen, so konnte der pathophysiologisch bedeutsame Einfluss der Mediatoren aus den drei klassischen Kaskadensystemen, der Arachidonsäure-Metaboliten, des PAF, des Histamins und der O<sub>2</sub>-Radikale auf die im Folgenden zu diskutierenden Ergebnisse weitgehend ausgeschlossen werden. Es war allerdings am vorliegenden Tiermodell eine methodenbedingte geringfügige nicht-progrediente Schrankenstörung im Bereich des pulmonalen Kapillarbetts zu erkennen. Diese könnte auf die in geringem Maße ausgeschüttete Elastase intravasal in den Lungenkapillaren festsitzender Kaninchen-PMN zurückgeführt werden. Für die Untersuchung der vorliegenden Fragestellung war dieser Befund von untergeordneter Bedeutung.

Die Resultate der Gruppe 4 zeigen, dass es trotz Anwesenheit des Inhibitor-Cocktails nach Stimulation der applizierten humanen

Granulozyten durch hitzeaggregiertes IgG zu einem deutlich ausgeprägten Lungenödem kam:

Dies wurde besonders an der ab der ca. 60. Minute signifikant starken kontinuierlichen Gewichtszunahme von bis zu 13,8 g nach 120 Minuten deutlich. Unter Berücksichtigung der erwähnten Aspekte kamen hierfür als Ursache in erster Linie granulozytäre Proteasen, vor allem Elastase, in Betracht (18, 20, 24, 85, 104, 170, 203).

Aus dem mehr als vierfachen Anstieg des Kfc-Wertes nach 120 Minuten (2,03 ml/min/mmHg/100 g) ließ sich erkennen, dass diese enorme Flüssigkeitsextravasation durch eine irreversible Schrankenschädigung hervorgerufen wurde. Die Beobachtung, dass der kapilläre Filtrationskoeffizient, besonders ab der 60. Minute, bis zu diesem Wert signifikant kontinuierlich zugenommen hatte, ließ weiterhin den Schluss zu, dass die Zerstörung der Schrankenfunktion progredient verlaufen war. Dies waren weitere Hinweise für die pathogenetische Bedeutung der Elastase. In Versuchen von Koch et al. (1992) konnte die ursächliche Beteiligung der Elastase an der irreversiblen Schrankenzerstörung des pulmonalen Gefäßbettes bereits bewiesen werden. Es zeigte sich nach Applikation einer bestimmten Elastasemenge ein mehr als fünffacher Anstieg des Kfc. Suttorp et al. (1993) konnten in vitro eine Erhöhung der Permeabilität pulmonaler Endothelzellen durch humane PMN-Elastase ebenfalls belegen.

Die starke Zunahme des Gewichtes und des kapillären Filtrationskoeffizienten nach 60 Minuten war gut vereinbar mit der ursächlichen Beteiligung der PMN-Proteasen, insbesondere der Elastase. In Übereinstimmung mit dieser Annahme sind die Ergebnisse von Martin (1987), Flick (1989) und Böhm (1993). Sie konnten zeigen, dass nach Applikation von in vitro vorstimulierten PMN bzw. gereinigter Elastase eine Gewichtszunahme der Lunge mit einer Latenz von 60 - 120 Minuten eintritt. Stimulation von PMN im Perfusat durch Phorbolster führte

hingegen zu einer sofortigen Ödembildung, die unter anderem auf die kombinierte Wirkung von Arachidonsäure-Produkten und O<sub>2</sub>-Radikalen zurückgeführt werden konnte (188).

Immunchemische Bestimmungen der Elastase bestärkten die genannten Hinweise. Sie zeigten nach Stimulation der Granulozyten durch hitzeaggregierte Immunglobuline eine signifikante Erhöhung der Elastasekonzentration im Perfusat im Vergleich zum Wert vor PMN-Stimulation. Die Zunahme der Elastasekonzentration während der Versuchszeit belegte desweiteren die Annahme, dass eine kontinuierlich steigende aber protrahierte Ausschüttung an Elastase von den Granulozyten ausging. Martin (1987) und Flick (1989) konnten in in vitro und in vivo Experimenten am gleichen Tiermodell ebenfalls einen Anstieg der Elastasekonzentration bis zur vierten Stunde nach Applikation von Ag-Ak-Komplexen nachweisen.

Im Vergleich zur Gruppe ohne zusätzliche Substanzen (Kontrolle) sowie zur Gruppe mit Inhibitor-Cocktail und IgG (Gruppe 2) wurden die vorliegenden Ergebnisse ebenfalls bestätigt: Es zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied ab der 30. Minute bei der Elastasekonzentration und ab der 60. Minute beim dKfc. Dies war ein Beleg für die ausgeprägte Stimulation der zusätzlich applizierten humanen PMN durch hitzeaggregierte Immunglobuline und der konsekutiven progredienten Schrankenstörung des pulmonalen Kapillarbettes.

Obwohl eine zunehmende Differenz zwischen dem jeweiligen Lungengewicht der beiden genannten Gruppen ohne humane PMN (Kontrolle und Gruppe 2) und dem der Gruppe mit stimulierten humanen PMN (Gruppe 4) beobachtet wurde, konnte in den 120 Minuten Versuchszeit kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Dieses könnte darin begründet liegen, dass die Ödemformation durch Elastase von der ausgeschütteten Menge und der Wirkdauer dieses Enzyms

abhängen (100). Bei längerer Versuchszeit lässt sich nämlich, wie die Untersuchungen von Martin (1987) und Flick (1989) gezeigt haben, ein signifikanter Unterschied erkennen. Sie wiesen am selben Tiermodell eine zunächst langsame, im weiteren Verlauf exponentielle Lungengewichtszunahme über vier Stunden Versuchszeit nach. Diese war jedoch erst in den letzten beiden Stunden signifikant.

Erstaunlicherweise wurde vor Stimulation der bereits applizierten humanen PMN (Gruppe 4) ein signifikanter Unterschied der Elastasekonzentration zur Kontrollgruppe (Gruppe 1) festgestellt. Bei der gemessenen Ausgangskonzentration an Elastase in Gruppe 4 musste es sich daher um die Summe aus Kaninchen-Elastase und menschlicher Elastase handeln. Erklärt werden konnte dieses durch das bereits beschriebene Zellseparationsverfahren, das zu einer leichten Stimulation der menschlichen PMN führt (45, 70, 113, 212). Man findet aber auch durchaus niedrige Konzentrationen an Elastase im Plasma gesunder normaler Menschen (2, 23, 60, 144). Der ermittelte signifikante Unterschied konnte folglich nur durch die unterschiedlich gemessene Ausgangskonzentration an Kaninchen-Elastase in den beiden Gruppen ohne humane PMN (Kontrolle und Gruppe 2) erklärt werden. Neben dem bereits erwähnten Problem der fehlenden Referenzwerte für Kaninchen-Elastase in dem hier verwendeten Modell kam erschwerend hinzu, dass keine standardisierten Normwerte für die Elastasekonzentration im Plasma des Menschen vorliegen (144). In der Literatur findet man diesbezüglich folgende Angaben für gesunde Erwachsene:  $98 \pm 26 \mu\text{g/l}$  (144),  $135 \pm 59 \mu\text{g/l}$  (144),  $25 \pm 6 \mu\text{g/l}$  (144),  $19 \pm 6 \mu\text{g/l}$  (23),  $33 \pm 12 \mu\text{g/l}$  (60) und  $17 - 49 \mu\text{g/l}$  (2). Dabei scheinen die Werte nicht nur in Abhängigkeit von der Messmethode, sondern auch vom Alter des Personenkollektivs zu stehen (2, 130, 144). Ältere Menschen haben höhere Elastase-Werte (2). Die Spender, die für die Versuche zur Verfügung standen, waren zwischen 20 und 30 Jahre alt, also deutlich

jünger als die Personen des Referenzkollektivs bei dem hier verwendeten Enzymimmunoassay (144). Im Rahmen der PMN-Separation wird außerdem eine Ausbeute von 60 - 80 % der im menschlichen Blut befindlichen Leukozyten erzielt, d. h. die Zahl der in den Versuchen verwendeten humanen PMN war niedriger als bei gesunden Menschen. Der experimentell erhobene Ausgangswert der Elastasekonzentration von 35,75 µg/l bei den Versuchen mit humanen PMN (Gruppe 4) war folglich aufgrund der aufgeführten Punkte nur bedingt mit in vivo erhobenen Werten des Menschen vergleichbar.

Etwa 120 Minuten nach Stimulation der Granulozyten (Gruppe 4) war die Elastasekonzentration signifikant auf 107,52 µg/l angestiegen, während sie bei den Versuchen ohne menschliche PMN (Gruppe 1 und 2) nahezu unverändert geblieben war, ein Hinweis auf die fehlende Stimulation der Kaninchen-PMN durch hitzeaggregierte Immunglobuline. Der in Gruppe 4 (Inhibitor-Cocktail, IgG und humane PMN) ermittelte Wert blieb unter der theoretisch höchstmöglichen Elastasekonzentrationen im Perfusat, die nach vollständiger Degranulation der humanen PMN mit Freisetzung des Enzyms zu erwarten wäre (148). Es musste daher in Erwägung gezogen werden, dass der Elastasegehalt der Zellen nicht vollständig ausgeschüttet wurde. Eine längere Versuchsdauer zeigt nämlich einen weiteren kontinuierlichen Anstieg der Elastasekonzentration (123). Außerdem weiß man aus immunhistochemischen Untersuchungen, dass Elastase am Wirkort gebunden bleibt und nur wenig zirkuliert (86). Nach Zugabe gereinigter humaner Elastase in das Perfusionsmedium der isolierten Kaninchenlunge werden 60 - 70 % des Enzyms wiederaufgefunden (123). Weder für die pulmonale Permeabilitätsstörung im verwendeten Tiermodell noch für das ARDS beim Menschen liegen standardisierte Referenzwerte der PMN-Elastase vor. Bei postoperativ und posttraumatisch intensivpflichtigen Patienten wurde bisher mit dem verwendeten Bestimmungsverfahren ein Diskriminationswert der PMN-

Elastase von 85 µg/l am 5. Tag zur Vorhersage von Komplikationen ab dem 6. Tag festgestellt (107). Redl et al. (1987) wiesen bei Krankenhauseinweisung eine Plasmakonzentration der PMN-Elastase von > 133 µg/l bei Patienten nach, die später ein ARDS entwickelten. Donnelly et al. (1995) fanden dagegen einen Medianwert von 217 µg/l bei einem ähnlichen Patientenkollektiv. Folglich war auch der in Gruppe 4 nach 120 Minuten experimentell erhobene Wert von 107,52 µg/l aus den genannten Punkten nur bedingt mit in vivo erhobenen Werten des Menschen vergleichbar.

Durch die zusätzliche Gabe des synthetischen Elastase-Inhibitors CE-1037 zum Inhibitor-Cocktail (Gruppe 5) konnte nach Stimulation der humanen PMN durch hitzeaggregierte Immunglobuline eine progrediente Störung der Schrankenfunktion und folglich auch Extravasation des Perfusats in die Lunge verhindert werden. Dieser Sachverhalt unterstützte weiter die bereits erwähnte Schlussfolgerung über die PMN-Elastase:

Ein Beleg hierfür war ein nahezu unverändertes Lungengewicht während der gesamten Versuchszeit. Die in den ersten 15 Minuten festgestellte geringe Zunahme mit anschließend signifikanter Abnahme des Gewichtes nach 60 Minuten wurde auf einen stark abgeschwächt verlaufenden "respiratory burst" zurückgeführt (57). Dieser erschöpft sich 15 - 30 Minuten nach Stimulation der PMN durch hitzeaggregiertes IgG. Zusätzlich könnte Diclofenac in der vorliegenden Dosis nur unzureichend die Wirkung von Leukotrienen und anderen Lipoxygenaseprodukten aus den humanen PMN gehemmt haben und damit zu einer leicht verstärkten reversiblen Flüssigkeitseinlagerung beigetragen haben (100, 106).

