

Vergleichende Untersuchung zur Wirkung einer Calpain- und Na⁺- H⁺- Antiporter- Inhibition auf die Freisetzung humaner Leukozytenelastase aus aktivierten Granulozyten und auf das Ausmaß der damit verbundenen pulmonalen Ödembildung am Modell der isoliert ventilierten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs der Humanmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Mike Sebastian Strunden

Geburtsort Lüdenscheid

Gießen 2007

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin

Medizinische Klinik I

Leiter: Prof. Dr. med. H. Tillmanns

Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,

Standort Gießen

Betreuerin: PD Dr. med. C. Neuhof

Gutachterin: PD Dr. med. C. Neuhof

Gutachter: PD Dr. med. H. – J. Wagner

Tag der Disputation: 09.09.2008

Gewidmet meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1 “Acute Lung Injury” und “Adult Respiratory Distress Syndrome”	8
1.2 Calpain-Calpastatinsystem	11
1.2.1 Struktureller Aufbau des Calpains	13
1.2.2 Regulation der Calpainaktivität	14
1.2.3 Physiologische Funktion von Calpainen	18
1.2.4 Pathophysiologische Bedeutung von Calpainen	20
1.2.5 Calpaininhibitoren	21
1.3 Der Na ⁺ - H ⁺ - Antiporter	22
1.3.1 Struktureller Aufbau des Na ⁺ - H ⁺ - Antiporters	22
1.3.2 Der NHE 1-Inhibitor Cariporide ®	23
2. Material und Verfahren	25
2.1 Das Modell der isoliert perfundierten und ventilerten Kaninchenlunge	25
2.1.1 Versuchstiere	25
2.1.2 Präparation und Organentnahme	25
2.1.3 Extrakorporales Zirkulationssystem	28
2.1.4 Erfassung der Messgrößen	31

2.1.5	Beatmung und Kontrolle des Säure-Basen-Haushalts	32
2.1.6	Flowsteigerungs- und Perfusionsphase	34
2.2	Humane Leukozyten	36
2.2.1	Spender	36
2.2.2	Isolierung der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten	36
2.2.3	Vitalitätsprüfung der isolierten Zellen	38
2.2.4	Stimulierung der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten	39
2.3	Perfusionsversuche	40
2.3.1	Kontrollversuche ohne Zugabe von Inhibitoren	40
2.3.2	Kontrollversuche unter Zugabe einer Inhibitorenmischung	40
2.3.3	Kontrollversuche unter Zugabe einer Inhibitorenmischung und stimulierter Granulozyten	40
2.3.4	Hemmversuche mit A-705253	41
2.3.5	Hemmversuche mit Cariporide®	41
2.3.6	Hemmversuche mit A-705253 und Cariporide®	41
2.4	In-vitro-Versuche zur Freisetzung von Elastase aus stimulierten Granulozyten	41
2.4.1	Kontrollversuche	41
2.4.2	Hemmversuche mit A-705253	42

2.5	Elastasebestimmung	42
2.6	Rezeptteil	43
2.6.1	Gebrauchsfertige Lösungen / Suspensionen	43
2.6.2	Inhibitoren / Reagenzien / Pharmaka	44
2.6.3	Infusionslösungen	45
2.6.4	Nährmedium	46
2.6.5	Perfusionslösung	47
2.6.6	Pufferlösung	48
2.7	Statistische Verfahren	48
3.	Ergebnisse	49
3.1	Perfusionsversuche	49
3.1.1	Verhalten des Lungengewichts	49
3.1.2	Verhalten des Perfusionsdrucks	52
3.1.3	Freisetzung von PMN-Elastase ins Perfusat	54
3.2	In-vitro-Versuche zur Freisetzung von Elastase aus stimulierten Granulozyten	56
4.	Diskussion	58
5.	Zusammenfassung	72

6.	Anhang	74
6.1	Literaturverzeichnis	74
6.2	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	115
6.3	Danksagung	116
6.4	Erklärung	117
6.5	Lebenslauf	118

1. Einleitung

1.1 “Acute Lung Injury” und “Adult Respiratory Distress Syndrome”

In den letzten Jahrzehnten wurden bei der intensivmedizinischen Behandlung Schwerkranker wesentliche Fortschritte gemacht.

Noch vor Jahren verstarb das Gros der Patienten an Nierenkomplikationen, wobei vor allem das akute Nierenversagen das vordringlichste Problem darstellte. Mit der Weiterentwicklung und flächendeckenden Verfügbarkeit der Dialysetechnik sind nun die hepatogenen und pulmonalen Komplikationen in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses gerückt. Dem akuten Leberversagen scheint man jetzt mit der erst seit kurzem verfügbaren “Leberdialyse“ (MARS-System) zumindest teilweise begegnen zu können. Komplikationen von Seiten der Lunge treten vor allem durch Infektionen und das akute Lungenversagen “Acute Lung Injury“ (ALI) auf.

Die schwerste Form der ALI ist das “Adult Respiratory Distress Syndrome“ (ARDS). Es wurde erstmals 1967 durch Ashbaugh et al. als eigenständiges Krankheitsbild beschrieben. Die Namensgebung ist auf die Ähnlichkeit der Symptomatik mit dem schon bekannten Atemnotsyndrom des Neu- und Frühgeborenen, “IRDS – Infant Respiratory Distress Syndrome“, zurückzuführen.

Gemäß der Amerikanisch-Europäischen Konsensus-Konferenz von 1992 ist das ARDS definiert als beidseitige Störung der pulmonalen

Gasaustauschstrecke, die in Abwesenheit kardiogener Ursachen beim vorher lungengesunden Patienten ohne besondere Prädisposition auftreten kann (Seeger et al. 1995). Ein ARDS kann durch eine große, heterogene Gruppe von pulmonalen und systemischen Erkrankungen ausgelöst werden, die häufigste Ursache ist jedoch die Sepsis (Ware und Matthay 2000). Allen auslösenden Faktoren gemeinsam ist die Fähigkeit, eine überschießende inflammatorische Antwort zu initiieren, die sich im Verlauf den physiologischen Kontrollmechanismen entziehen und das Lungenparenchym schädigen kann. Der phasenweise Ablauf eines ARDS beginnt, ebenso wie die ALI, mit einer pulmonalen Ödembildung, die über eine exsudative Periode in eine Lungenfibrose übergehen kann. Eine Fülle von Experimenten konnte zeigen, dass verschiedenste Auslöser, wie Bakterien, Endotoxine, Mikroembolien und Zytokine, zu einer erhöhten pulmonalen Gefäßpermeabilität führen und so ein proteinreiches Lungenödem auslösen (Matthay und Zimmerman 2005). Eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der ALI und des ARDS spielen dabei polymorphkernige neutrophile Leukozyten (PMN). Unter physiologischen Umständen passieren sie die Lungenstrombahn ohne den Blutstrom in größerem Maße zu verlassen. Werden sie jedoch durch inflammatorische Transmitter aktiviert, so adhären sie an die Gefäßwand und werden ins pulmonale Interstitium sequestriert, wo sie eine Vielzahl reaktiver und chemotaktischer Zellprodukte, wie Sauerstoffradikale, Eicosanoide, Zytokine und proteolytische Enzyme, freisetzen (Downey et al. 1999). Unter den

vielen freigesetzten Enzymen rückte vor allem die humane Leukozytenelastase (HLE) in den Mittelpunkt des Interesses, da sie bei fehlender Hemmung in der Lage ist, das Lungeninterstitium gravierend zu schädigen und die Bildung schwerer Emphyseme auszulösen, so z.B. beim angeborenen α -1-Antitrypsinmangel (Eriksson 1989). Obwohl die Rolle der HLE in der Pathogenese des ARDS gut und oft untersucht wurde, bleiben noch viele Fragen ungeklärt. In der Literatur lassen sich sowohl starke Hinweise für eine Beteiligung der HLE beim ARDS finden, als auch diese These relativierende Studien. Tierexperimentelle Untersuchungen mit unterschiedlichen Inhibitoren zeigen, dass die HLE zur Ausbildung eines ARDS beiträgt. Studien mit broncho-alveolärer Lavageflüssigkeit von Patienten mit und ohne ARDS kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen (Lee und Downey 2001). Zusammenfassend sehen Lee und Downey zur Zeit sowohl pathogenetische als auch protektive Aspekte der HLE im Rahmen des ARDS. Wichtig scheint vor allem die Unterscheidung zwischen intra- und extrazellulärer HLE zu sein. Während die eine vorwiegend zur Erfüllung der Abwehrfunktion der PMN dient und damit essentieller Bestandteil einer sinnvollen Entzündungsreaktion ist, scheint die andere bei überschießender inflammatorischer Aktivität deletäre Matrixschäden anrichten zu können. Matthay und Zimmerman (2005) stellen in ihrem Review heraus, dass zwar eine Fülle auslösender Faktoren und eine große Zahl beteiligter Stoffe und Zellen bekannt sind, die genaue Pathophysiologie des ARDS jedoch weiterhin im Dunkeln liegt. So ist nach wie vor unklar, warum

die physiologische Infektabwehr bei z.B. einer Pneumonie so deregulieren kann, dass sich aufgrund der überschießenden inflammatorischen Reaktion ein akutes Lungenversagen ausbildet. Obwohl das ARDS als Syndrom schon Jahrzehnte bekannt ist und seither weltweit erforscht wird, konnte noch kein kausaler Therapieansatz gefunden werden. Dennoch wurde die Letalität der ALI und des ARDS in den letzten Jahren durch Anwendung lungenprotektiver Beatmungsstrategien und extrakorporaler Oxygenierungsverfahren gesenkt (Matthay und Zimmerman 2005).

In der vorliegenden Arbeit soll nun der Einfluss einer Calpain- und $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ - Pumpen - Inhibition auf die HLE-Freisetzung aus aktivierten PMN und die damit verbundene pulmonale Ödembildung tierexperimentell untersucht werden.