Der Kfc-Wert blieb während der 120 Minuten Versuchszeit konstant zwischen 0,21 und 0,39 ml/min/mmHg/100 g. Damit entsprach er den in der Literatur beschriebenen Werten für normale Kaninchenlungen. Daraus wurde geschlossen, dass keine progrediente Schädigung der pulmonalen Kapillaren stattgefunden hatte. Damit konnte die

pathogenetische Bedeutung der Elastase und die Wirksamkeit des Inhibitors CE-1037 weiter hervorgehoben werden.

Die Elastasekonzentration stieg ab der 30. Minute kontinuierlich an. Zum Versuchsende betrug sie 101,51 µg/l. Somit hatte auch hier eine bedeutsame Stimulation der humanen Granulozyten durch hitzeaggregiertes IgG stattgefunden. Die effektive Inhibition der Elastase durch CE-1037 wurde hierdurch noch einmal unterstrichen.

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen hatten in vitro Versuche von Kirschenheuter et al. (1993) die Effektivität dieses Inhibitors bezüglich der Elastase von PMN nachgewiesen. CE-1037 ist ein nicht-oxidierbares 2-Phenylisobutyrat von niedrigem Molekulargewicht, welches eine hohe Spezifität gegenüber der humanen PMN-Elastase besitzt (96). In vivo Versuche von Patton (1993) an Hamstern bestätigen die dargestellten Punkte. Nach intratrachealer Instillation von 50 µg gereinigter humaner PMN-Elastase kam es zu ausgeprägten pulmonalen Blutungen. Sie ließen sich sowohl nach intravenöser (i.v.) als auch nach intratrachealer (i.t.) Applikation von CE-1037 unterdrücken. Dabei kam es zu einer langsam reversiblen Hemmung der Elastase. Diese äußerte sich bei den Untersuchungen nach i.v. Applikation darin, dass der Inhibitor für mindestens sechs Stunden wirksam blieb, wenn er fünf Minuten vor Elastase-Gabe zugeführt wurde. Sogar 15 Minuten nach Elastase-Gabe konnte durch den Inhibitor ein Fortschreiten der proteolytischen Aktivität über mindestens eine Stunde verhindert werden. Die hierfür benötigte Dosis betrug 50 mg/KGw.

Im Vergleich dazu wurde am Modell der isoliert ventilierten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge eine Gesamtdosis von 4 mg/KGw CE-1037 verwendet und mit der Applikation 30 Minuten vor PMN-Stimulation begonnen. Hierbei wurde nach einer Bolus-Gabe von 1,35 mg/KGw kontinuierlich 1,11 mg/KGw/h zugeführt. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass eventuell hierdurch eine Einsparung

der Gesamtdosis erzielt werden könnte. Allerdings fiel bei den Versuchen mit CE-1037 (Gruppe 5) am Versuchsende eine signifikante Zunahme des dKfc auf. Unter Berücksichtigung der steigenden Elastasekonzentration war dieser Befund am ehesten durch eine fehlende Dosisanpassung von CE-1037 zu erklären.

Im Vergleich zur Kontrolle (Gruppe 1) und zu den Gruppen, die ohne bzw. mit stimulierten humanen PMN ausschließlich den Inhibitor-Cocktail erhalten hatten (Gruppe 2 und 4), wurden die bisher diskutierten Ergebnisse deutlich bestätigt: Nach Stimulation der humanen PMN ließ sich beim dKfc ab der 60. Minute, beim Gewicht zur 120. Minute ein hochsignifikanter Unterschied zwischen der Gruppe, die zusätzlich CE-1037 erhalten hatte (Gruppe 5), und der, die nur mit dem Inhibitor-Cocktail behandelt worden war (Gruppe 4), feststellen. Eine signifikante Differenz zwischen den Elastasekonzentrationen beider Gruppen bestand nicht, weder vor noch nach Stimulation der humanen PMN. Daraus wurde gefolgert, dass in beiden Versuchsreihen die PMN nach Applikation der hitzeaggregierten IgG in gleicher Stärke aktiviert worden waren und, dass CE-1037 in Gruppe 5 zu einer signifikanten Hemmung der gleichermaßen ausgeschütteten humanen PMN-Elastase geführt hatte.

Die zusätzliche Applikation des Elastase-Inhibitors zum Inhibitor-Cocktail führte dazu, dass, trotz stimulierter humaner PMN, Lungengewicht und dKfc nicht signifikant von den Werten der beiden Gruppen ohne humane PMN (Kontrolle und Gruppe 2) abwichen. Es deutete sich allerdings eine tendenziell geringere Flüssigkeitseinlagerung in Gruppe 5 (Inhibitor-Cocktail, CE-1037, PMN und IgG) an, erkennbar an der unterschiedlichen Lungengewichtsentwicklung während der Versuchszeit. Die Elastasekonzentration unterschied sich hingegen in Gruppe 5 ab der 30. Minute hochsignifikant von der Kontrolle (Gruppe 1) und der Gruppe mit Inhibitor-Cocktail und Immunglobulinen (Gruppe 2). Unter Berücksichtigung der oben genannten Aspekte war anzunehmen, dass es

hierbei zu einer zusätzlichen Inhibition der Kaninchen-Elastase durch CE-1037 gekommen war.

Im Gegensatz zur Gruppe ohne CE-1037 (Gruppe 4) zeigte sich in der Gruppe mit CE-1037 (Gruppe 5) vor Stimulation der humanen PMN keine signifikante Abweichung der Elastasekonzentration von den beiden Gruppen ohne humane PMN (Kontrolle und Gruppe 2). Damit wurde noch einmal der Vorzug der schonenden Zellseparationsweise nach Hjorth et al. (1981) unterstrichen. Bei alleiniger Gabe von humanen PMN, die nicht durch IgG stimuliert werden, wird ein ähnlicher Verlauf wie in den Gruppen ohne PMN (Kontrollgruppe, Gruppe 2 und Gruppe 3) gesehen (45). Eine signifikante allergische Reaktion von sessilen Kaninchen-Lymphozyten in der Lunge auf humane PMN oder eine in den einzelnen Gruppen signifikante unterschiedliche Stimulation der Kaninchen-PMN durch das Präparationsverfahren mit konsekutiver Aktivierung weiterer humoraler und zellulärer Kaskadensysteme des Kaninchens war somit aufgrund der vorliegenden Daten ebenfalls nicht anzunehmen.

Weiterführende Untersuchungen in Gruppe 6 deuteten eine Wirkung des Inhibitors CE-1037 an, die über die Hemmung der direkt lokalen proteolytischen Elastaseaktivität hinausgehen könnte. So ließ sich bei gleichen Versuchsbedingungen, jedoch ohne den Inhibitor-Cocktail (Diclofenac, Cimetidin, Dimetinden und WEB 2086), durch die alleinige Gabe des Elastase-Inhibitors CE-1037 nach Stimulation der humanen PMN ein Lungenödem verhindern:

Wie in Gruppe 5 mit Inhibitor-Cocktail und CE-1037 kam es auch hier nach 15 Minuten zu einem geringen kurzfristig reversiblen Gewichtsanstieg und dann zu einem isogravimetrischen Verlauf des Lungengewichtes als Hinweis auf die fehlende Flüssigkeitseinlagerung.

Die kapillären Filtrationskoeffizienten bewegten sich während der gesamten Versuchszeit zwischen 0,16 und 0,69 ml/min/mmHg/100 g, so dass vermutlich die Permeabilität der Lungenkapillaren nicht gestört war.

Die Änderung des Lungengewichtes und des dKfc bei alleiniger Gabe von CE-1037 (Gruppe 6) wies einen nahezu identischen Verlauf wie nach Applikation von CE-1037 und Inhibitor-Cocktail zusammen (Gruppe 5) auf.

Aus den bisher genannten Beobachtungen wurde geschlossen, dass auch hier eine deutliche Hemmung der von den humanen PMN stark ausgeschütteten Elastase stattgefunden hatte. Diese Inhibition schien auch die Kaninchen-Elastase mit einbezogen zu haben, eine Erklärung für das im Vergleich zu den beiden Gruppen ohne humane PMN und CE-1037 (Kontrolle und Gruppe 2) niedrigere Gewicht im Verlauf.

Zusammenfassend lässt sich bisher sagen, dass durch die Applikation humaner hitzeaggregierter Immunglobuline eine gezielt starke Stimulation der zuvor im pulmonalen Kapillarbett des Kaninchens sequestrierten humanen PMN erreicht werden konnte. Diese führte zu einer verzögert einsetzenden aber kontinuierlich zunehmenden Ausschüttung der humanen PMN-Elastase, die eine progrediente Permeabilitätsstörung des Mikrogefäßsystems der Kaninchen-Lunge zur Folge hatte und sich in einer protrahierten Lungengewichtszunahme äußerte. Durch die kontinuierliche intravasale Gabe des synthetischen Inhibitors der humanen PMN-Elastase CE-1037 ließ sich, bei Beginn der Applikation vor Stimulation der humanen PMN durch hitzeaggregierte Immunglobuline, ein Fortschreiten der proteolytischen Aktivität der ausgeschütteten Elastase und damit die Entstehung einer progredienten pulmonalen Permeabilitätsstörung verhindern. Dieses ließ sich auch ohne zusätzliche Inhibitoren von nicht-proteolytischen Faktoren (Cocktail), die ebenfalls die Permeabilität beeinflussen, erreichen. Die menschliche PMN-Elastase nimmt folglich eine zentrale Funktion in der Pathogenese der pulmonalen Permeabilitätsstörung ein. Sie hat, wie bereits von einigen Autoren beschrieben, multiple Funktionen (6, 207, 208). Ihre

Wirkung wird durch den synthetischen Inhibitor der humanen Elastase CE-1037 stark gehemmt.

*Schlussfolgerungen:* In dem vorliegenden Versuchsmodell der isoliert ventilerten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge ist ein nicht unbeträchtlicher Anteil an im pulmonalen Gefäßbett sessilen Kaninchen-Leukozyten vorhanden (39, 40). Diese haben in den durchgeführten Versuchen vermutlich kurzfristig eine geringe Menge an Elastase ausgeschüttet, die durch menschliches hitzeaggregiertes Immunglobulin der Klasse G nicht weiter gesteigert wurde. Hierdurch wurde eine geringe nicht-progrediente Schrankenstörung im Bereich des pulmonalen Kapillarbett hervorerufen, die sich durch die Applikation des synthetischen Inhibitors der humanen PMN-Elastase CE-1037 auch verhindern ließ. Die Untersuchung der vorliegenden Fragestellung wurde dadurch nicht eingeschränkt. Im Gegenteil, die folgenden Resultate wurden durch die genannten Punkte zusätzlich bestärkt:

Nach den vorliegenden Ergebnissen und in Übereinstimmung mit anderen Autoren führt PMN-Elastase zu einer verzögert einsetzenden Schädigung der pulmonal-kapillären Schrankenfunktion, die mit der Zeit und der Konzentration zunimmt. Der Elastase-Inhibitor CE-1037 bewirkt eine deutliche und anhaltende Unterdrückung der Elastaseaktivität in vivo. Diese Wirkung könnte sinnvoll in der Therapie von PMN-medierten entzündlichen Erkrankungen, insbesondere dem ARDS, genutzt werden. Beim ARDS steigt nämlich die Zahl der in der Lunge vorhandenen PMN von 3 % bei gesunden Menschen auf ca. 70 % an (150). Berücksichtigt man dabei die multiplen Funktionen der Elastase, so könnte mit CE-1037 neben der Destruktion von Lungenparenchym möglicherweise auch der Einfluss nicht-proteolytischer Mediatoren in- und außerhalb der klassischen Kaskadensysteme verhindert werden. Inzidenz, perpetuierende Inflammation sowie aggravierende Komplikationen dieses

Krankheitsgeschehens ließen sich somit verringern. Die Langzeitfolgen könnten verbessert werden. Die Hemmung eines solchen Schlüsselenzyms könnte aber auch beträchtliche unerwünschte Effekte haben. Weitere Studien werden daher benötigt, um die verschiedenen Funktionen der Elastase zu erfassen und die sich daraus eventuell ergebenden therapeutischen Konsequenzen beim Einsatz von CE-1037 in vivo einzuschätzen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Am Modell der isoliert ventilierten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge wurden die Auswirkungen des synthetischen Elastase-Inhibitors CE-1037 auf ein durch Granulozytenstimulation ausgelöstes Lungenödem untersucht.

Zur Beurteilung der Flüssigkeitsextravasation und der kapillären Permeabilität wurde das Lungengewicht über eine elektronische Waage, an der das Herz-Lungen-Präparat freihängend befestigt war, erfasst. Weiterhin wurden der pulmonal-arterielle und der pulmonal-venöse Druck mittels in den Perfusionskathetern befindlichen Druckaufnehmern registriert. Hieraus wurde der Filtrationskoeffizient (K<sub>fc</sub>) als Indikator für die kapilläre Permeabilität errechnet. Zusätzlich wurde die Elastasekonzentration im Perfusat als Maß für die Stimulation der Granulozyten (PMN) durch einen Enzymimmunoassay bestimmt.

Durch die Perfusion mit einer zell- und plasmafreien Krebs-Henseleit-Lösung und durch die Applikation von Diclofenac, WEB 2086, Cimetidin und Dimetinden ließ sich der Einfluss der drei klassischen humoralen Kaskadensysteme und anderer nicht-proteolytischer Mediatoren weitgehend vermeiden.

Unter dem fehlenden Einfluss dieser humoralen Mechanismen kam es nach Stimulation der applizierten humanen Granulozyten durch menschliches hitzeaggregiertes IgG ab etwa der 30. Minute zu einer kontinuierlichen druckunabhängigen Extravasation von Flüssigkeit, erkennbar an der konstanten Lungengewichtszunahme. Dieses wurde auf eine progrediente Störung der pulmonal-vaskulären Permeabilität

zurückgeführt, wie an dem mehr als vierfachen Anstieg des Kfc zu sehen war. Parallel dazu konnte ein Anstieg der Elastasekonzentration im Perfusat nachgewiesen werden.

Hingegen konnte mit dem Elastase-Inhibitor CE-1037 keine Lungengewichtszunahme, die auf eine Ödembildung hätte hinweisen können, registriert werden. Auch kam es zu keiner Kfc-Erhöhung, so dass man davon ausgehen konnte, dass die pulmonal-vaskuläre Schrankenfunktion intakt geblieben war. Dagegen verlief der Anstieg der Elastasekonzentration parallel zur Versuchsreihe ohne CE-1037. In weiteren Versuchen konnten mit der Applikation von CE-1037 sogar ohne Unterbindung des Einflusses von humoralen nicht-proteolytischen Mediatoren, vergleichbare Ergebnisse wie in der obigen Gruppe erzielt werden.

Die vorliegenden Resultate sprechen unter Einbeziehung der Beobachtungen anderer Autoren dafür, dass die humane PMN-Elastase eine progrediente Störung der pulmonal-vaskulären Schrankenfunktion verursacht. Sie nimmt eine zentrale Funktion in der Pathogenese der pulmonalen Permeabilitätsstörung ein. CE-1037 führt zu einer deutlichen Hemmung der PMN-Elastase und vermeidet dadurch eine Störung der pulmonalen Permeabilität. Somit ist CE-1037 ein auch in vivo sehr wirksamer Inhibitor der menschlichen Granulozyten-Elastase.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Anderson, R. R., Holliday, R. L., Driedger, A. A., Lefcoe, M., Reid, B., Sibbald, W. J.: "Documentation of Pulmonary Capillary Permeability in the Adult Respiratory Distress Syndrome Accompanying Human Sepsis". *Am. Rev. Respir. Dis.* 119, 1979, 869 - 877.
2. Antonsen, S., Wanscher, M.: "An ELISA for Elastase Alpha 1-Proteinase Inhibitor Complexes in Human Plasma and Serum". *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 53, 2, 1993, 145 - 153.
3. Ashbaugh, D. G., Bigelow, D. B., Petty, T. L., Levine, B. E.: "Acute Respiratory Distress in Adults". *Lancet.* 2, 1967, 319 - 323.
4. Bachofen, M., Weibel, E. R.: "Alterations of the Gas Exchange Apparatus in Adult Respiratory Insufficiency Associated with Septicemia". *Am. Rev. Respir. Dis.* 116, 1977, 589 - 615.
5. Baird, B. R., Cheronis, J. C., Sandhaus, R. A., Berger, E. M., White, C. W., Repine, J. E.: "O<sub>2</sub>-Metabolites and Neutrophil Elastase Synergistically Cause Edematous Injury in Isolated Rat Lungs". *J. Appl. Physiol.* 61, 1986, 2224 - 2229.
6. Bank, U., Ansorge, S.: "More than Destructive: Neutrophil-Derived Serine Proteases in Cytokine Bioactivity Control". *J. Leukoc. Biol.* 69, 2, 2001, 197 - 206.
7. Barman, S. A., Taylor, A. E.: "Histamine's Effect on Pulmonary Vascular Resistance and Compliance at Elevated Tone". *Am. J. Physiol.* 257 (*Heart Circ. Physiol.* 26), 1989, H 618 - H 625.
8. Belew, M., Gerdin, B., Porath, J., Saldeen, T.: "Isolation of Vasoactive Peptides from Human Fibrin and Fibrinogen Degraded by Plasmin". *Thromb. Res.* 13, 1978, 983 - 994.

9. Bevilacqua, M. P., Pober, J. S., Mendrick, D. L., Cotran, R. S., Gimbrone, M. A.: "Identification of an Inducible Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 1987, 9238 - 9242.
10. Björk, J., Hugli, T. E., Smedegard, G.: "Microvascular Effects of Anaphylatoxins C3a und C5a". *J. Immunol.* 134, 1985, 1115 - 1119.
11. Blondin, J., Aaron, J.: "The Role of Lysosomal Elastase in the Digestion of Escherichia coli Proteins by Human Polymorphnuclear Leucocytes". *J. Clin. Invest.* 58, 1976, 971 - 979.
12. Böhm, K.-D.: "Akute Veränderungen des pulmonalen Gefäßtonus und der Permeabilität durch stimulierte Granulozyten". Diss. Giessen, 1994.
13. Bonney, R. J., Smith, R. J.: "Evidence for the Role of Neutral Proteases in Chronic Inflammatory Diseases in Humans". *Adv. Inflamm. Res.* 11, 1986, 127.
14. Borgeat, P., Samuelsson, B.: "Metabolism of Arachidonic Acid in Polymorphnuclear Leukocytes". *J. Biol. Chem.* 254, 1979, 7865 - 7869.
15. Braquet, P., Paubert-Braquet, M., Vargaftig, B. B.: "Platelet Activating Factor, a Potential Mediator of Shock". *Adv. Prostagl. Thromboxane Leukotr. Res.* 17, 1987, 818 - 823.
16. Braude, S., Royston, D., Coe, C., Barnes, P. J.: "Histamine Increases Lung Permeability by an H<sub>2</sub>-Receptor Mechanism". *Lancet.* 2, 8399, 1984, 372 - 374.
17. Bray, M. A., Cunningham, F. M., Ford-Hutchinson, A. W., Smith, M. J. H.: "Leukotriene B<sub>4</sub>: A Mediator for Vascular Permeability". *Br. J. Pharmacol.* 72, 1981, 483 - 486.

18. Brigham, K. L.: "Pulmonary Edema: Cardiac and Noncardiac". *Am. J. Surg.* 138, 1979, 361 - 367.
19. Brigham, K. L., Meyrick, B.: "Interactions of Granulocytes with the Lungs". *Circ. Res.* 54, 1984, 623 - 635.
20. Brower, M. S., Harpel, P. C.: "Proteolytic Cleavage of  $\alpha_2$ -Plasmin Inhibitor and C<sub>1</sub> Inactivator by Human Polymorphnuclear Leukocyte Elastase". *J. Biol. Chem.* 257, 1982, 9849 - 9854.
21. Burchardi, H., Stokke, T., Hensel, I., Köstering, H., Rahlf, G., Schlag, G., Heine, H., Hörl, W. H.: "Adult Respiratory Distress Syndrome (ARDS): Experimental Models with Elastase and Thrombin Infusion in Pigs". *Adv. Exp. Med. Biol.* 167, 1984, 319 - 333.
22. Byrne, K., Sielaff, T. D., Carey, P. D., Tatum, J. L., Blocher, C. R., Vasquez, A., Hirsh, J. I., Sugerman, H. J.: "Ranitidine Compared to Cimetidine in Multiagent Pharmacological Treatment of Porcine Pseudomonas ARDS". *Circ. Shock.* 30, 2, 1990, 117 - 127.
23. Bzeizi, K. I., Jalan, R., MacGregor, I., Drummond, O., Lee, A., Hayes, P. C.: "Neutrophil Elastase: A Determinant of Endothelial Damage and Reperfusion Injury after Liver Transplantation ?". *Transplantation.* 62, 7, 1996, 916 - 920.
24. Campbell, E. J., Senior, R. M., McDonald, J. A., Cox, D. L.: "Relative Importance of Cell-Substrate Contact and Oxidative Inactivation of Proteinase Inhibitors in Vitro". *J. Clin. Invest.* 70, 1982, 845 - 852.
25. Casals-Stenzel, J., Franke, J., Friedrich, T., Lichey, J.: "Bronchial and Vascular Effects of PAF in the Rat Isolated Lung are Completely Blocked by WEB 2086, a Novel Specific PAF Antagonist". *Br. J. Pharmacol.* 91, 4, 1987, 799 - 802.