1.2 Calpain-Calpastatinsystem

Calpaine sind kalziumabhängige, zytosolische Cysteinproteasen. Seit 1989 werden sie, entsprechend der zu ihrer Aktivierung nötigen Konzentration an freiem Kalzium, in μ -Calpain (Kalziumbedarf im μ -molaren Bereich) und m-Calpain (Kalziumbedarf im m-molaren Bereich) unterteilt (Cong et al. 1989). In der Literatur wird μ -Calpain auch als Calpain-I und m-Calpain als Calpain II bezeichnet. Beide Calpaine sind ubiquitär vorkommende, typische Calpaine, deren Aminosäuresequenzen in allen Vertebraten zu 90 % übereinstimmen (DeLuca et al. 1993, Smith et al. 2001). Calpastatin ist der einzige bekannte natürliche und spezifische Calpain-Inhibitor (Crawford

1990). Wenigstens ein Calpain oder Calpastatin wurde bislang in jeder untersuchten Vertebratenzelle gefunden (Murachi 1983, Goll et al. 1992). Calpaine und Calpastatin kommen bei regelrechter Zellintegrität ausschließlich intrazellulär vor und sind dort sehr wahrscheinlich an das Zytoskelett, an Myofibrillen, an Vesikel und an die Plasmamembran gebunden (Suzuki et al. 1990, Kumamoto et al. 1992). In Skelettmuskelzellen befinden sie sich in der Nähe der Z-Scheibe, wenige Moleküle auch im Bereich der A- und I-Bande (Goll et al. 1989 und 1992, Kumamoto et al. 1992 ; Spencer und Tidball 1992).

Die typischen Calpaine (μ - und m-Calpain) zeigen einen spezifischen heterodimeren Aufbau aus insgesamt 6 Domänen auf einer 80 kDa und einer 30 kDa-Untereinheit. Cysteinproteasen, die nicht zu den klassischen Cysteinproteasen wie Cathepsin B und Papain gehören und eine 20 – 25 %ige Übereinstimmung mit der Domäne II aufweisen, werden als "Calpain-ähnlich" bezeichnet. Zeigen diese "Calpain-ähnlichen" Proteasen wiederum die klassische Domänenstruktur der 80 kDa-Untereinheit, werden sie zu den typischen Calpainen gezählt. Hierzu gehören z.B. Calpain 3, 9 und 10, die mit spezifischen Krankheitsbildern in Verbindung gebracht werden können.

Calpaine und Calpastatin kommen in den Zellen immer zusammen vor (Goll et al. 1992, Kumamoto et al. 1992). Die Bindung von Calpastatin an die Calpaine ist kalziumabhängig, wobei die benötigte Kalziumkonzentration von dem jeweiligen Calpainmolekül abhängt (Cottin et al. 1981, Imajoh und Suzuki 1985, Wallace 1988). Die

entstehende Bindung ist reversibel, aber sehr fest und durch Kalziumzug hemmbar, z.B. indem Kalzium durch Chelatbildner abgefangen wird (Otsuka und Goll 1987, Kapprell und Goll 1989).

1.2.1 Struktureller Aufbau des Calpains

μ -Calpain und m-Calpain sind Heterodimere mit insgesamt 6 Domänen, die auf eine 30 kDa-Untereinheit und eine 80 kDa-Untereinheit verteilt sind. Während die kleinere Untereinheit bei beiden Calpainen identisch ist, stimmt die 80 kDa-Untereinheit nur zu 55 bis 65 % überein.

Die beiden Calpainen gemeinsame 30 kDa-Untereinheit besteht aus den Domänen V und VI und wird von nur einem einzigen Gen auf Chromosom 19 codiert (Ohno et al. 1990). Sie scheint für den Organismus essentiell zu sein, denn in Versuchen mit knock-out Mäusen konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen der 30 kDa-Untereinheit letal ist (Arthur et al. 2000, Zimmermann et al. 2000).

Die Domäne VI sitzt am COOH-Ende der 30 kDa-Untereinheit und hat fünf EF-Hände. Vier EF-Hände können Kalzium binden (Ohno et al. 1986), die fünfte ermöglicht es eine Verbindung zu Membranen herzustellen (Xie et al. 2001). Aufgrund dieser Eigenschaft werden die Calpaine auch zur Penta-EF-Hand-Familie der Proteine gerechnet (Maki et al. 1997, Xie et al. 2001).

Die Domäne V der kleineren Untereinheit wird gegenwärtig kontrovers diskutiert. Goll et al. (2003) sehen sie als wenig hydrophobe Bindungsstelle zu anderen Molekülen, während Imajoh

et al. (1986) sie als hydrophobe, phospholipid-bindende Einheit zur Verbindung mit der Zellmembran einstufen.

Die 80 kDa-Untereinheit von μ - und m-Calpain ist auf den Chromosomen 1 und 11 codiert (Ohno et al. 1990). Zumindest für das m-Calpain ist ein Aufbau aus 6 Domänen in kristallographischen Untersuchungen nachgewiesen (Hosfield et al. 1999, Strobl et al. 2000). Ob das μ -Calpain auch über 6 Domänen verfügt, konnte in gleicher Untersuchungsweise nicht geklärt werden. Sicher ist für beide Calpaine eine Aminosäuresequenz mit vier Domänen in der 80 kDa-Untereinheit (Suzuki 1990).

Während die Domäne I das NH₂-terminale Ende beinhaltet, enthält die Domäne II eine katalytische Triade aus den Aminosäuren Cystein, Histidin und Asparagin, wie sie auch für andere Cysteinproteasen, wie Papain, Cathepsin B, L und S, typisch sind. Die Domäne II wird in die zwei Teilstücke IIa und IIb aufgeteilt. IIa enthält die Aminosäure Cystein, II b Histidin und Asparagin. Beide Teile können jeweils ein Kalziumatom binden (Moldoveanu et al. 2002).

Domäne III bildet das Verbindungsstück zwischen der kalziumbindenden Domäne IV und der Domäne II mit der katalytischen Einheit. Sie könnte an der Bindung von Phospholipiden beteiligt sein (Tompa et al. 2001).

1.2.2 Regulation der Calpainaktivität

Zur Zeit herrscht über die Regulation der Calpaine noch immer Unklarheit. Zwar lässt sich aus vielen Untersuchungen schließen,

dass Kalzium einen essentiellen Faktor für die Aktivierung von Calpain und Calpastatin darstellt, jedoch widersprechen sich die vorliegenden Thesen zum Teil.

Sicher ist, dass Calpain in Abwesenheit von Kalzium inaktiv ist. Die drei Aminosäuren Cystein, Asparagin und Histidin im katalytischen Zentrum der Domäne II der 80 kDa-Untereinheit liegen ohne Kalzium zu weit voneinander entfernt. Dies führte zu der Vermutung, dass Kalziumionen eine Verstärkungskette auslösen, die durch eine kleine strukturelle Veränderung mit Beginn in der kalziumbindenden Domäne VI, die Domänen IV und III und schließlich das katalytische Zentrum der Domäne II beeinflusst. Dieser Mechanismus wird von Yount (1993) mit der Bewegung des Myosinköpfchens durch ATP-Bindung bei der Skelettmuskelbewegung verglichen. Strobel et al. (2000) nehmen an, dass Kalzium Ionenbindungen löst und sich die Domäne IIa auf die Domäne IIb zubewegt.

Für diese Vorstellung spricht die Beobachtung, dass ein Calpaininhibitor durch Bindung in der hydrophoben Tasche eine minimale Konformationsänderung auslöst (Linn et al. 1997). Der Inhibitor würde dann die Domänen IV und VI blocken und dadurch eine Transmission zu der Domäne II, also der katalytischen Einheit, verhindern (Goll et al. 2003).

Bislang konnte aber lediglich gezeigt werden, dass Calpain in Anwesenheit von Kalzium anfälliger für eine Proteolyse ist. Untersuchungen zur Strukturaufklärung mit gebundenem Kalzium fehlen bisher.

Viele Proteasen sind Proenzyme. Sie werden aktiviert, indem ihr geblocktes sterisches Zentrum durch Autolyse freigegeben wird. Da μ - und m-Calpain bei Inkubation mit Kalzium autoproteolysieren (Dayton 1982, Cong et al. 1989, Edmunds et al. 1991, Saido et al. 1991, Saido und Shibata et al. 1992), vermuteten Mellgren (1987) und Suzuki et al. (1987), dass Calpaine ebenfalls Proenzyme sind. In einigen Arbeiten wird jedoch auf das gleichzeitige Auftreten von Autolyse und proteolytischer Aktivität hingewiesen (Goll et al. 1992, Kuboki et al. 1992, Saido und Nagao et al. 1992, Saido und Suzuki et al. 1993). Es wird vermutet, dass bereits unautolysiertes Calpain in der Lage ist proteolytisch aktiv zu werden (Cong et al. 1989, Goll et al. 1992, Cong et al. 1993, Crawford et al. 1993, Elce et al. 1997). Nach diesen Untersuchungen können die Calpaine keine Proenzyme sein. Letztlich ist bis heute nicht schlüssig bewiesen, ob das nicht autolysierte Calpain tatsächlich proteolytisch aktiv sein kann. Zwar kann die Autolyse als ein Indikator für Calpainaktivität gewertet werden, fehlende Autolyse schließt sie jedoch nicht aus.

Es erscheint generell zweifelhaft, dass Calpaine direkt und ausschließlich durch Kalzium aktiviert werden, denn die intrazelluläre physiologische Kalziumkonzentration ist mit 50 bis 300 nM sehr viel niedriger, als zur Aktivierung und Autoproteolyse des Calpains erforderlich (Jacquemon 1997, Maravall et al. 2000). Selbst bei Verlust der Kalziumhomöostase durch Ischämie reicht die Kalziumkonzentration nicht aus, um Calpaine direkt zu aktivieren. Für m-Calpain ist dies gesichert, für μ -Calpain könnte sie eventuell ausreichen. Aus diesem Grund wurde eine Substanz vermutet, die

die für eine Calpain-Aktivierung erforderliche Kalziumkonzentration vermindert. Den Phospholipiden Phosphatidylinositol (PI) (Coolican und Hathaway 1984) und Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphonat (PIP₂) (Saido et al. 1991, Saido und Shibata et al 1992) wurden solche Effekte zugeschrieben. Für die Reduzierung der notwendigen Kalziumkonzentration wären aber sehr hohe Konzentrationen von PI und PIP₂ nötig, so dass sich die These entwickelte, Calpaine würden mit den Phospholipiden der Plasmamembran in der Nähe der Kalziumkanäle bei einer hohen totalen Kalziumkonzentration reagieren. Calpaine binden jedoch nicht an Phospholipide, sondern an Proteine (Inomata et al. 1989, Inomata et al. 1990, Kuboki et al. 1990). Zudem hatte die Inkubation von Calpain mit Erythrozytenmembranen keinen Einfluss auf die zur Aktivierung notwendige Kalziumkonzentration (Goll et al. 2003). Gil-Parado et al. (2003) konnten allerdings zeigen, dass Calpain nach intrazellulärem Kalziumanstieg vom Zytosol in Richtung Plasmamembran wandert, während Calpastatin seinen Ort nicht wechselt und im Zytosol bleibt. Eine andere Theorie beruht auf der Tatsache, dass viele Enzyme durch Phosphorylierung aktiviert werden. Da μ - und m-Calpain an verschiedenen Stellen phosphoryliert sind (Cong et al. 2000), könnte dieser Mechanismus auch bei den Calpainen eine Rolle spielen. Es gibt bislang keine schlüssige Lösung für das Grundproblem der für die Aktivierung notwendigen Kalziumkonzentration.