26. Casley-Smith, J. R., Window, J.: "Quantitative Morphological Correlations of Alterations in Capillary Permeability Following Histamine and Moderate Burning, in the Mouse Diaphragm; and the Effects of Benzopyrones". *Microvasc. Res.* 11, 1976, 279 - 305.
27. Chang, S. W., Feddersen, C. O., Henson, P. M., Völkel, N. F.: "Platelet-Activating Factor Mediates Hemodynamic Changes and Lung Injury in Endotoxin-Treated Rats". *J. Clin. Invest.* 79, 5, 1987, 1498 - 1509.
28. Chen, C. R., Völkel, N. F., Chang, S. W.: "Pulmonary Vascular Reactivity: Effect of PAF and PAF Antagonists". *J. Appl. Physiol.* 73, 5, 1992, 1762 - 1769.
29. Cochrane, C. G., Spragg, R., Revak, S. D.: "Pathogenesis of the Adult Respiratory Distress Syndrome - Evidence of Oxidant Activity in Bronchoalveolar Lavage Fluid". *J. Clin. Invest.* 71, 1983, 754 - 761.
30. Craddock, P. R., Fehr, J., Dalmaso, A. P., Brigham, K. L., Jacob, H. S.: "Hemodialysis Leukopenia: Pulmonary Vascular Leukostasis Resulting from Complement Activation by Dialyzer Cellophane Membranes". *J. Clin. Invest.* 59, 1977, 879 - 888.
31. Craddock, P. R., Hammerschmidt, D., White J. G., Dalmaso, A. P., Jacob, H. S.: "Complement (C5a)-Induced Granulocyte Aggregation in Vitro. A Possible Mechanism of Complement Mediated Leukostasis and Leukopenia". *J. Clin. Invest.* 60, 1977, 260 - 264.
32. Cusak, N. J.: "Platelet-Activating Factor". *Nature*, 285, 1980, 193 - 195.

33. Dahlen, S.-E., Björk, J., Hedquist, P., Arfors, K.-E., Hammarström, S., Lindgren, J.-A., Samuelsson, B.: "Leukotrienes Promote Plasma Leakage and Leukocyte Adhesion in Postcapillary Venules: In Vivo Effects with Relevance to the Acute Inflammatory Response". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 1981, 3887 - 3891.
34. Davidson, D., Singh, M., Wallace, G. F.: "Role of Leukotriene C<sub>4</sub> in Pulmonary Hypertension: Platelet-Activating Factor vs. Hypoxia". *J. Appl. Physiol.* 68, 4, 1990, 1628 - 1633.
35. Dittmer, H., Jochum, M., Fritz, H.: "Freisetzung von granulozytärer Elastase und Plasmaproteinveränderungen nach traumatisch-hämorrhagischem Schock". *Unfallchirurg.* 89, 1986, 160 - 169.
36. Donnelly, S. C., MacGregor, I., Zamani, A., Gordon, M. W., Robertson, C. E., Steedman, D. J., Little, K., Haslett, C.: "Plasma Elastase Levels and the Development of the Adult Respiratory Distress Syndrome". *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151, 5, 1995, 428 - 433.
37. Drake, R. E., Smith, J. H., Gabel, J. L.: "Estimation of the Filtration Coefficient in Intact Dog Lungs". *Am. J. Physiol.* 238 (*Heart Circ. Physiol.* 7), 1980, H 430 - H 438.
38. Englert, M. E., Landes, M. J., Birnbaum, J. E., Oronsky, A. L., Kerwar, S. S.: "Studies on a Leukocyte Elastase Inhibitor Present in the Culture Medium of Inflamed Synovial Tissue". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96, 1980, 498.
39. Ermert, L., Seeger, W., Duncker, H. R.: "Computer-Assisted Morphometry of the Intracapillary Leukocyte Pool in the Rabbit Lung". *Cell Tissue Res.* 271, 1993, 469 - 476.

40. Ermert, L., Duncker, H. R., Rosseau, S., Schütte, H., Seeger, W.:  
"Morphometric Analysis of Pulmonary Intracapillary Leukocyte Pools in Ex Vivo-Perfused Rabbit Lungs". *Am. J. Physiol.* 267, 1994, L 64 - L 70.
41. Evans, T. W., Dent, G., Rogers, D. F., Aursudkij, B., Chung, K. F., Barnes, P. J.: "Effect of a PAF Antagonist, WEB 2086, on Airway Microvascular Leakage in the Guinea-Pig and Platelet Aggregation in Man". *Br. J. Pharmacol.*, 94, 1, 1988, 164 - 168.
42. Farrukh, I. S., Michael, J. R., Summer, W. R., Adkinson, N. F., Gurtner, G. H.: "Thromboxane-Induced Pulmonary Vasoconstriction: Involvement of Calcium". *J. Appl. Physiol.* 58, 1985, 34 - 44.
43. Feinmark, S. J., Cannon, P. J.: "Endothelial Cell Leukotriene C<sub>4</sub> Synthesis Results from Intercellular Transfer of Leukotriene A<sub>4</sub> Synthesized by Polymorphnuclear Leukocytes". *J. Biol. Chem.* 261, 1986, 16466 - 16472.
44. Ferrante, A., Nandoskar, M., Walz, A., Goh, D. H. B., Kowanko, I. C.: "Effects of Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin-1 Alpha and Beta on Human Neutrophil Migration, Respiratory Burst and Degranulation". *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.* 86, 1988, 82 - 91.
45. Flick, K.: "Effekte stimulierter Granulozyten und granulozytärer Elastase in der pulmonalen Zirkulation. Untersuchungen am Modell der isolierten, ventilerten und perfundierten Kaninchenlunge". Diss. Giessen, 1989.
46. Fold, J. D., Prince, J., Spitznagel, J. K.: "Limited Cleavage of Human Immunoglobulins by Elastase of Human Neutrophil Polymorphnuclear Granulocytes". *Lab. Invest.* 39, 1978, 313 - 321.

47. Frank, L., Massaro, D.: "The Lung and Oxygen Toxicity". *Arch. Int. Med.* 139, 1979, 347 - 350.
48. Fritz, H., Jochum, M.: "Granulocyte Proteinases as Mediators of Unspecific Proteolysis in Inflammation: A Review". In: *Selected Topics in Clinical Enzymology*. 2. Ed., Berlin: de Gruyter, 1984, 305 - 327.
49. Gadek, J. E., Fells, G. A., Zimmerman, R. L., Rennard, S. I., Crystal, R. G.: "Antielastases of the Human Alveolar Structures. Implications for the Protease-Antiprotease Theory of Emphysema". *J. Clin. Invest.* 68, 1981, 889 - 898.
50. Gamble, J. R., Harlan, J. M., Klebanoff, S. J., Vadas, M. A.: "Stimulation of the Adherence of Neutrophils to Umbilical Vein Endothelium by Human Recombinant Tumor Necrosis Factor". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82, 1985, 8667 - 8671.
51. Garcia, J. G. N., Noonan, T. C., Jubiz, W., Malik, A. B.: "Leukotrienes and the Pulmonary Microcirculation". *Am. Rev. Resp. Dis.* 136, 1987, 161 - 169.
52. Garcia, R. C., Peterson, C. G. B., Segal, A. W., Venge, P.: "Elastase in the Different Primary Granules of the Human Neutrophil". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 132, 1985, 1130 - 1136.
53. Gardi, C., Calzoni, P., Cavarra, E., Pacini, A., Lungarella, G.: "An Elastolytic Proteinase from Rabbit Leukocytes: Purification and Partial Characterization". *Arch. Biochem. Biophys.* 290, 1991, 229 - 232.
54. Gay, J. C., Beckman, J. K., Brash, A. R., Oates, J. A., Lukens, J. N.: "Enhancement of Chemotactic Factor-Stimulated Neutrophil Oxidative Metabolism by Leukotriene B<sub>4</sub>". *Blood.* 64, 1984, 780 - 785.

55. Goeckenjan, G.: "Notfalldiagnostik bei akuter respiratorischer Insuffizienz". *Dtsch. Med. Wschr.* 111, 1986, 824 - 826.
56. Goldblum, S. E., Cohen, D. A., Gillespie M. N., McClain, C. J.: "Interleukin-1-Induced Granulocytopenia and Pulmonary Leukostasis in Rabbits". *J. Appl. Physiol.* 62, 1987, 122 - 128.
57. Goldstein, I. M., Roos, D., Kaplan, H. B., Weissmann, G.: "Complement and Immunoglobulins Stimulate Superoxide Production by Human Leukocytes Independently of Phagocytosis". *J. Clin. Invest.* 56, 1975, 1155 - 1163.
58. Gresele, P., Arnout, J., Coene, M. C., Deckmyn, H., Vermylen, J.: "Leukotriene B<sub>4</sub> Production by Stimulated Whole Blood: Studies with Isolated Polymorphnuclear Cells". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137, 1986, 334 - 342.
59. Haas, F., Bergofsky, E. H.: "Role of the Mast Cell in the Pulmonary Pressor Response to Hypoxia". *J. Clin. Invest.* 51, 1972, 3154 - 3162.
60. Hafner, G., Dreher, M., Lutgehaus, M., Ehrenthal, W., Heubner, A., Swars, H., Prellwitz, W.: "Determination of Human Granulocyte Elastase by the Immunoactivation Method on the Hitachi 717 Automated Analyser". *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 29, 3, 1991, 179 - 183.
61. Hakim, T. S., Michel, R. P., Chang, H. K.: "Partitioning of Pulmonary Vascular Resistance in Dogs by Arterial and Venous Occlusion". *J. Appl. Physiol.* 52, 1982, 710 - 715.
62. Havemann, K., Gramse, M.: "Physiology and Pathophysiology of Neutral Proteinases of Human Granulocytes". *Adv. Exp. Med. Biol.* 167, 1984, 1 - 20.

63. Heck, L. W., Darby, W. L., Hunter, F. A., Bhowm, A., Miller, E. J., Bennett, J. C.: "Isolation, Characterization, and Amino-Terminal Amino Acid Sequence Analysis of Human Neutrophil Elastase from Normal Donors". *Anal. Biochem.* 149, 1985, 153 - 162.
64. Heideman, M., Kaijser, B., Gelin, L.-E.: "Complement Activation Early in Endotoxin Shock". *J. Surg. Res.* 26, 1979, 74 - 78.
65. Heine, H.: "Proteases - Proteases Inhibitors: A Local Cellular Information System". *Adv. Exp. Med. Biol.* 167, 1984, 121 - 127.
66. Henson, P. M.: "The Immunologic Release of Constituents from Neutrophil Leukocytes. II. Mechanisms of Release during Phagocytosis, and Adherence to Non Phagocytosable Surfaces". *J. Immunol.* 107, 1971, 1547 - 1557.
67. Henson, P. M.: "Pathologic Mechanisms in Neutrophil-Mediated Injury". *Am. J. Pathol.* 68, 1972, 593 - 612.
68. Henson, P. M., Johnson, H. B., Spiegelberg, H. L.: "The Release of Granule Enzymes from Human Neutrophils Stimulated by Aggregated Immunoglobulins of Different Classes and Subclasses". *J. Immunol.* 109, 6, 1972, 1182 - 1192.
69. Heuer, H., Casals-Stenzel, J.: "The Pathophysiological Role of PAF in Anaphylactic Lung Reaction in the Guinea Pig and in Endotoxin Shock Evidenced by the Specific PAF-Antagonist WEB 2086". *Prog. Clin. Biol. Res.* 308, 1989, 925 - 930.
70. Hjorth, R., Jonson, A.-K., Vretbald, P. A.: "Rapid Method of Purification of Human Granulocytes Using Percoll. A Comparison with Dextran Sedimentation". *J. Immunol. Meth.* 43, 1981, 95 - 101.

71. Hochstraße, K., Schuster, R., Reichert, R., Heimbürger, N.: "Nachweis und quantitative Bestimmung von Komplexen zwischen Leukozytenproteasen und  $\alpha_1$ -Antitrypsin in Körpersekreten und Körperflüssigkeiten". *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 353, 1972, 1120 - 1124.
72. Huang, Y. C., Kennedy, T. P., Su, Y. F., Watkins, W. D., Whorton, A. R., Piantadosi, C. A.: "Protection Against Platelet-Activating Factor-Induced Injury by Interferon Inducer in Perfused Rabbit Lung". *J. Appl. Physiol.* 74, 1, 1993, 251 - 258.
73. Huang, Y. C., Nozik, E. S., Piantadosi, C. A.: "Superoxide Dismutase Potentiates Platelet-Activating Factor-Induced Injury in Perfused Lung". *Am. J. Physiol.* 266, 3 Pt. 1, 1994, L 246 - L 254.
74. Hudson, L. D.: "Causes of the Adult Respiratory Distress Syndrome - Clinical Recognition". *Clin. Chest. Med.* 3, 1982, 895 - 903.
75. Hwang, S. B., Lam, M. H., Shen, T. Y.: "Specific Binding Sites for Platelet Activating Factor in Human Lung Tissues". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128, 2, 1985, 972 - 979.
76. Hyman, A. L.: "The Direct Effects of Vasoactive Agents on Pulmonary Veins. Studies of Responses to Acetylcholine, Serotonin, Histamine, and Isoproterenol in Intact Dogs". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 168, 1969, 96 - 105.
77. Ibe, B. O., Raj, J. U.: "Metabolism of Endogenous Arachidonic Acid by Isolated Lungs of Neonatal and Adult Rabbits Stimulated with Calcium Ionophore: Effect of Hypoxia". *Exp. Lung Res.* 18, 1, 1992, 69 - 85.
78. Inauen, W., Granger, D. N., Meininger, C. J., Schelling, M. E., Granger, H. J., Kvietys P. R.: "Anoxia-Reoxygenation-Induced, Neutrophil-Mediated Endothelial Cell Injury: Role of Elastase". *Am. J. Physiol.* 259, 1990, H 925 - H 931.

79. Inauen, W., Payne, D. K., Kvietys, P. R., Granger, D. N.: "Hypoxia / Reoxygenation Increases the Permeability of Endothelial Cell Monolayers: Role of Oxygen Radicals". *Free Radic. Biol. Med.* 9, 3, 1990, 219 - 223.
80. Isakson, P. C., Raz, A., Denny, S. E., Wyche, A., Needleman, P.: "Hormonal Stimulation of Arachidonate Release from Isolated Perfused Organs". *Prostaglandins*. 14, 1977, 853 - 871.
81. Jacob, H. S.: "Role of Complement and Granulocytes in Septic Shock". *Acta Chir. Scand.* 499, 1980, 97 - 106.
82. Janoff, A.: "Human Granulocyte Elastase. Further Delineation of its Role in Connective Tissue Damage". *Am. J. Path.* 68, 1972, 579 - 591.
83. Janoff, A.: "Elastase and Emphysema - Current Assessment of the Protease-Antiprotease Hypothesis". *Am Rev. Respir. Dis.* 132, 1985 a, 417.
84. Janoff, A.: "Elastase in Tissue Injury". *Ann. Rev. Med.* 36, 1985 b, 207.
85. Janoff, A., Scherer, J.: "Mediators of Inflammation in Leukocyte Lysosomes. IX. Elastolytic Activity in Granules of Human Polymorphnuclear Leukocytes". *J. Exp. Med.* 128, 1968, 1137 - 1155.
86. Janoff, A., Sloan, B., Weinbaum, G., Damiano, V., Sandhaus, R. A., Elias, J., Kimbel, P.: "Experimental Emphysema Induced with Purified Human Neutrophil Elastase: Tissue Localization of the Instilled Proteases". *Am. Rev. Respir. Dis.* 115, 1977, 461 - 478.
87. Janoff, A., White, R., Carp, H., Harel, S., Dearing, R., Lee, D.: "Lung Injury Induced by Leukocytic Proteases". *Am. J. Path.* 97, 1979, 111 - 136.
88. Jochum, M.: Vortrag, 1994.

89. Jochum, M., Duswald, K. H., Neumann, S., Witte, J., Fritz, H.: "Proteinases and their Inhibitors in Septicemia - Basic Concepts and Clinical Implications". In: Hörl, W. H., Heidland, A. (Eds.): *Proteases*. Plenum Publishing Corporation, 1984, 391 - 404.
90. Jochum, M., Witte, J., Duswald, K.-H., Inthorn, D., Welter, H., Fritz, H.: "Pathobiochemistry of Sepsis: Role of Proteinases, Proteinase Inhibitors and Oxidizing Agents ". *Behring Inst. Mitt.* 79, 1986, 121 - 130.
91. Johnson, P. R., Armour, C. L., Black, J. L.: "The Action of Platelet Activating Factor and its Antagonism by WEB 2086 on Human Isolated Airways". *Eur. Respir. J.* 3, 1, 1990, 55 - 60.
92. Johnson, U., Ohlsson, K., Olsson, I.: "Effects of Granulocyte Neutral Proteases on Complement Components". *Scand. J. Immunol.* 5, 1976, 421 - 426.
93. Jonas, E., Dwenger, A., Tscherne, H.: "Investigation of Neutrophil-Endothelial Cell Interaction in Multiple Trauma by Chemiluminescence". *J. Biolumin. Chemilumin.* 11, 4 - 5, 1996, 223 - 229.
94. Kawabata, K., Suzuki, M., Sugitani, M., Imaki, K., Toda, M., Miyamoto, T.: "ONO-5046, a Novel Inhibitor of Human Neutrophil Elastase". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 177, 1991, 814 - 820.
95. Kay, J. M., Waymire, J. C., Grover, R. F.: "Lung Mast Cell Hyperplasia and Pulmonary Histamine Forming Capacity in Hypoxic Rats". *Am. J. Physiol.* 226, 1974, 178 - 184.

96. Kirschenheuter, G. P., Oleksyszyn, J., Spruce, L. W., Wieczorek, M., Kloppel, T. M., Sanford, R. S., Cheronis, J. C.: "Synthesis and Characterization of Human Neutrophil Elastase Inhibitors Derived from Aromatic Esters of Phenylalkanoic Acids". In: *Proteases, Protease Inhibitors and Protease-Derived Peptides*. Basel: Birkhäuser Verlag, 1993, 71 - 82.
97. Kishima, H., Takeda, S., Miyoshi, S., Matsumura, A., Minami, M., Utsumi, T., Omori, K., Nakahara, K., Matsuda, H.: "Microvascular Permeability of the Non-Heart-Beating Rabbit Lung after Warm Ischemia and Reperfusion: Role of Neutrophil Elastase". *Ann. Thorac. Surg.* 65, 4, 1998, 913 - 918.
98. Klausner, J. M., Kobzik, L., Valeri, C. R., Shepro, D., Hechtman, H. B.: "Selective Lung Leukosequestration after Complement Activation". *J. Appl. Physiol.* 65, 1988, 80 - 88.
99. Klebanoff, S. J.: "Oxygen Metabolism and the Toxic Properties of Phagocytes". *Ann. Int. Med.* 93, 1980, 480 - 489.
100. Koch, T., Duncker, H. P., Rosenkranz, S., Neuhof, H., van Ackern, K.: "Alterations of Filtration Coefficients in Pulmonary Edema of Different Pathogenesis". *J. Appl. Physiol.* 73, 6, 1992, 2396 - 2402.
101. Koch, T., Duncker, H. P., Heller, A., Schaible, R., van Ackern, K., Neuhof, H.: "Effects of Stroma-Free Hemoglobin Solutions on Pulmonary Vascular Resistance and Mediator Release in the Isolated Perfused Rabbit Lung". *Shock.* 1, 2, 1994, 146 - 152.
102. Korth, R., Hirafuji, M., Keraly, C. L., Delautier, D., Bidault, J., Benveniste, J.: "Interaction of the PAF Antagonist WEB 2086 and its Hetrazepine Analogues with Human Platelets and Endothelial Cells". *Br. J. Pharmacol.* 98, 2, 1989, 653 - 661.

103. Korthuis, R. J., Wang, C. Y., Spielman, W. S.: "Transient Effects of Histamine on the Capillary Filtration Coefficient". *Microvasc. Res.*, 28, 1984, 322 - 344.
104. Kramps, J. A., Twisk, C. van, Linden, A. C. van der: "L-Pyroglutamyl-L-Prolyl-L-Valine-P-Nitroanilide, a Highly Specific Substrate for Granulocyte Elastase". *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 43, 1983, 427 - 432.
105. Krögel, C., Yukawa, T., Dent, G., Venge, P., Chung, K. F., Barnes, P. J.: "Stimulation of Degranulation from Human Eosinophils by Platelet-Activating Factor". *J. Immunol.* 142, 10, 1989, 3518 - 3526.
106. Ku, E. C., Lee, W., Ktohari, H. V., Scholer, D. W.: "Effect of Diclofenac Sodium on the Arachidonic Acid Cascade". *Am. J. Med.* 28, 80 (4B), 1986, 18 - 23.
107. Lang, H., Jochum, M., Fritz, H., Redl, H.: "Validity of the Elastase Assay in Intensive Care Medicine". In: Schlag, G., Redl, H. (Eds.): *Second Vienna Schock Forum*. New York: Alan R. Liss, 1989, 701 - 706.
108. Le, J., Vilcek, J.: "Biology of Disease. Tumor Necrosis Factor and Interleukin 1: Cytokines with Multiple Overlapping Biological Activities". *Lab. Invest.* 56, 1987, 234 - 248.
109. Lee, C. W., Jung, W., Lewis, R. A., Hales, C. A.: "LTB<sub>4</sub> Mediated Hypoxemia in Guinea Pigs: Relationship to Pulmonary and Cardiovascular Pathophysiology". *Prostaglandins.* 33, 1987, 3 - 16.
110. Legrand, Y., Caen, J., Robert, L.: "Substrate Specificity of Leukocyte and Platelet Elastases". *Thrombos. Haemostas.* 39, 1978, 785 - 796.

111. Lien, D. C., Wagner, W. W., Capen, R. L., Haslett, C., Hanson, W. L., Hofmeister, S. E., Henson, P. M., Worthen, G. S.: "Physiological Neutrophil Sequestration in the Lung: Visual Evidence for Localization in Capillaries". *J. Appl. Physiol.* 62, 3, 1987, 1236 - 1243.
112. Liles, W. C., Meier, K. E., Henderson, W. R.: "Phorbol Myristate Acetate and the Calcium Ionophore A23187 Synergistically Induce Release of LTB<sub>4</sub> by Human Neutrophils: Involvement of Protein Kinase C Activation in Regulation of the 5-Lipoxygenase Pathway". *J. Immunology.* 138, 1987, 3396 - 3402.
113. Lindena, J., Sommerfeld, U., Höpfel, C., Wolkersdorfer, R. Trautschold, I.: "Enzyme Activities in Blood Cells of Man and Dogs after Separation on a Discontinuous Percoll Gradient". *Enzyme.* 29, 1983, 100 - 108.
114. Linehan, J. H., Dawson, C. A., Rickaby, D. A.: "Distribution of Vascular Resistance and Compliance in a Dog Lung Lobe". *J. Appl. Physiol.* 53, 1982, 158 - 168.
115. Lohman, I. C., Halonen, M.: "The Effects of Combined Histamine and Platelet-Activating Factor Antagonism on Systemic Anaphylaxis Induced by Immunoglobulin E in the Rabbit". *Am. Rev. Respir. Dis.* 147, 5, 1993, 1223 - 1228.
116. Lotner, G. Z., Lynch, J. M., Betz, S. F., Henson, P. M.: "Human Neutrophil Derived Platelet Activating Factor". *J. Immunol.* 124, 1980, 676 - 680.
117. Lynch, J. M., Lotner, G. Z., Betz, S. J., Henson, P. M.: "The Release of a Platelet Activating Factor by Stimulated Rabbit Neutrophils". *J. Immunol.* 123, 1979, 1219 - 1223.