Auch für die Bindung von Calpastatin an Calpain wird Kalzium benötigt (Cottin et al. 1981, Imajoh und Suzuki 1985, Otsuka und

Goll 1987). Dabei benötigt die Inhibition bemerkenswerter Weise eine niedrigere Kalziumkonzentration als die Aktivierung (Kaprell und Goll 1989). Damit nun eine steigende Kalziumkonzentration nicht automatisch zuerst eine Calpaininhibition durch Calpastatin bewirkt, muss die Zelle über einen Mechanismus verfügen, der eine Calpainaktivität in Gegenwart von Calpastatin zulässt. Hier wäre zum Beispiel eine Phosphorylierung der Calpaine als Schutz vor einer Hemmung durch Calpastatin denkbar. Ebenso könnte eine räumliche Trennung von Calpastatin und Calpain verantwortlich sein.

1.2.3 Physiologische Funktion von Calpainen

Die physiologische Funktion der Calpaine ist zur Zeit noch nicht eindeutig geklärt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass sie in eine Vielzahl von Zellprozessen eingebunden sind. So scheinen Calpaine bei der Signaltransduktion eine Rolle zu spielen, die Apoptose zu beeinflussen und zur Umwandlung des Zytoskeletts nötig zu sein.

μ - und m-Calpain üben in der Zelle wahrscheinlich die gleiche Funktion aus, reagieren aber auf unterschiedliche Stimuli. In menschlichen Thrombozyten findet man zum Beispiel nur μ -Calpain, während Rinderthrombozyten ausschließlich m-Calpain enthalten (Taylor et al. 1991).

Sowohl Zytoskelettproteine, Kinasen, Phosphatasen und membranassoziierte Proteine, als auch Transkriptionsfaktoren konnten bisher als Calpainsubstrate gefunden werden (Croall und Demartino 1991, Wang und Yuen 1999).

Kishimoto et al. (1989) konnten zeigen, dass Calpaine Proteinkinase C spalten und daher in die Signaltransduktion eingebunden sein könnten. Neuere Studien zeigen eine Beteiligung in der "Integrin-mediated" Signal-Kette (Fox und Saido 1999). Sie modifizieren hier nicht nur Zwischenprodukte der Signaltransduktion, sondern wirken auch bei der Interaktion zwischen Membran und Zytoskelett mit.

Versuche mit synthetischen Inhibitoren konnten die Notwendigkeit einer Calpainaktivität für den Zellzyklus aufzeigen. Durch ein Überangebot von Calpastatin, als natürlichen Calpaininhibitor, wird der Ablauf des Zellzyklus in Hühnerembryonen bei G1 unterbrochen (Carragher et al. 2002). Während der Meiose scheinen Calpaine ebenfalls eine Rolle zu spielen (Watanabe et al. 1989, Malcov et al. 1997, Santella et al. 2000).

Calpaine beeinflussen sicher belegbar den programmierten Zelltod. Eine Reihe von Studien konnte dies mit Hilfe des spezifischen Inhibitors Calpastatin nachweisen (Squier et al. 1999). Calpaine könnten dabei die Apoptose durch Aktivierung der Caspase (ein führendes Enzym beim programmierten Zelltod) sowohl fördern (Nakagawa und Yuan 2000), als auch durch Proteolyse der Caspase hemmen. Ihre Rolle scheint spezifisch für verschiedene Stimuli und Zelltypen zu sein (Kidd et al. 2000).

1.2.4 Pathophysiologische Bedeutung von Calpainen

Calpaine spielen bei verschiedenen Krankheiten eine Rolle. Entweder bedingt durch einen Gendefekt, oder sekundär durch einen Verlust der Kalziumhomöostase der Zelle mit anschließender Calpainaktivierung.

Eine genetische Veränderung von Calpain 10 wird zum Beispiel als Auslöser für einen Diabetes mellitus Typ II diskutiert (Reverter et al 2001).

Bereits 1980 brachten Ishiura et al. Calpain mit Muskeldystrophien in Verbindung. Der Verlust von Dystrophin, zum Beispiel bei Typ Becker und Typ Duchenne, führt zu einer Lockerung der Plasmazellmembran der Skelettmuskelzellen und zum Einstrom von Kalzium in die Zelle. Der Kalziuminflux aktiviert Calpaine. Calpaininhibitoren können die Symptomatik einer Muskeldystrophie mildern (Badalamente und Stracher 2000).

Eine gestörte Kalziumhomöostase und darauf folgend gestörte Calpainaktivität, findet sich auch bei ischämisch bedingten Zellschäden. Im Infarktareal menschlicher Herzen konnte aktiviertes Calpain nachgewiesen werden (Kunimatsu et al. 1999) und auch in den einzelnen Kardiomyozyten kommt es während einer Ischämie zu einem Anstieg von Calpain und seiner mRNA (Iizuka et al. 1991, Sandmann et al. 2002). Calpaininhibition kann den durch Ischämie und Reperfusion entstandenen myokardialen Gewebeschaden und die damit einhergehende mitochondriale Dysfunktion vermindern (Neuhof et. al. 2003 und 2004). Auch nach einem experimentellen

Hirntrauma lässt sich die Zahl der geschädigten Neuronen mit einem Calpaininhibitor um 41% senken (Lubisch et al. 2003).

1.2.5 Calpaininhibitoren

Calpastatin ist, wie schon beschrieben, der einzige natürliche spezifische Calpaininhibitor (Crawford 1990). Er würde einen idealen Stoff zur therapeutischen Beeinflussung des Calpainsystems darstellen. Leider ist Calpastatin durch sein großes Molekulargewicht schlecht membrangängig (Biswas et al. 2004) und kann das im Zytosol gelegene Calpain bei exogener Zufuhr nicht beeinflussen. Um sich neue Therapiemöglichkeiten durch Calpaininhibition zu erschließen, bedarf es also eines geeigneten Inhibitors. Allerdings fehlte es den bisher getesteten Stoffen wie Calpain-I-Inhibitor, Calpain-II-Inhibitor, Leupeptin oder E-64 an ausreichender Gewebegängigkeit und Spezifität, oder deren Pharmakokinetik war ungeeignet. Auch die endogenen Inhibitoren Kininogen und α 2-Makroglobulin erwiesen sich mangels ausreichender Spezifität als Calpaininhibitoren für ungeeignet (Saido et al. 1994, Bradford et al. 1990).

Erst 2003 gelang es Lubisch et al. ein vom Benzoylalanin abgeleitetes Ketoamid zu synthetisieren, das in der Lage ist Calpain ausreichend spezifisch zu hemmen. Sowohl N-(1-benzyl-2-carbamoyl-2-oxoethyl)-2-[E-2-(4-ethylaminomethyl-phenyl)-ethen-1-yl]benzamide, als auch dessen Abkömmling N-(1-carbamoyl-1-oxohex-1-yl)-2-[E-2-(4-dimethylaminomethyl-phenyl)-ethen-1-yl]benzamide, tragen einen Vinyl-benzyl-Aminorest an der P2-P3-

Region und können sich dadurch in die hydrophobe Tasche des Calpainmoleküls einfügen und es dort hemmen. Während das Proteasom, Papain und Caspase 3 bis zu einer Konzentration von 10 μM nicht beeinflusst werden, hemmen diese neuen Inhibitoren Calpain und Cathepsin B bereits im nanomolaren Bereich reversibel (Lubisch et al. 2003).

1.3 Der Na^+ - H^+ - Antiporter (NHE)

Der Na^+ - H^+ -Antiporter (NHE-Antiporter) dient zusammen mit den Na^+ - HCO_3^- - Symporter der intrazellulären pH-Regulation. Er wird ausschließlich durch eine intrazelluläre Azidose aktiviert (Harworth et al. 2003), kann aber durch verschiedene andere Stimuli wie Endothelin-I (Meyer et al. 1996) und Alpha-1-Adrenozeptoragonisten (Fliegel 1999) für H^+ - Ionen sensibilisiert werden. Die Wasserstoffionen werden durch den Antiporter in einem elektronenneutralen Prozess, im Austausch gegen Natriumionen, in den Extrazellulärraum transportiert. Über diesen Mechanismus ist er nicht nur an der pH-Regulation, sondern auch an der Natriumhomöostase der Zelle beteiligt. Ein Natriumeinstrom in die Zelle aktiviert seinerseits einen gekoppelten Natrium– Kalzium-Antiporter, der zu einer Kalziumakkumulation im Zellinneren führt.

1.3.1 Struktureller Aufbau des Na^+ - H^+ - Antiporters (NHE)

Bisher wurden 8 Isoformen des NHE gefunden. Bis auf die Isoformen 6 und 7 befinden sich alle im Sarkolemm, vor allem in der Nähe der gap junctions und der transversalen Tubuli (Petrecca et al. 1999).