118. Magno, M., Atkinson, B., Katz, A., Fishman, A. P.: "Estimation of Pulmonary Interstitial Fluid Space Compliance in Isolated Perfused Rabbit Lung". *J. Appl. Physiol.* 48, 1980, 677 - 683.
119. Mainardi, C. L., Dixit, S. N., Kang, A. H.: "Degradation of Type IV (Basement Membrane) Collagen by a Proteinase Isolated from Human Polymorphonuclear Leukocyte Granules". *J. Biol. Chem.* 255, 1980, 5435 - 5441.
120. Majno, G., Palade, G. E.: "Studies on Inflammation. I. The Effect of Histamine and Serotonin on Vascular Permeability: An Electron Microscopic Study". *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 11, 1961, 571 - 606.
121. Malik, A. B., Perlman, M. B., Cooper, J. A., Noonan, T., Bizios, R.: "Pulmonary Microvascular Effects of Arachidonic Acid Metabolites and their Role in Lung Vascular Injury". *Fed. Proc.* 44, 1985, 36 - 42.
122. Manwaring, D., Curreri, P. W.: "Platelet and Neutrophil Sequestration after Fragment D-Induced Respiratory Distress". *Circ. Shock.* 9, 1982, 74 - 80.
123. Martin, U.: "Experimentelle Untersuchungen zum Einfluß freigesetzter Granulozytenproteasen auf die pulmonal-vaskuläre Permeabilität". Diss. Giessen, 1987.
124. Martin, W. J., Taylor, J. C.: "Abnormal Interaction of  $\alpha_1$ -Antitrypsin and Leukocyte Elastolytic Activity in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease". *Am. Rev. Respir. Dis.* 120, 1979, 411 - 419.
125. Matsumoto, K., Taki, F., Kondoh, Y., Taniguchi, H., Takagi, K.: "Platelet-Activating Factor in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Patients with Adult Respiratory Distress Syndrome". *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 19, 7, 1992, 509 - 515.

126. McColl, S. R., Hurst, N. P., Cleland, L. G.: "Modulation by Phorbol Myristate Acetate of Arachidonic Acid Release and Leukotriene Synthesis by Human Polymorphonuclear Leukocytes Stimulated with A23187". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141, 1986, 399 - 404.
127. McCormack, D. G., Barnes, P. J., Evans, T. W.: "Platelet-Activating Factor: Evidence Against a Role in Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction". *Crit. Care Med.* 18, 12, 1990, 1398 - 1402.
128. McGuire, W. W., Spragg, R. G., Cohen, A. B., Cochrane, C. G.: "Studies on the Pathogenesis of the Adult Respiratory Distress Syndrome". *J. Clin. Invest.* 69, 1982, 543 - 553.
129. Messner, R. P., Jelinek, J.: "Receptors for Human  $\gamma$ G-Globulin on Human Neutrophils". *J. Clin. Invest.* 49, 1970, 2165 - 2171.
130. Meyer, K. C., Rosenthal, N. S., Soergel, P., Peterson, K.: "Neutrophils and Low-Grade Inflammation in the Seemingly Normal Aging Human Lung". *Mech. Ageing Dev.* 104, 2, 1998, 169 - 181.
131. Mittermeyer, Ch., Ostendorf, P., Riede, U. N.: "Pathologisch-anatomische Untersuchungen bei der respiratorischen Insuffizienz durch Schock. I. Lichtmikroskopische und biochemische Analyse". *Intensivmed.* 14, 1977, 252 - 262.
132. Movat, H. Z., Cybulsky, M. I., Colditz, I. G., Chan, M. K. W., Dinarello, C. A.: "Acute Inflammation in Gram-Negative Infection: Endotoxin, Interleukin 1, Tumor Necrosis Factor, and Neutrophils". *Fed. Proc.* 46, 1987, 97 - 104.
133. Nadeau, M., Fruteau de Laclos, B., Picard, S.: "Studies on Leukotriene B<sub>4</sub> Omega-Oxidation in Human Leukocytes". *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 62, 1984, 1321 - 1326.
134. Nathan, C. F.: "Secretory Products of Macrophages". *J. Clin. Invest.* 79, 1987, 319 - 326.

135. Neuhof, H.: "Role of Proteinases in the Pathophysiology of Organ Failure". *First Wiggers-Bernard Conference on Shock, Sepsis and Organ Failure*. Schloß Fuschl, Austria, 1989.
136. Neuhof, H.: "Actions and Interactions of Mediator Systems and Mediators in the Pathogenesis of ARDS and Multiorgan Failure". *Acta Anaesthesiol. Scand.* 35, Supplementum 95, 1991, 7 - 14.
137. Neuhof, H., Seeger, W., Roka, H. W. L., Lasch, H. G.: "Verbrauchskoagulopathie und Lungenfunktion". *Internist* 23, 1982, 457 - 462.
138. Neuhof, H., Lasch, H. G.: "Interactions between Intravascular Coagulation and Tissue Perfusion". *Clin. Hemorheol.* 4, 1984, 5 - 13.
139. Neuhof, H., Noack, A., Hoffmann Ch., Seeger, W.: "Thromboxane-Mediated Pulmonary Vasoconstriction in Rabbits Induced by Acute Alveolar Hypoxia". In: Schrör, C. (Eds.): *Prostaglandins and other Eicosanoids in the Cardiovascular System*. Basel: Karger, 1985, 328 - 334.
140. Neuhof, H., Seeger, W., Wolf, H. R. D.: "Generation of Mediators by Limited Proteolysis during Blood Coagulation and Fibrinolysis - its Pathogenetic Role in the Adult Respiratory Distress Syndrome (ARDS)". *Resuscitation.* 14, 1986, 23 - 32.
141. Neuhof, H., Seeger, W., Suttrop, N.: "Activation of the Pulmonary Arachidonic Acid System and its Consequences for Hemodynamics and Fluid Balance". In: Schlag, G., Redl, H. (Eds.): *First Vienna Shock Forum: Pathophysiological Role of Mediators and Mediator Inhibitors in Shock*. New York: Alan R. Liss, 1987, 289 - 300.

142. Neuhof, H., Hoffmann, Ch., Seeger, W., Suttorp, N., Fritz, H.: "Proteases as Mediators of Pulmonary Vascular Permeability". In: Schlag, G., Redl, H. (Eds.): *Second Vienna Shock Forum*. New York: Alan R. Liss, 1989, 305 - 314.
143. Neuhof, H., Fritz, H.: "Proteinases as Mediators of the Disturbance of Pulmonary Vascular Permeability in Sepsis, Polytrauma and ARDS". In: Rügheimer, E. (Ed.): *New Aspects on Respiratory Failure*. Berlin: Springer, 1989, 67 - 74.
144. Neumann, S., Gunzer, G., Hennrich, N., Lang, H.: "PMN Elastase Assay: Enzyme Immunoassay for Human Polymorphnuclear Elastase Complexed with  $\alpha_1$ -Proteinase Inhibitor". *J. Clin. Chem. Biochem.* 22, 10, 1984, 693 - 697.
145. Nicolaysen, G.: "Increase in Capillary Filtration Rate Resulting from Reduction in the Intravascular Calcium Ion Concentration". *Acta. Physiol. Scand.* 81, 1971, 517 - 527.
146. Ohlsson, K., Olsson, I.: "Neutral Proteases of Human Granulocytes: III. Interaction between Human Granulocyte Elastase and Plasma Protease Inhibitors". *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 34, 1974, 349 - 355.
147. Ohlsson, K., Delshammer, M.: "Interactions between Granulocyte Elastase and Collagenase and the Plasma Proteinase Inhibitors in Vitro and in Vivo". In: Burleigh, P. M. C., Poole, A. R. (Eds.): *Dynamics of Connective Tissue Macromolecules*. North-Holland Publishing Company, 1975.
148. Ohlsson, K., Olsson, A.-S.: "Immunoreactive Granulocyte Elastase in Human Serum". *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 359, 1978, 1531 - 1539.

149. Palmblad, J., Malmsten, C. L., Uden, A.-M., Radmark, O., Engsted, L., Samuelsson, B.: "Leukotriene B<sub>4</sub> is a Potent and Stereospecific Stimulator of Neutrophil Chemotaxis and Adherence". *Blood*. 58, 1981, 658 - 662.
150. Patton, L. M.: "In Vivo Evaluation of MDL 201, 404 YA, a Novel Inhibitor of Human Neutrophil Elastase". In: *Proteases, Protease Inhibitors and Protease-Derived Peptides*. Basel: Birkhäuser Verlag, 1993, 83 - 96.
151. Pedersen, K. E., Rigby, P. J., Goldie, R. G.: "Quantitative Assessment of Increased Airway Microvascular Permeability to 125I-Labelled Plasma Fibrinogen Induced by Platelet Activating Factor and Bradykinin". *Br. J. Pharmacol.* 104, 1, 1991, 128 - 132.
152. Peter, K., Beyer, A.: "Akute respiratorische Insuffizienz". *Internist*. 21, 1980, 4 - 10.
153. Pison, U., Falke, K.: "Pathogenese und Diagnostik des akuten Lungenversagens". *Dtsch. Med. Wschr.* 116, 1991, 1599 - 1602.
154. Pober, J. S., Bevilacqua, M. P., Mendrick, D. L., Lapierre, L. A., Fiers, W., Gimbrone, M. A. Jr.: "Two Distinct Monokines, Interleukin 1 and Tumor Necrosis Factor, each Independently Induces Biosynthesis and Transient Expression of the Same Antigen on the Surface of Cultured Human Vascular Endothelial Cells". *J. Immunol.* 136, 1986, 1680 - 1687.
155. Pretolani, M., Lefort, J., Malanchere, E., Vargaftig, B. B.: "Interference by the Novel PAF-Acether Antagonist WEB 2086 with the Bronchopulmonary Responses to PAF-Acether and to Active and Passive Anaphylactic Shock in Guinea-Pigs". *Eur. J. Pharmacol.* 21, 140, 3, 1987, 311 - 321.