Eine zentrale Rolle in der Regelung des intrazellulären pH-Werts und des Zellvolumens scheint die Isoform NHE 1 einzunehmen (Orlowski und Grinstein 1997). Sie ist ubiquitär in allen Zellen vorhanden und ist ein 110 kDa schweres Glykoprotein aus 815 Aminosäuren auf 2 Domänen. Die Domäne 1 hat ein N-terminales hydrophobes Ende und bildet den transmembranösen Teil, der für den Ionenaustausch verantwortlich ist. Domäne 2 ragt mit dem hydrophilen COOH-Ende ins Zytoplasma und wird hier bei sinkendem intrazellulärem pH-Wert aktiviert (Fliegel und Frohlich 1993, Orlowski und Grinstein 1997, Wakabayashi et al. 1997, Kinsella et al. 1998). Die Aktivierung des Transportproteins kann dabei über verschiedene Transmittersysteme erfolgen oder moduliert werden, da die Domäne 2 aus 4 Subdomänen besteht, die Bindungsstellen für verschiedene Substanzen aufweisen. So ist eine ATP-abhängige Regulation mittels Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat möglich (Aharonovitz et al. 2000), eine Modulation über Calcineurin-Homologes-Protein (Lin und Barber 1996), über Calmodulin (Wakabayashi et al. 1997) und über eine Aktivierung durch Phosphorylierung via Protein-Kinase (Moor und Fliegel 1999).

1.3.2 Der NHE 1-Inhibitor Cariporide ®

Cariporide® (4-isopropyl-3-methylsulfonyl-benzoyl-guanidin-methansulfonat) ist ein Nachfolger des kaliumsparenden Diuretikums Amiloride und ein spezifischer NHE 1-Inhibitor. Eine Vielzahl von Veröffentlichungen befasst sich mit der kardioprotektiven Wirkung von Cariporide®. So reduziert die Substanz die Infarktgröße in einem

Ischämie-Reperusionsmodell (Linz et al. 1998, Thompson et al. 2003) und vermindert die Apoptoserate nach Myokardinfarkt (Otani et al. 2000). Auch die Gefahr des Kammerflimmerns während Ischämie und Reperfusion des Herzmuskels wird durch Cariporide® gesenkt (Wirth et al. 2001).

Im Rahmen des GUARDIAN-Trials "The Guard During Ischemia Against Necrosis" konnte mit Cariporide® eine Verminderung von Mortalität und Myokardinfarktinzidenz bei Patienten nach koronarer Bypass-Operation erreicht werden (Chaitman 2003). Untersuchungen zum Einfluss von Cariporide® auf inflammatorische oder vaskuläre Pathologien der Lunge sind derzeit nicht verfügbar. Redlin et al. (2001) konnten allerdings zeigen, dass Cariporide® die Leukozytenadhäsion und Migration bei postischämischen inflammatorischen Reaktionen hemmen kann.

2. Material und Verfahren

2.1 Das Model der isoliert perfundierten und ventilierten Kaninchenlunge

2.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 58 Bastard-Kaninchen beiderlei Geschlechts aus einer Standardzucht der Behring-Werke in Marburg. Die Versuche wurden dem Regierungspräsidium Gießen angezeigt und gemäß der Tierschutzbestimmungen durchgeführt.

2.1.2 Präparation und Organentnahme

Um die Lunge isoliert perfundieren und ventilieren zu können, musste das Organ aus dem Kaninchen explantiert werden.

Hierzu erfolgte zunächst die Kanülierung einer Ohrdrainvene des Kaninchens mit einer Butterfly®-Kanüle der Größe 21G, über die die Tiere 1000 I.E. Heparin (Liquemin® der Firma Hoffmann La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) pro Kilogramm Körpergewicht zur Gerinnungshemmung erhielten.

Zur Anästhesie wurden anschließend 30 mg Pentobarbital-Natrium (Narcoren® der Firma Rhone Merieux, Laupheim) pro Kilogramm Körpergewicht langsam injiziert. Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe wurden sie zur Organentnahme auf dem Rücken gelagert und die Extremitäten seitlich fixiert.

Anschließend wurden die Haare über der Trachea entfernt und prätracheal ein subkutanes Depot von ca. 10 ml einer 2% Lidocain-

HCl-Lösung (Xylocain 2%® der Firma AtsraZeneca GmbH, Wedel) gesetzt, sowie die ventrale Thorax-, Abdomen- und Halspartie rasiert.

Nach Wirkungseintritt des Lokalanästhetikums erfolgte die Freilegung der Trachea über eine mediane Inzision distal des Ringknorpels und die Intubation mittels eines PVC-Schlauchs mit einem Durchmesser von 3,5/5,0 mm innen/außen im Sinne einer Tracheotomie auf Höhe der 2. bis 3. Trachealknorpelspanne. Durch dieses Vorgehen konnte ein zu tiefes Einführen des Tubus und damit eine Fehllage in einem der beiden Hauptbronchien verhindert werden.

Da der Tubus nicht mit einem Cuff ausgestattet war, erfolgte die Fixierung in der Trachea durch eine Ligatur der intubierten Luftröhre knapp unterhalb des Tubus-Beatmungsschlauch-Konnektors.

Nach der Intubation wurden die Kaninchen durch eine Starling-Pumpe kontrolliert mit Raumluft beatmet. Dabei erfolgte die Beatmung bis zum Versuchsende mit einer Frequenz von 30 Atemzügen pro Minuten und einem Atemzugvolumen von 25 ml.

Nachdem nun die Beatmung und damit die Oxygenierung der Tiere ausreichend gesichert waren, konnte die Narkose mit weiteren 60 bis 90 mg Pentobarbital-Natrium i.v. unter palpatorischer Kontrolle der Herzfrequenz bis zum Erlöschen jeglicher Schmerzreize vertieft werden.

Über eine mediane, entlang der Rippenbögen nach lateral erweiterten Laparotomie wurde das Diaphragma von kaudal dargestellt und beide Pleurahöhlen eröffnet.

Nach ventrolateraler Ablösung des Zwerchfells erfolgte eine scharfe Abtrennung des Perikards von der Rückseite des Sternums mit anschließender Sternotomie, um den Thorax bis zur Tracheotomieinzision zu eröffnen. Die Sternotomieränder wurden mit Kocherklemmen angeklemt und seitlich fixiert.

Es erfolgte nun die Entfernung des Thymus und der ventralen Perikardanteile, sowie die Darstellung der Aorta ascendens, des Arcus aortae und des Truncus pulmonalis. Der Truncus pulmonalis wurde mit einer gebogenen Pinzette unter Schonung des Bulbus aortae kurz oberhalb des Pulmonalisklappenniveaus unterfahren und mit einer losen Ligatur versehen.

Zur Katheterisierung des Truncus pulmonalis wurde das Myokard des rechten Ventrikels direkt unterhalb der Pulmonalisklappenebene eröffnet und ein Silikonkatheter mit einem Durchmesser von 3,0/5,0 innen/außen orthograd unter geringgradig laufender Perfusion (ca. 1-5 ml/min) mit Krebs-Henseleit-HAES-Puffer luftfrei in den Truncus pulmonalis vorgeschoben und anschließend mittels Ligatur fixiert.

Um das nun frustran gegen die verschlossene rechte Ausflussbahn pumpende Herz zu entlasten, wurde die Apexregion abgeschnitten und damit ein freier Abfluss aus beiden Kammern geschaffen.

Die restlichen Bindegewebsstränge wurden entfernt und das Herz-Lungen-Präparat zusammen mit Beatmungs- und Perfusions-schlauch aus dem Thorax entnommen. An einem Ständer frei aufgehängt erfolgte nun eine Feinpräparation, bei der Ösophagus und störende Reste der Pleura parietalis entfernt wurden. Um einen freien Ablauf des Perfusats aus dem linken Vorhof zu gewährleisten und damit einer stauungsbedingten Flüssigkeitsretention im Lungenkreislauf vorzubeugen, wurde das Herz unter Belassung der Anteile um die rechte Ausflussbahn und größtmöglicher Schonung des katheterisierten Truncus pulmonalis reseziert.

Das Herz-Lungen-Präparat konnte nun frei beweglich in einer feuchten, auf 40 Grad Celsius erwärmten Glaskammer an einer elektronischen Wägezelle (Hottinger Baldwin Messtechnik, Darmstadt) aufgehängt werden.

2.1.3 Extrakorporales Perfusionssystem

Die Lunge hing während des gesamten Versuchs in einer doppelwandigen, feuchten Glaskammer (Stöhmann Glastechnik, Herborn), die durch ein Wasserthermostat (Thermomix UB, B.Braun AG, Melsungen) konstant auf einer Temperatur von 37° Celsius gehalten wurde.

Ein doppelwandiges Gefäß mit einem Volumen von 250 ml (Stöhmann Glastechnik, Herborn) diente als Vorrats- und Auffangbehälter für das rezirkulierende Perfusat. Drei gleiche Gefäße, die als Reservoirbehälter dienten, konnten über

Dreiwegehähne parallel geschaltet werden und wurden am Anfang des Versuchs mit in die Perfusion eingeschaltet, um Blutbestandteile durch nicht rezirkulierendes Perfusat aus der Lungenstrombahn auszuwaschen. Auch diese Gefäße wurden über das Wasserthermostat beheizt.

Vom Hauptreservoirbehälter wurde das Perfusat durch eine Rollenpumpe (Masterflex Mod.:7566-10, Kopfnummer: 7018, Cole & Palmer Instruments, Chicago) mit regulierbarem Flow über einen 40µm Filter (Pall Blood Transfusion Filter SQ 40S, Pall Biomedizin GmbH, Dreieich) und eine Blasenfalle durch den Katheter in den Truncus Pulmonalis gefördert.

Nach Passage des Lungenkreislaufs floss das Perfusat über den eröffneten linken Vorhof frei in die doppelwandige Glaskammer und von dort über ein Schlauchsystem zurück in das Hauptreservoir.

Das Schlauchsystem zwischen den einzelnen Glasgefäßen bestand aus Polyethylen-, PVC- und Silikonschläuchen mit Durchmessern von 5,0/8,0 mm innen/außen im arteriellen Schenkel und 6,0/9,0 mm innen/außen im venösen Schenkel sowie Polyethylen- und Polypropylen Schlauchverbindern zur Konnektion der einzelnen Segmente.

Alle Halterungen für das Schlauchsystem, sowie die Verschlussdeckel für Perfusatgefäße und die Organkammer, bestanden aus Polymethacrylat.

Das gesamte System wurde mehrfach wiederverwendet und daher nach jedem Versuch mit einer eiweißlösenden Reinigungsflüssigkeit (Edisomite-Super®, Merz und & Co, Frankfurt) rezirkulierend

perfundiert. Anschließend erfolgte eine Spülung mit zwei Litern Wasser und zwei Litern Aqua destillata. Vor jedem Versuch wurde das System mit zwei Litern steriler 0,9% NaCl-Lösung gespült.

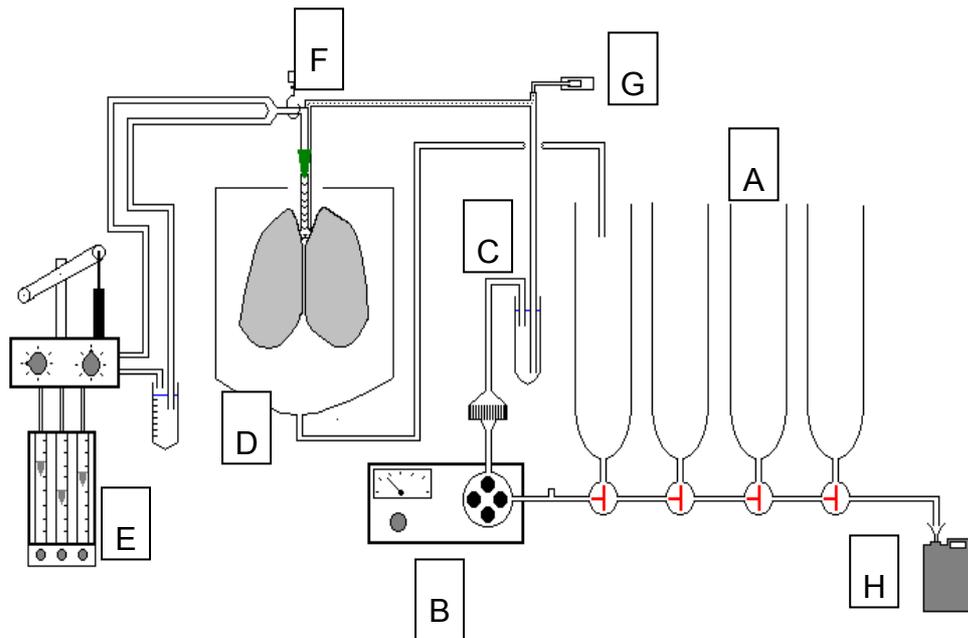


Abb. 1 : Perfusionssystem

- A: Reservoirgefäße
- B: Rollenpumpe
- C: Filter und Blasenfalle
- D: Lunge im Glasgefäß
- E: Flowmeter mit Beatmungspumpe und PEEP-Ventil
- F: Wägezelle
- G: Druckaufnehmer und Druckwandler
- H: Abfluss mit Auffangbehälter

2.1.4 Erfassung der Messgrößen

Während des Versuchs wurden das Gewicht der Lunge sowie der Pulmonalarteriendruck fortwährend gemessen. Die PMN-Elastase-Konzentration wurde aus intermittierend entnommenen Proben bestimmt.

Die Messung des Lungengewichtes erfolgte kontinuierlich mit Hilfe einer elektronischen Wägezelle (Typ U1, Messbereich 0-500 g, Auflösung 0,01 g, Hottinger Baldwin Messtechnik, Darmstadt, Deutschland), an der das perfundierte Organpräparat während des Versuchs aufgehängt war. Ihr wurde ein Messverstärker (KWS3073, Hottinger Baldwin Messtechnik, Darmstadt, Deutschland) nachgeschaltet.

Vor jedem Versuch wurde die Wägezelle mit einem 10g Gewicht geeicht.

Das Monitoring des Pulmonalarteriendrucks erfolgte über einen kleinen, innen im Perfusionskatheter liegenden Polyethylenschlauch mit einem Durchmesser von 0,5/1,0 mm innen/außen. Dieser Messkatheter reichte dabei mit seiner Öffnung bis in den Truncus pulmonalis und war über eine Druckleitung mit einem vertikal verschieblichen Druckwandler (Combitrans®, B. Braun, Melsungen, Deutschland) verbunden. Innenkatheter und Druckleitung wurden vor jedem Versuch luftblasenfrei mit Aqua destillata gefüllt.

Durch Abgleich mit dem atmosphärischen Druck wurde der Pressure-Transducer vor jedem Versuch auf ein Null-Niveau in Höhe des Hilus der Versuchslunge geeicht.

Beide Messgrößen wurden nach Verstärkung durch Vor- und Endverstärker (Hellige, Freiburg, Deutschland) auf einem Mehrkanalschreiber (R-50 Serie, Rikadenki, Freiburg, Deutschland) registriert und kontinuierlich aufgezeichnet.

Die Messung von Kohlendioxid- und Sauerstoffpartialdruck sowie des pH-Werts erfolgte diskontinuierlich aus Perfusatproben zu den festgelegten Zeitpunkten (bei -20, -10, 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150, 165 und 180 Minuten) mit einem Blutgasanalysator (ABL 330, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark).

Zu den Zeitpunkten 0, 60, 120, und 180 Minuten wurden jeweils 4 ml Perfusatflüssigkeit mit einer sterilen Kanüle entnommen und für die spätere Bestimmung der Elastasekonzentration im Perfusat bei -21° Celsius in Eppendorf-Hütchen aufbewahrt.

Zur Bestimmung der PMN-Elastase-Konzentration wurden die Proben zunächst mit humanem Alpha1-Protease-Inhibitor (12,5 mg/ml) über 24 Stunden bei 25° Celsius zur Komplexbildung des Inhibitors mit der freien Elastase inkubiert. Die PMN-Elastase-Konzentration im Perfusat wurde anschließend mit einem Enzym-Immunoassay (Nr.12589, Merck, Darmstadt, Deutschland) ermittelt.

2.1.5 Beatmung und Kontrolle des Säure-Basen-Haushalts

Zur kontrollierten Beatmung der Kaninchenlunge wurde eine Kolbenpumpe (Starling Typ 874072, B.Braun AG, Melsungen) verwendet. Als Beatmungsgas diente Raumluft, der bei Bedarf Kohlendioxid und Sauerstoff aus Gasvorratsflaschen (Messer-Griesheim Sondergase, Duisburg) beigemischt werden konnte.

Dabei wurde nach Reduktion des Flaschendrucks über Vorventile die Gasbeimischung über ein Flowmeter (Rotameter® MFG Co LTD, England) feinreguliert. Während die Beimengung von Kohlendioxid aufgrund der fehlenden Körperproduktion bei einem isolierten Lungenpräparat bei jedem Versuch nötig war, um eine respiratorische Alkalose zu verhindern, musste der Sauerstoffgehalt des Inspirationsgemisches nie über die 21% der Raumluft angehoben werden.

Die Partialdrücke beider Gase im Perfusat sowie der pH-Wert wurden durch Gasanalysen überwacht (ABL 330, Radiometer, Kopenhagen).

Die Atemfrequenz betrug 30 Hübe pro Minute, das Tidalvolumen betrug 25 ml pro Hub. Daraus resultierte ein Atemminutenvolumen von 750 ml. Das Inspirations- zu Expirations- Verhältnis betrug 1:1.

Um einer Atelektasenbildung vorzubeugen und das Perfusions-Ventilations- Verhältnis möglichst optimal zu gestalten, wurde bei jedem Versuch ein PEEP (Positiv End Expiratory Pressure) von 1 cm Wassersäule eingestellt, nachdem die Lunge nach der Entnahme aus dem Thorax durch mehrfache vorsichtige manuelle Kompression des Expirationsschenkels des Beatmungsschlauchs im Sinne eines „Open-Up“- Manövers gebläht wurde.

Dabei entfalteten sich auch bei der Entnahme entstandene, makroskopisch sichtbare Atelektasen wieder.

Die eingestellten Parameter wurden von der Intubation des Kaninchens an bis zum Versuchsende nicht verändert. Nur die Beimengung von Kohlendioxid zum Beatmungsgas wurde den

extrathorakalen Verhältnissen angepasst und zur Regulation des pH-Werts genutzt. Hier wurden der Physiologie entsprechende Werte zwischen 7,35 und 7,45 angestrebt.

Die Beatmung während der Organentnahme erfolgte mit reiner Raumluft und ohne PEEP.

2.1.6 Flowsteigerungs- und Perfusionsphase

Die in das Perfusionsgefäß eingehängte Lunge wurde zunächst mit einer Rate von 50 ml pro Minute nicht rezirkulierend mit etwa 200 ml Perfusatlösung gespült, um Blutzellen, Zellbestandteile und von ihnen liberierte vasoaktive Mediatoren auszuwaschen.

Anschließend wurde das System auf Rezirkulation umgestellt und der Perfusatflow in Schritten von jeweils etwa 40 ml pro Minute innerhalb von 10 Minuten auf den Zielwert 200 ml pro Minute erhöht. Dieser Wert entspricht annähernd dem Herzminutenvolumen eines Kaninchens in Ruhe.

Das Gesamtvolumen des rezirkulierenden Perfusats betrug 200 ml, die Kreislaufzeit bei der eingestellten Förderrate also eine Minute.

Schon anhand des Kurvenverlaufs der aufgezeichneten Werte für Lungengewicht und Pulmonalarteriendruck in dieser Phase, ließen sich vorsichtige Rückschlüsse auf die Integrität des Lungengewebes ziehen und beurteilen, ob die Lunge weitgehend verletzungsfrei entnommen wurde. Als typischer Kurvenverlauf zeigte sich meist eine parallele, treppenförmige Steigerung beider Kurven bis zu einem, bei einer Perfusionsrate von 200 ml pro Minute erreichten, jeweiligen Maximalwert.

Größere Embolien der Lungenstrombahn fielen schon hier durch sprunghafte Anstiege des pulmonalarteriellen Drucks auf. Grobe Abflussbehinderungen aus dem Lungenkreislauf oder größere Hämatomate zeigten sich meist durch ein unkontrolliertes Ansteigen des Lungengewichts. Lungen, die während der Flowsteigerungsphase einen solchen unüblichen Kurvenverlauf boten, wurden nicht weiter für einen Versuch verwendet.