156. Redl, H., Paul, E., Goris, R. J. A., Pacher, R., Woloszczuk, W., Schlag, G.: "Plasma Levels of Elastase  $\alpha_1$ -Protease Inhibitor Komplex in the Monitoring of ARDS and Multi-Organ Failure - a Summary of Three Clinical Trials". *2nd Int. Congr. On Proteases*, 1987.
157. Riede, U. N., Mittermeyer, Ch., Hassenstein, J., Bensing, K., Sandritter, W.: "Pathologisch-anatomische Untersuchungen bei der respiratorischen Insuffizienz durch Schock. II. Ultrastrukturell-morphometrische Befunde". *Intensivmed.* 14, 1977, 263 - 273.
158. Riede, U.-N., Costabel, U.: *Allgemeine und spezielle Pathologie: Respiratorisches System* / Riede, U.-N., Schäfer, H.-E., Wehner, H. 2., neu bearbeitete Aufl.. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verl., 1989.
159. Rippe, B., Allison, R. C., Parker, J. C., Taylor, A. E.: "Effects of Histamine, Serotonin, and Norepinephrine on Circulation of Dog Lungs". *J. Appl. Physiol.* 57, 1984, 223 - 232.
160. Rippe, B., Parker, J. C., Townsley, M. I., Mortillaro, N. A., Taylor, A. E.: "Segmental Vascular Resistances and Compliances in Dog Lung". *J. Appl. Physiol.* 62, 1987, 1206 - 1215.
161. Rowley, D. A.: "Venous Constriction as the Cause of Increased Vascular Permeability Produced by 5-Hydroxytryptamine, Histamine, Bradykinin, and 48/80 in the Rat". *Brit. J. Exp. Pathol.* 45, 1964, 56 - 64.
162. Royall, J. A., Levin, D. L.: "Adult Respiratory Distress Syndrome in Paediatric Patients. I. Clinical Aspects, Pathophysiology, Pathology, and Mechanisms of Lung Injury". *J. Pediatr.* 112, 2, 1988, 169 - 180.

163. Sakamoto, T., Elwood, W., Barnes, P. J., Chung, K. F.: "Effect of Inhaled Lyso-Platelet-Activating Factor on Airway Microvascular Leakage in the Guinea Pig". *J. Appl. Physiol.* 74, 3, 1993, 1117 - 1122.
164. Samet, J. M., Noah, T. L., Devlin, R. B., Yankaskas, J. R., McKinnon, K., Dailey, L. A., Friedman, M.: "Effect of Ozone on Platelet-Activating Factor Production in Phorbol-Differentiated HL 60 Cells, a Human Bronchial Epithelial Cell Line (BEAS S 6), and Primary Human Bronchial Epithelial Cells". *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 7, 5, 1992, 514 - 522.
165. Samuelsson, B.: "Leukotrienes: Mediators of Immediate Hypersensitivity. Reactions and Inflammation". *Science.* 220, 1983, 568 - 575.
166. Saugstad, O. D., Aasen, A. O., Guldvog, I., Lium, B., Larsbraaten, M., Lyngaas, K., Amundsen, E.: "Activation of the Kallikrein-Kinin System during Experimental Lung Insufficiency in Dogs". *Acta Chir. Scand.* 499, 1980, 123 - 129.
167. Schaberg, T., Haller, H., Lode, H.: "Evidence for a Platelet-Activating Factor Receptor on Human Alveolar Macrophages". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177, 2, 1991, 704 - 710.
168. Schiessler, H., Arnhold, M., Ohlsson, K., Fritz, H.: "Inhibitors of Acrosin and Granulocyte Proteinases from Human Genital Tract Secretions". *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 357, 1976, 1251.
169. Schlag, G., Voigt, W. H., Redl, H., Glatzl, A.: "Vergleichende Morphologie des posttraumatischen Lungenversagens". *Anästh. Intensivther. Notfallmed.* 15, 1980, 315 - 339.
170. Schlag, G., Redl, H.: "Die Leukostase in der Lunge beim hypovolämisch - traumatischen Schock". *Anästhesist* 29, 1980, 606 - 612.

171. Schlag, G., Redl, H.: "New Aspects of Shock Lung". *Anästh. Intensivther. Notfallmed.* 17, 1982, 86 - 91.
172. Schmidt, W., Egbring, R., Havemann, K.: "Effects of Elastase-Like and Chymotrypsin-Like Neutral Proteases from Human Granulocytes on Isolated Clotting Factors". *Thromb. Res.* 6, 1975, 315 - 326.
173. Schnader, J., Udem, B., Adams, G. K., Peters, S. P., Adkinson, N. F., Sylvester, J. T.: "Effects of Hypoxia on Leukotriene Activity and Vasomotor Tone in Isolated Sheep Lungs". *J. Appl. Physiol.* 68, 6, 1990, 2457 - 1465.
174. Schror, K., Seidel, H.: "Blood-Vessel Wall Arachidonate Metabolism and its Pharmacological Modification in a New in Vitro Assay System". *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 337, 2, 1988, 177 - 182.
175. Schulz, R., Seeger, W.: "Release of Leukotrienes into the Perfusate of Calcium-Ionophore Stimulated Rabbit Lungs. Influence of 5-Lipoxygenase Inhibitors". *Biochem. Pharmacol.* 35, 1986, 183 - 193.
176. Seeger, W., Wolf, H., Stähler, G., Neuhofer, H., Roka, L.: "Increased Pulmonary Vascular Resistance and Permeability due Arachidonate Metabolism in Isolated Rabbit Lungs". *Prostaglandins.* 23, 1982, 157 - 173.
177. Seeger, W., Neuhofer, H., Graubert, E., Wolf, H., Roka, L.: "Comparative Influence of the Ca-Ionophore A 23187, Bradykinin, Kallidin and Elesdoisin on the Rabbit Pulmonary Vasculature with Special Reference to Arachidonate Metabolism". In: Fritz, Back, Dietze, Haberland (Eds.): *Kinins-III.* Pt. A.: Plenum Publishing Corporation, 1983, 533 - 551.

178. Seeger, W., Wolf, H., Neuhof, H., Roka, L.: "Arachidonsäure-Metabolite als Mediatoren von Widerstandserhöhung und Schrankenstörung in der Pulmonalen Mikrozirkulation". *Prax. Klin. Pneumol.* 37, 1983, 728 - 731.
179. Seeger, W., Wolf, H., Neuhof, H., Roka, L.: "Release and Oxygenation of Arachidonate Acid: Nonspecific Triggering and Pathophysiological Consequences in Isolated Rabbit Lungs". *Adv. Prostagl. Thromboxane Leukotr. Res.* 12, 1983, 99 - 105.
180. Seeger, W., Ernst, C., Walmrath, D., Neuhof, H., Roka, L.: "Influence of the Thromboxane Antagonist BM 13.177 on the Arachidonic Acid-Induced Increase in Pulmonary Vascular Resistance and Permeability in Rabbit Lungs". *Thromb. Res.* 40, 1985, 793 - 805.
181. Seeger, W., Stöhr, G., Wolf, H. R. D., Neuhof, H.: "Alteration of Surfactant Function due to Protein Leakage. Special Interaction with Fibrin Monomer". *J. Appl. Physiol.* 58, 1985, 326 - 339.
182. Seeger, W., Suttorp, N., Hellwig, A., Bhakdi, S.: "Noncytolytic Terminal Complement Complexes may Serve as Calcium Gates to Elicit Leukotriene B<sub>4</sub> Generation in Human Polymorphnuclear Leucocytes". *J. Immunol.* 137, 1986, 1286 - 1293.
183. Seeger, W., Walmrath, D., Menger, M., Neuhof, H.: "Increased Lung Vascular Permeability after Arachidonic Acid and Hydrostatic Challenge". *J. Appl. Physiol.* 61, 1986, 1781 - 1789.
184. Seeger, W., Neuhof, H., Hall, J., Roka, I.: "Pulmonary Vasoconstrictor Response to Soluble Fibrin in Isolated Lungs: Possible Role of Thromboxane Generation". *Circ. Res.* 62, 1988, 651 - 659.
185. Seeger, W., Walmrath, D., Grimminger, F.: "ARDS. Intensivtherapie des akuten Lungenversagens". *Internist.* 36, 1995, 785 - 801.

186. Sellmayer, A., Strasser, T., Weber, P. C.: "Differences in Arachidonic Acid Release, Metabolism and Leukotriene B<sub>4</sub> Synthesis in Human Polymorphonuclear Leukocytes Activated by Different Stimuli". *Bioch. Biophys. Acta.* 927, 1987, 4217 - 4222.
187. Shalaby, M. R., Palladino, M. R. Jr., Hirabayashi, S. E., Eessalu, T. E., Lewis, G. D, Shepard, H. M., Aggarawal, B. B.: "Receptor Binding and Activation of Polymorphonuclear Neutrophils by Tumor Necrosis Factor-Alpha". *J. Leucocyte Biol.* 41, 1987, 196 - 200.
188. Shasby, D. M., Vanbenthuyssen, K. M., Tate, R. M., Shasby, S. S., McMurtry, I., Repine, J. E.: "Granulocytes Mediate Acute Edematous Lung Injury in Rabbits and in Isolated Rabbit Lungs Perfused with Phorbol Myristate Acetate: Role of Oxygen Radicals". *Am. Rev. Resp. Dis.* 125, 1982, 443 - 447.
189. Shaw, J. O., Henson, P. M.: "Pulmonary Intravascular Sequestration of Activated Neutrophils". *Am. J. Pathol.* 108, 1982, 17 - 23.
190. Shibamoto, T., Yamaguchi, Y., Hayashi, T. Jr., Saeki, Y., Kawamoto, M., Koyama, S.: "PAF Increases Capillary Pressure but not Vascular Permeability in Isolated Blood-Perfused Canine Lungs". *Am. J. Physiol.* 264, 5 Pt 2, 1993, H 1454 - H 1459.
191. Siebeck, M., Kohl, J., Endres, S., Spannagl, M., Machleidt, W.: "Delayed Treatment with Platelet Activating Factor Receptor Antagonist WEB 2086 Attenuates Pulmonary Dysfunction in Porcine Endotoxin Shock". *J. Trauma.* 37, 5, 1994, 745 - 751.
192. Sielaff, T. D., Sugerman, H. J., Tatum, J. L., Blocher, C. R.: "Successful Treatment of Adult Respiratory Distress Syndrome by Histamine and Prostaglandin Blockade in a Porcine Pseudomonas Model". *Surgery.* 102, 2, 1987, 350 - 357.

193. Sielaff, T. D., Sugerman, H. J., Tatum, J. L., Kellum, J. M., Blocher, C. R.: "Treatment of Porcine Pseudomonas ARDS with Combination Drug Therapy". *J. Trauma*. 27, 12, 1987, 1313 - 1322.
194. Smedley, L. A., Tonnesen, M. G., Sandhaus, R. A., Haslett, C., Guthrie, L. A., Johnston, R. B. Jr.: "Neutrophil-Mediated Injury to Endothelial Cells - Enhancement by Endotoxin and Essential Role of Neutrophil Elastase". *J. Clin. Invest.* 77, 1986, 1233 - 1243.
195. Sprung, C. L., Schultz, D. R., Marcial, E., Caralis, P. V., Gelbard, M. A., Arnold, P. E., Long, W. M.: "Complement Activation in Septic Shock Patients". *Crit. Care Med.* 14, 1986, 525 - 528.
196. Stahl, G. L., Bitterman, H., Lefer, A. M.: "Protective Effects of a Specific Platelet Activating Factor (PAF) Antagonist, WEB 2086, in Traumatic Shock". *Thromb. Res.* 53, 3, 1989, 327 - 338.
197. Staub, N. C., Schultz, E. L., Koike, K., Albertine, K. H.: "Effect of Neutrophil Migration Induced by Leukotriene B<sub>4</sub> on Protein Permeability in Sheep Lung". *Fed. Proc.* 44, 1985, 30 - 35.
198. Strohmaier, W., Redl, H., Schlag, G., Inthorn, D.: "D-Erythro-Neopterin Plasma Levels in Intensive Care Patients with and without Septic Complications". *Crit. Care Med.* 15, 1987, 757 - 760.
199. Suttorp, N., Seeger, W., Zucker-Raimann, J., Lutz, F., Bhakdi, S.: "Stimulation of Leucotriene B<sub>4</sub> and Prostacyclin Formation in Granulocytes and Cultured Endothelial Cells by Channel Forming Bacterial Toxins - a New Aspect of Stimulus Response Coupling". *Adv. Inflammation Res.* 10, 1986, 333 - 340.
200. Suttorp, N., Seeger, W., Zinsky, W., Bhakdi, S.: "Complement Complex C5b - 8 Induces PGI<sub>2</sub> Formation in Cultured Endothelial Cells". *Am. J. Physiol.* 253, 1987, C 13 - C 21.

201. Suttorp, N., Galanos, C., Neuhof, H.: "Endotoxin Alters Arachidonate Metabolism in Pulmonary Endothelial Cells". *Am. J. Physiol.*, 253, 1987, C 384 - C 391.
202. Suttorp, N., Seeger, W., Zucker-Reimann, J., Roka, L., Bhakdi, S.: "Mechanisms of Leukotriene Generation in Polymorphnuclear Leukocytes by Staphylococcal Alpha-Toxin". *Infection and Immunity*. 55, 1987, 104 - 110.
203. Suttorp, N., Nolte, A., Wilke, A., Drenckhahn, D.: "Human Neutrophil Elastase Increases Permeability of Cultured Pulmonary Endothelial Cell Monolayers". *Int. J. Microcirc.: Clin. Exp.* 13, 1993, 187 - 203.
204. Tate, R. M., Vanbenthuyzen, K. M., Shasby, D. M., McMurtry, I. F., Repine, J. E.: "Oxygen-Radical-Mediated Permeability Edema and Vasoconstriction in Isolated Perfused Rabbit Lungs". *Am. Rev. Respir. Dis.* 126, 1982, 802 - 806.
205. Tate, R. M., Repine, J. E.: "State of the Art - Neutrophils and the Adult Respiratory Distress Syndrome". *Am. Rev. Respir. Dis.* 128, 1983, 552 - 559.
206. Tegner, H., Ohlsson, K.: "Localization of a Low-Molecular-Weight Protease Inhibitor to Tracheal and Maxillary Sinus Mucosa". *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 358, 1977, 425.
207. Travis, J., Dubin, A., Potempa, J., Watorek, W., Kurdowska, A.: "Neutrophil Proteinases: Caution Signs in Designing Inhibitors Against Enzymes with Possible Multiple Functions". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 624, 1991, 81 - 86.
208. Travis, J., Fritz, H.: "Potential Problems in Designing Elastase Inhibitors for Therapy". *Am. Rev. Respir. Dis.* 143, 1991, 1412 - 1415.

209. Tschesche, H.: "Structure and Function of Natural Inhibitors as Antagonists of Proteinase Activities". *Adv. Exp. Med. Biol.* 167, 1984, 73 - 87.
210. Tucker, A., Weir, E. K., Reeves, J. T., Grover, R. F.: "Histamine H<sub>1</sub>- and H<sub>2</sub>-Receptors in Pulmonary and Systemic Vasculature of the Dog". *Am. J. Physiol.* 229, 4, 1975, 1008 - 1013.
211. Varani, J., Fligiel, S. E. G., Till, G. O., Kunkel, R. G., Ryan, U. S., Ward, P. A.: "Pulmonary Endothelial Cell Killing by Human Neutrophils". *Lab. Invest.* 53, 1985, 656 - 663.
212. Venaille, T. J., Misso, N. L. A., Phillips, M. J., Robinson, B. W. S., Thompson, P. J.: "Effects of Different Density Gradient Separation Technique on Neutrophil Function". *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 54, 1994, 385 - 391.
213. Wachtvogel, Y. T., Kucich, U., James, H. L., Scott, C. F., Shapira, M., Zimmerman, M., Cohen, A. B., Colman, R. W.: "Human Plasma Kallikrein Releases Neutrophil Elastase during Blood Coagulation". *J. Clin. Invest.* 72, 1983, 1672 - 1677.
214. Wachtvogel, Y. T., Pixley, R. A., Kucich, U., Abrams, W., Weinbaum, G., Shapira, M., Colman, R. W.: "Purified Plasma Factor XIIa Aggregates Human Neutrophils and Causes Degranulation". *Blood.* 67, 1986, 1731 - 1737.
215. Wangensteen, O. D., Lysaker, E., Savaryn, P.: "Pulmonary Capillary Filtration and Reflection Coefficients in the Adult Rabbit". *Microvasc. Res.* In press.
216. Warren, J. S., Barton, P. A., Mandel, D. M., Matrosic, K.: "Intrapulmonary Tumor Necrosis Factor Triggers Local Platelet-Activating Factor Production in Rat Immune Complex Alveolitis". *Lab. Invest.* 63, 6, 1990, 746 - 754.

217. Warren, J. S.: "Relationship Between Interleukin-1 Beta and Platelet-Activating Factor in the Pathogenesis of Acute Immune Complex Alveolitis in the Rat". *Am. J. Pathol.* 141, 3, 1992, 551 - 560.
218. Watorek, W., Farley, D., Salvesen, G., Travis, J.: "Neutrophil Elastase and Cathepsin G: Structure, Function, and Biological Control". *Adv. Exp. Med. Biol.* 240, 1988, 23 - 31.
219. Weissmann, G., Zurier, R. B., Spieler, P. J., Goldstein, I. M.: "Mechanisms of Lysosomal Enzyme Release from Leukocytes Exposed to Immune Complexes and other Particles". *J. Exp. Med.* 134, 1971, 149 S - 165 S.
220. Weissmann, G., Brand, A., Franklin, E. C.: "Interactions of Immunoglobulins with Liposomes". *J. Clin. Invest.* 53, 1974, 536 - 543.
221. Weissmann, N., Seeger, W., Conzen, J., Kiss, L., Grimminger, F.: "Effects of Arachidonic Acid Metabolism on Hypoxic Vasoconstriction in Rabbit Lungs". *Eur. J. Pharmacol.* 356, 2 - 3, 1998, 231 - 237.
222. Witte, S.: "Thrombin as a Permeability Influencing Agent". *Prog. Appl. Microcirc.* 12, 1987, 212 - 216.
223. Wong, P. S., Travis, J.: "Isolation and Properties of Oxidized Alpha-1-Proteinase Inhibitor from Human Rheumatoid Synovial Fluid". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96, 1980, 1449 - 1454.
224. Worthen, G. S., Goin, A. J., Mitchel, B. C., Larsen, G. L., Reeves, J. R., Henson, P. M.: "Platelet-Activating Factor Causes Neutrophil Accumulation and Edema in Rabbit Lungs". *Chest.* 83, 5, 1983, 13 S - 15 S.
225. Yamamoto, T., Cochrane, C. G.: "Guinea Pig Hageman Factor as a Vascular Permeability Enhancement Factor". *Am. J. Pathol.* 105, 1981, 164 - 175.

226. Zaslou, M. C., Clark, R. A., Stone, P. J., Calore, J. D., Snider, G. L., Franzblau, C.: "Human Neutrophil Elastase Does Not Bind to Alpha1-Protease Inhibitor that Has Been Exposed to Activated Human Neutrophils". *Am. Rev. Respir. Dis.* 128, 1983, 434 - 439.

## 7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$\alpha_1$ -PI	$\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitor
Ak	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
ARDS	Adult Respiratory Distress Syndrome
Art.	Arteria
C1	Komplementfaktor 1
C3a	aktivierter Komplementfaktor 3
C5a	aktivierter Komplementfaktor 5
EIA	Enzymimmunoassay
et al.	et alii
Fc	fragment crystalline
FG	Feuchtgewicht (der Lunge)
F <sub>i</sub> O <sub>2</sub>	inspiratorische Sauerstoffkonzentration
FKS	fetales Kälberserum
G	gauge
H <sub>1</sub> , H <sub>2</sub>	Histamin-Rezeptoren
HBSS	Hanks Buffered Saline Solution
HES	Hydroxyethylstärke
HNE	humane Neutrophilen-Elastase
I.E.	Internationale Einheit
i.t.	intratracheal
i.v.	intravenös
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IL-1	Interleukin 1
IRDS	Infant Respiratory Distress Syndrome
K <sub>fc</sub>	kapillärer Filtrationskoeffizient

KGw	Kilogramm Körpergewicht
KHHP	Krebs-Henseleit-HES-Pufferlösung
KOD	kolloid-osmotischer Druck
LSD	least significant difference
Lsg.	Lösung
LTC <sub>4</sub>	Leukotrien C <sub>4</sub>
MANOVA	Varianzanalyse für Messwiederholungen
MG	Molekulargewicht
PAD	pulmonal-arterieller Druck
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
p <sub>a</sub> O <sub>2</sub>	arterieller Sauerstoffpartialdruck
pCO <sub>2</sub>	Kohlendioxidpartialdruck
PEEP	positiver endexpiratorischer Druck
pH	potentia hydrogenii
PKD	pulmonal-kapillärer Druck
PMN	polymorphnuclear neutrophil
PVC	Polyvinylchlorid
PVD	pulmonal-venöser Druck
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Trometamol
TXA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
U	Umdrehung
Vol.	Volumen

## **8. DANKSAGUNG**

An Herrn Prof. Dr. med. H. Neuhof für die Überlassung dieses interessanten Themas. Seine kontinuierliche Offenheit und Hilfsbereitschaft bei der Erstellung dieser Arbeit hat mir sehr geholfen.

Mein Dank auch an Fr. Dr. med. I. Breil für die fachlich kompetente Betreuung.

An Herrn H. Michnacs und Frau A. Weber für die Hilfe bei der praktischen Umsetzung der Arbeit. Ebenso danke ich Frau T. Wieth für die außergewöhnliche Hilfeleistung in organisatorischen und redaktionellen Fragen. Sie haben mich stets, sowohl persönlich, als auch fachlich, unterstützt und ermuntert.

An meinen Freund und Kommilitonen M. Belz für die tolle Zusammenarbeit während des praktischen Teils der Promotionsarbeit.

An alle Mitarbeiter des Labors für experimentelle Medizin in der Medizinischen Klinik der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die familiäre Arbeitsatmosphäre wird mir immer in freudiger Erinnerung bleiben.

## 9. LEBENS LAUF

### **Persönliche Daten:**

José Ramón Fernández Alvarez, geboren am 22.09.1970 in Frankfurt/M.,  
wohnhaft in der Bürgerstr. 60, D-37073 Göttingen, Tel.: 0551 - 77 06 47 7

### **Schul- und Hochschulbildung:**

1977 - 1990    Grundschule und Gymnasium in Frankfurt/Main  
1990 - 1997    Justus-Liebig-Universität, Gießen: Studiengang Medizin  
1996 - 1997    Praktisches Jahr an der Universitätskinderklinik Gießen  
                  und am Klinikum Wetzlar

### **Ärztliche Tätigkeit:**

1997 - 1999    Klinik für Neonatologie, Charité, Berlin  
1999            Approbation als Arzt  
seit 1999      Universitätskinderklinik Göttingen

### **Wissenschaftliche Tätigkeit:**

1998    Poster: „Management des kongenitalen Chylothorax“. Jahres-  
          tagung d. Gesellschaft f. Neonatologie u. Päd. Intensivmedizin.  
1999    Fernandez et al.: “Management of Spontaneous Congenital  
          Chylothorax: Oral Medium-Chain Triglycerides versus Total  
          Parenteral Nutrition“. *Am. J. Perinat.* 16, 8, 1999, 415 - 420.