Lungen, bei denen sich stabile Werte für das Gewicht und den pulmonalarteriellen Druck eingestellt hatten, wurden ein zweites Mal mit 200 ml frischem Perfusat gespült, bevor das Gewicht nun manuell auf Null gesetzt wurde.

Im Anschluss daran erfolgte eine fünfzehnminütige „steady-state“-Periode, in der das Lungengewicht höchstens um ein Gramm vom Nullwert abweichen durfte, der Pulmonalarteriendruck um höchstens 2 mmHg .

Organe, die diese Stabilitätskriterien nicht erfüllten, wurden für die Versuche nicht verwendet. Gleiches galt für Lungen, die in den sichtbaren subpleural gelegenen Parenchymanteilen hämorrhagische Einlagerungen zeigten, welche sich während der ersten Spülphase nicht ausreichend entfernen ließen.

Wurde die „steady-state“-Periode entsprechend den gestellten Anforderungen durchlaufen, so schloss sich nun mit dem Zeitpunkt Null beginnend die eigentliche Versuchszeit an, und die Lungen aller Versuchsgruppen wurden 180 Minuten mit einer konstanten Rate von 200 ml pro Minute rezirkulierend perfundiert. Dabei wurde bis zum Versuchsende kein frisches Perfusat mehr beigemischt.

2.2 Humane Leukozyten

2.2.1 Spender

Die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) wurden vor jedem Perfusionsversuch jeweils frisch aus 100 ml venösem Vollblut separiert. Als Blutspender dienten dabei klinisch gesunde Angehörige des Klinikpersonals und Medizinstudenten.

Zur Antikoagulation wurde das Blut mit Heparin (Liquemin® der Firma Hoffmann La Roche AG, Grenzach Wyhlen) versetzt.

2.2.2 Isolierung der polymorphkernigen neutrophilen

Granulozyten

Die Separation der PMN erfolgte mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation unter Verwendung von Polymorphprep™ (AXIS-SHIELD PoC AS, Oslo, Norwegen) nach dem von Bøyum (1968) beschriebenen Verfahren. Polymorphprep™ ist eine sterile, gebrauchsfertige Lösung zur Isolierung von mono- und polymorphnukleären Zellen, deren wesentliche Wirkbestandteile aus Natrium-Diatrizoat und Dextran 500 bestehen. Die Dichte von Polymorphprep™ wird mit 1,113 +/- 0,001 g/ml angegeben, die Osmolalität mit 445 +/- 15 mOsm.

Bei diesem Verfahren wurden in 25 12ml-Zentrifugenröhrchen (Sarstedt-Röhrchen No. 55.468, Sarstedt AG und Co, Nümbrecht) jeweils 4 ml antikoaguliertes venöses Vollblut über eine Lage von 4 ml Polymorphprep™ geschichtet. Anschließend erfolgte die

Zentrifugation dieser Röhrchen für 35 Minuten bei 25° Celsius und 500g in einer Standzentrifuge (Hettich-Rotixa/RP, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen).

Bei der Zentrifugation bildeten sich in den Röhrchen zwei Leukozytenbanden aus, wobei die obere Bande den mononukleären Zellen entsprach und die untere Bande den polymorphkernigen neutrophilen Zellen.

Nachdem nun das überstehende Plasma-Polymorphprep™-Gemisch zusammen mit der ersten Leukozytenbande, also den mononukleären Zellen, mit einer kanülenarmierten Wasserstrahlpumpe vorsichtig abgesaugt wurde, konnte die Bande mit den PMN durch eine sterile Einmalpipette entnommen und in zwei Leuco Sep®-Röhrchen (Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland) aufgeteilt werden. Die Leuco Sep®-Röhrchen wurden zuvor mit etwas temperiertem Hanks-HEPES-Puffer (GIBCO, Paislay, Schottland) beschickt und anschließend vollständig mit der Pufferlösung aufgefüllt. Um die PMN zu waschen, erfolgte eine zweite Zentrifugation für 5 Minuten bei 25° Celsius und ebenfalls 500g.

Die PMN setzten sich dabei nahezu vollständig auf dem Boden der Röhrchen ab, so dass der Puffer-Überstand wiederum mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die PMN in ein weiteres Leuco Sep®-Röhrchen mit vorinkubiertem Nährmedium (siehe Rezeptteil) gegeben und in einem Wasserbad bei 36° Celsius bis zum weiteren Gebrauch aufbewahrt werden konnten.

Kurz vor der Injektion der PMN in das Perfusionssystem erfolgte eine letzte Zentrifugation unter den gleichen Bedingungen wie beim Waschen der Zellen. Der Überstand der Nährlösung wurde abgesaugt und die am Boden des Röhrchens befindlichen PMN in 10 ml Perfusionslösung resuspendiert und in eine 10 ml Spritze zur Verabreichung in das Perfusionssystem aufgezogen.

Auf diese Weise konnten pro Versuch 250-300 Millionen polymorphkernige neutrophile Leukozyten isoliert werden. Die Zählung erfolgte nach dem Widerstandsmeßprinzip mit einem Sysmex KX21-Counter (Sysmex, Hamburg, Deutschland).

2.2.3 Vitalitätsprüfung der isolierten Zellen

Um die Vitalität der isolierten Zellen zu verifizieren wurde bei jedem Versuch ein Anfärbeversuch mit Trypan-Blau durchgeführt. Zellen mit beschädigter Membran färbten sich dabei blau an. Ihr Anteil konnte unter dem Mikroskop in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und auf diese Weise Zellsuspensionen mit einem hohen Anteil beschädigter Zellen (>5%) verworfen werden.

2.2.4 Stimulierung der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten

Um die PMN zu stimulieren, wurden zwei verschiedene Methoden angewandt.

Bei den Perfusionsversuchen sollte eine Aktivierung in der Lungestrombahn erfolgen. Dazu wurden zehn Minuten nach Injektion der PMN in das Perfusionssystem 2 ml der hergestellten Zymosan-Gebrauchslösung (siehe Rezeptteil) in das Zirkulationssystem verabreicht.

Zymosan ist ein Polysaccharid des Hefepilzes *Saccharomyces cerevisiae*, das für die PMN einen Reiz darstellt, den sie mit Phagozytose und Ausschüttung lysosomaler Enzyme beantworten.

Im Rahmen der in-vitro Versuche wurden die PMN mit hitzeaggregiertem humanem Immunglobulin G (siehe Rezeptteil) stimuliert. Die Aggregate rufen ebenfalls eine Phagozytosereaktion hervor.

2.3 Perfusionsversuche

2.3.1 Kontrollversuche ohne Zugabe von Inhibitoren (n=7)

In dieser Versuchsgruppe wurde die Lunge nach Erreichen des steady state 180 Minuten lang ohne Zugabe von Cyclooxygenaseinhibitoren, PMN und Calpaininhibitoren perfundiert.

2.3.2 Kontrollversuche unter Zugabe einer Inhibitorenmischung (n= 7)

Bei diesen Versuchen wurde dem Perfusat zum Zeitpunkt –10 min. ein Inhibitorencocktail bestehend aus 2 ml Diclofenac-, 2 ml Web- und 1 ml Heparin-Gebrauchslösung zugegeben. Die entsprechenden Konzentrationen im Perfusat betragen für Diclofenac 10 µg/ml, für WEB 2086 10^{-4} mol/l und für Heparin 5 U/ml.

2.3.3 Kontrollversuche unter Zugabe einer Inhibitorenmischung und stimulierter Granulozyten (n=7)

In dieser Versuchsgruppe wurde dem Perfusat ebenfalls zum Zeitpunkt –10 der oben erwähnte Inhibitorencocktail zugemischt. Zusätzlich wurden zum Zeitpunkt Null ca. 250-300 Mio. in Perfusat suspendierte PMN über das Zirkulationssystem in die Pulmonalarterie injiziert und zum Zeitpunkt +10 mit Hilfe von 2 ml Zymosan-Gebrauchslösung intravasal aktiviert.

2.3.4 Hemmversuche mit A-705253 (n=7)

Bei identischem Versuchsmanagement bezüglich steady state, Verabreichung von Inhibitorencocktail, PMN und deren Aktivierung, wurde dem Perfusat bei diesen Versuchen zum Zeitpunkt -10 der spezifische Calpaininhibitor A-705253 in einer Dosierung von 10^{-8} mol/l zugegeben.

2.3.5 Hemmversuche mit Cariporide® (n= 7)

In dieser Versuchsgruppe wurde bei sonst gleichem Vorgehen nicht A-705253, sondern der NHE-Hemmer Cariporide® in einer Dosierung von 10^{-8} mol/l verabreicht.

2.3.6 Hemmversuche mit A-705253 und Cariporide® (n=7)

Unter identischen Bedingungen, wie bei den anderen Hemmversuchen, wurden dem Perfusat in dieser Reihe sowohl A-705253 als auch Cariporide® in einer Dosierung von jeweils 10^{-8} mol/l zum Zeitpunkt -10 beigefügt.

2.4 In-vitro-Versuche zur Freisetzung von Elastase aus stimulierten Granulozyten

2.4.1 Kontrollversuche (n= 6)

Diese Versuche wurden ohne Aktivierung der im Blut enthaltenen PMN durchgeführt. Für die Untergruppe A wurden in einem Cellstar®-Röhrchen (Greiner bio-one) 25 ml heparinisiertes Vollblut

für 24 Stunden auf einer Schwenkplatte bei Raumtemperatur gelagert. Zu den Zeitpunkten 0, 6 und 24 Stunden wurden Proben für die spätere Bestimmung der Elastasekonzentration entnommen und bei -21 Grad Celsius aufbewahrt.

Bei den Experimenten der Untergruppe B wurde den Röhrcchen bei sonst identischem Vorgehen $125 \mu\text{l}$ A-705253 in der Konzentration 10^{-4} mol/l beigemischt.

2.4.2 Hemmversuche mit A-705253 (n=6)

Auch diese Versuchgruppe wurde in Untergruppen unterteilt.

Bei Versuchen der Gruppe C wurden $22,5 \text{ ml}$ heparinisiertes Vollblut mit $2,5 \text{ ml}$ suspendiertem, hitzeaggregiertem Immunglobulin G (siehe Rezeptteil) vermischt und wie die Kontrollversuche für 24 Stunden bei Raumtemperatur auf einer Schwenkplatte aufbewahrt.

Den Versuchen der Untergruppe D wurden bei sonst gleichem Versuchsmanagement wie bei der Gruppe C $125 \mu\text{l}$ A-705253 in der Konzentration 10^{-4} mol/l zugesetzt.

Auch bei den beiden Gruppen der Hemmversuche wurden nach 0, 6 und 24 Stunden Proben zur Bestimmung der Elastasekonzentration entnommen und bei $-21 \text{ }^\circ\text{C}$ asserviert.

2.5 Elastasebestimmung

Für die Bestimmung der PMN-Elastasekonzentration wurden die Perfusatproben zur Komplexbildung der freien Elastase zunächst mit humanem Alpha-1-Proteaseinhibitor ($12,5 \text{ mg/ml}$) bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ über 24

Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Elastasekonzentration im Perfusat mit Hilfe des Enzym-Immunoassays 12598 von Merk (Darmstadt, Germany) bestimmt.

Bei den in-vitro Versuchen wurden die Blutproben 10 min bei 1500 g zentrifugiert und die Bestimmung der Elastase aus dem leukozytenfreien Plasma durchgeführt.

2.6 Rezeptteil

2.6.1 Gebrauchsfertige Lösungen / Suspensionen

Diclofenac-Lösung

0,4 ml Voltaren® wurden mit 9,6 ml NaCl 0,9% zu einer Injektionslösung von 1mg Diclofenac/ml gemischt und bis zur Verwendung bei 4° C gelagert.

Immunglobulin-Suspension

3200 mg Beriglobin® wurden in 620 ml PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung) suspendiert und bei 63° C über 80 Minuten inkubiert. Diese Suspension wurde anschließend mit 1500 g bei 4°C zentrifugiert und der entstandene Überstand über dem Pellet entfernt. Das Pellet wurde zur weiteren experimentellen Verwendung in 128 ml Krebs-Henseleit-HAES-Pufferlösung durch Ultraschall resuspendiert und in Portionen zu je 200 mg hitzedenaturiertem Immunglobulin (je 8 ml) bis zur Verwendung bei –30° C gelagert.

Heparin-Lösung

5000 U Liquemin® (1 ml) wurden mit 4 ml NaCl 0,9 % zu einer Injektionslösung von 1000 U Heparin/ml gemischt und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

WEB 2086-Lösung

45,59 mg WEB 2086 wurden in 10 ml NaCl 0,9% gelöst, zu je 1 ml portioniert und bis zum Gebrauch bei –30° C gelagert.

Zymosan-Suspension

500 mg Zymosan-A von *Saccharomyces cerevisiae* wurden in 50 ml Aqua dest. aufgekocht, unter sterilen Bedingungen zu je 1 ml Portionen abgefüllt (Eppendorff-Hütchen) und bis zum Gebrauch bei 4 °C aufbewahrt.

2.6.2 Inhibitoren / Reagenzien / Pharmaka

A-705253 (Abbott, Ludwigshafen, Deutschland)

Cariporide® (Hoechst-Marion-Roussel, Frankfurt/Main, Deutschland)

Diclofenac-Natrium Voltaren® (Ciba-Geigy, Wehr, Deutschland)

Immunglobulin	Beriglobin® (Aventis-Behring, Marburg, Deutschland)
Heparin	Liquemin ® (Hoffmann-La Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland)
Lidocainhydrochlorid	Xylocain® 2% (Astra Chemicals, Wedel, Deutschland)
Pentobarbital-Natrium	Narcoren® (Rhône Merieux, Laupheim, Deutschland)
Polymorphprep®	(Axis-Shields PoC AS, Oslo, Norwegen)
WEB 2086	(Boehringer, Ingelheim, Deutschland)
Zymosan A	(Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Enzym-Immunoassay 12589	(Merck, Darmstadt, Deutschland)

2.6.3 Infusionslösungen

Aqua ad injectabilia	(Aqua destillata)
	(B.Braun, Melsungen, Deutschland)

Glucosemonohydrat 10% (G 10%®)

(B.Braun, Melsungen, Deutschland)

10% poly-0-2-

hydroxyethylstärke

(HAES-steril 10% ®)

(Fresenius AG, Bad Homburg,
Deutschland)

Natriumchlorid 0,9%

(NaCl 0,9 %)

(Fresenius AG, Bad Homburg,
Deutschland)

2.6.4 Nährmedium

RPMI mit NaHCO₃

(Medium RPMI 1640, Boehringer,
Mannheim, Deutschland)

fetales Kälberserum

(Boehringer, Mannheim, Deutschland)

Streptomycin-Penicillin

(Boehringer, Mannheim, Deutschland)

2.6.5 Perfusionslösung

Modifizierte Krebs-Henseleit-HAES-Pufferlösung (KHHP)

Zusammensetzung:

65,0 Volumenanteile HAES-steril 10%®

20,0 Volumenanteile Elektrolytlösung

12,5 Volumenanteile NaHCO₃ 0,9%

2,50 Volumenanteile Glucose-Lösung 10%

Der pH-Wert des Perfusats wurde vor Gebrauch mit 1M NaHCO₃ auf Werte zwischen 7,35 und 7,45 eingestellt.

Zusammensetzung der Elektrolytlösung:

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

Errechnete Elektrolytkonzentrationen im KHHP:

Na ⁺	138,0 mmol/l
K ⁺	4,50 mmol/l
Cl ⁻	110,8 mmol/l
Ca ⁺⁺	2,38 mmol/l
Mg ⁺⁺	1,33 mmol/l
PO ₄ ⁻	1,10 mmol/l

2.6.6 Pufferlösung

Hanks-Hepes-Puffer:

900 ml	Aqua destillata
100 ml	Hanks BSS (Buffered Saline Solution) 10% ohne Calcium (Gibco, Paisley, Schottland)
6 g	Hepes Cell Culture ® (Sigma, St. Louis, USA)

2.7 Statistische Verfahren

Die Datenauswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm Statgraphics-Plus® von Statistical Graphics Cooperation, USA. Die Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Unterschiede zwischen den Versuchsreihen wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und Fisher's multiplen Vergleichstest (least significant differences, LSD) untersucht. Werte für $p < 0.05$ wurden als signifikant gewertet.

Die graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe des Programms Stanford Graphics Version 3.0.

3. Ergebnisse

3.1 Perfusionsversuche

3.1.1 Verhalten des Lungengewichts

Bei ausschließlicher Injektion von Diclofenac und WEB 2086 stieg das Organgewicht bis zum Versuchsende auf $1,8 \pm 1,4$ g, bei Verabreichung von Zymosan ohne isolierte PMN auf $2,5 \pm 3,0$ g an.

Nach Injektion und anschließender intravasaler Stimulierung von frisch isolierten PMN durch Zymosan, stieg, mit einer Latenz von ca. 45 min, das Lungengewicht bei den unbehandelten Kontrollen im Versuchsverlauf kontinuierlich als Ausdruck einer extremen pulmonalen Flüssigkeitsextravasation signifikant im Vergleich zu den Versuchen ohne PMN-Aktivierung ($p < 0,0001$) auf $16,5 \pm 3,1$ g an.

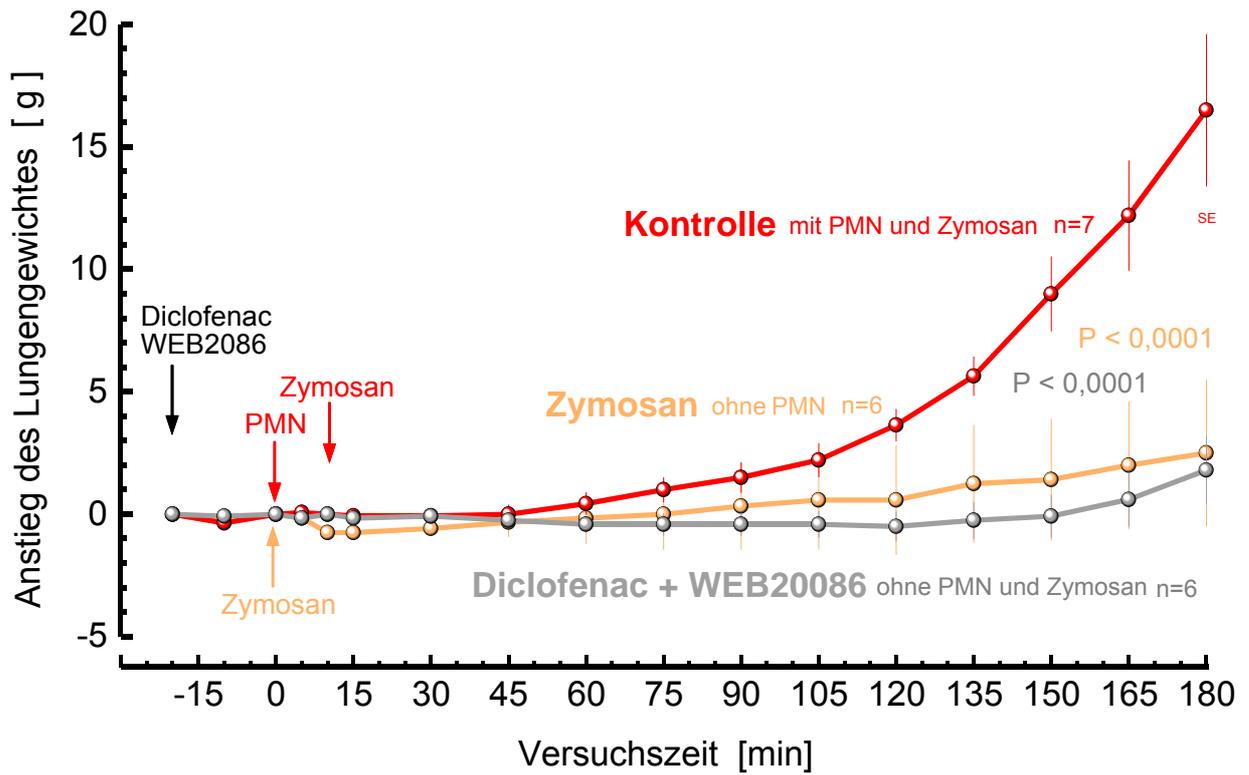


Abb. 2 Exzessiver Anstieg des Gewichtes isoliert perfundierter Kaninchenlungen als Ausdruck einer pulmonalen Ödembildung nach intrapulmonaler Injektion von stimulierten humanen Granulozyten (PMN) und nachfolgender Stimulation mit Zymosan. Die Verabreichung von Zymosan ohne frisch isolierte PMN und die ausschließliche Verabreichung von Diclofenac und WEB 2086 haben nur einen unwesentlichen Einfluss auf das Organgewicht.

Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

Die Verabreichung von Calpaininhibitor A-705253, von Cariporide® oder von beiden Inhibitoren zusammen, schwächte die Gewichtszunahme im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle hochgradig ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$) ab. A-705253 zeigte dabei als Monotherapeutikum die stärkste hemmende Wirkung.

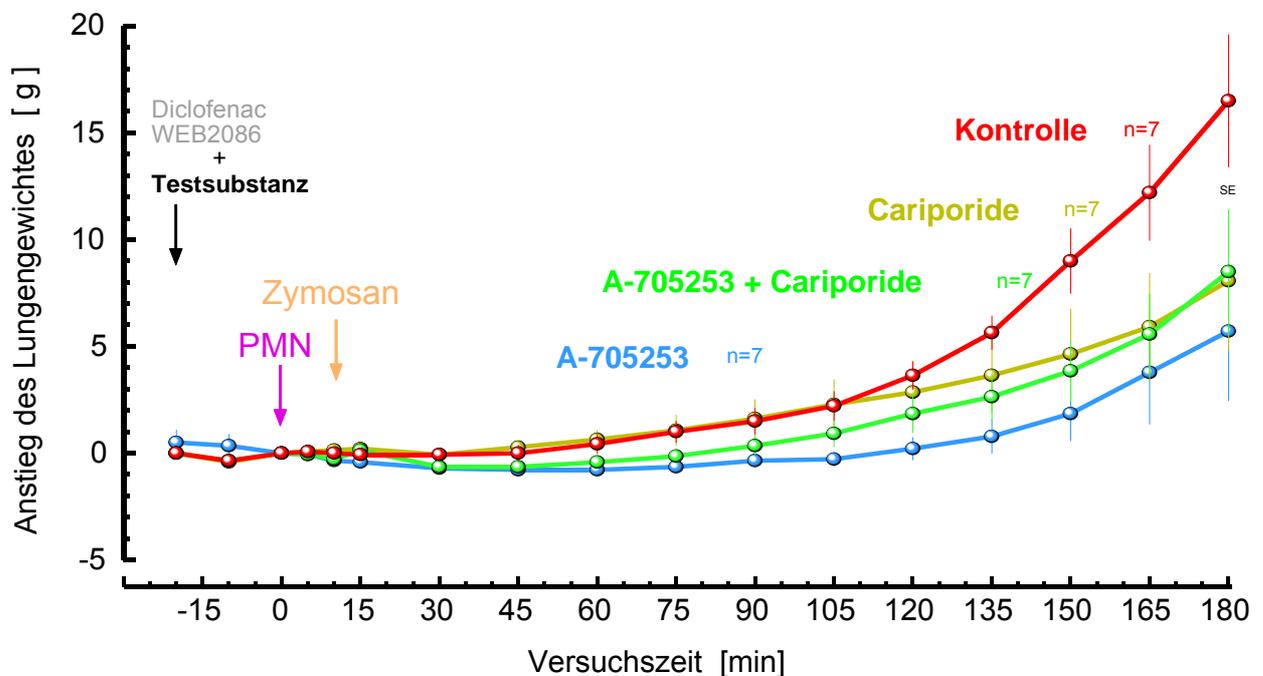


Abb.3: Wirkung einer Calpaininhibition und/oder einer Hemmung des Na^+ - H^+ - Austausch auf die Ausbildung eines Lungenödems mit Anstieg des Organgewichtes nach intravasaler Aktivierung injizierter humaner Granulozyten (PMN) in isoliert perfundierte Kaninchenlungen. Durch vorherige Verabreichung von Calpaininhibitor A-705253 (blaue Kurve), von Cariporide® (gelbe Kurve) oder von beiden Inhibitoren zusammen (grüne Kurve) wird die Ödembildung signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (rote Kurve) vermindert. Um funktionelle Veränderungen von Gefäßtonus und Gefäßpermeabilität durch Freisetzung von Lipidmediatoren zu verhindern, wurde dem Perfusat Diclofenac und WEB 2086 zugesetzt.

Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

3.1.2 Verhalten des Perfusionsdrucks

Behandelte und unbehandelte Lungen unterschieden sich in ihrem Druckverhalten nicht.

Bei allen Versuchsgruppen fiel der pulmonalarterielle Mitteldruck mit der intrapulmonalen Verabreichung der isolierten PMN bis zur Zymosaninjektion kurzzeitig im Mittel zwischen 0,9 und 1,5 mmHg ab.

Nach nun zunächst konstantem Druckverlauf stieg der Perfusionsdrucks bei allen Gruppen mit Ausnahme der mit Cariporide® behandelten Lungen mit einer Latenz von ca. 60 bis 90 Minuten bis zum Versuchsende geringgradig im Mittel zwischen 3,8 und 4,3 mmHg über die jeweiligen Ausgangswerte an.

Bei alleiniger Injektion von Diclofenac und WEB 2086 sowie nach Verabreichung von Zymosan ohne frisch isolierte PMN stieg der pulmonalarterielle Druck im Mittel nur um 1,7 bzw. 1,4 mmHg an.

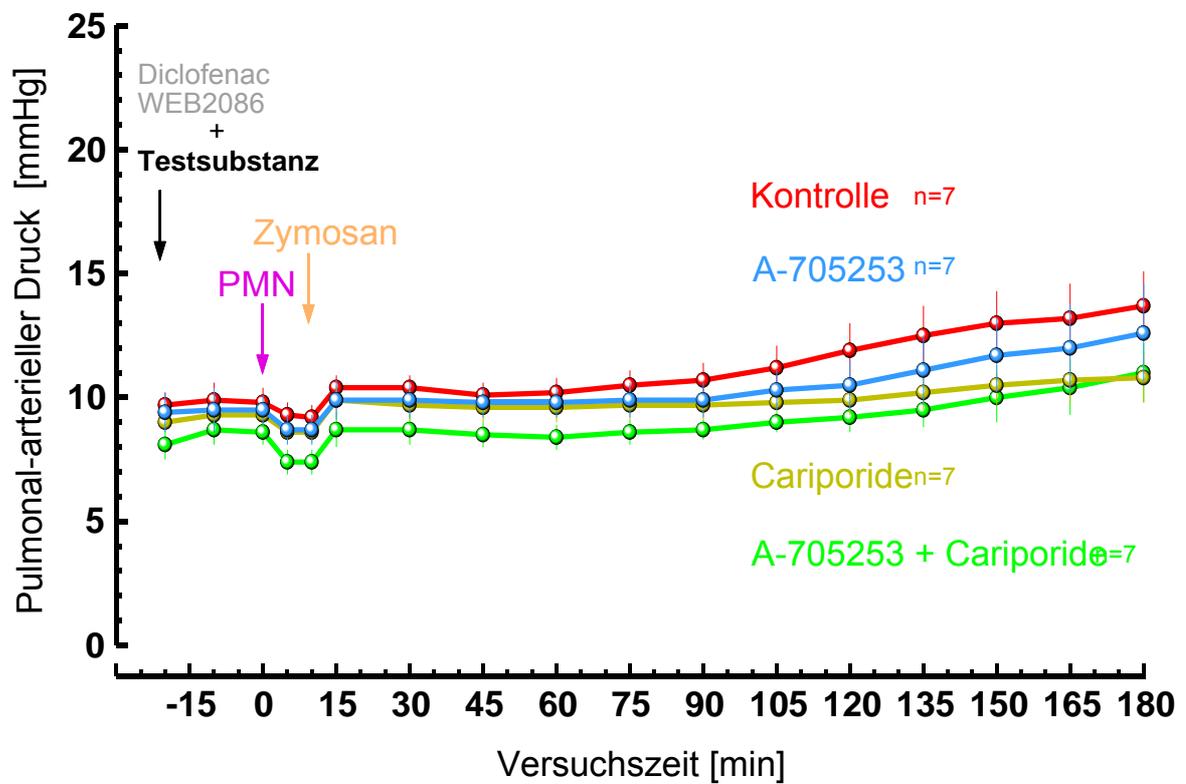


Abb. 4: Verhalten des pulmonalarteriellen Druckes (Perfusionsdruck) nach intravasaler Aktivierung injizierter humaner Granulozyten (PMN) in isoliert perfundierte Kaninchenlungen. Behandelte und unbehandelte Lungen unterscheiden sich nicht in ihrem Druckverhalten. Um funktionelle Veränderungen von Gefäßtonus und Gefäßpermeabilität durch Freisetzung von Lipidmediatoren zu verhindern, wurde dem Perfusat Diclofenac und WEB 2086 zugesetzt.

Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

3.1.3 Freisetzung von PMN-Elastase ins Perfusat

Bei allen Perfusionsexperimenten wurde nach intrapulmonaler Injektion isolierter humaner Granulozyten (PMN) mit nachfolgender Aktivierung durch Zymosan zunehmend PMN-Elastase ins Perfusat freigesetzt.

Unter Calpainhemmung durch A-705253 und Na⁺- H⁺- Austausch-Hemmung durch Cariporide®, oder unter der Kombination von beiden Inhibitoren war diese Freisetzung signifikant ($p < 0,01$) vermindert, wobei unter Calpaininhibition die stärkste Hemmung zu beobachten war.

Unter Vorbehandlung mit A-705253 erreichte die Elastasekonzentration im Perfusat bis zum Versuchsende nur Werte von $73,9 \pm 2,6 \mu\text{g/l}$, bei Vorbehandlung mit Cariporide® von $88,9 \pm 1,6 \mu\text{g/l}$ und bei Kombination beider Stoffe von $78,4 \pm 4,6 \mu\text{g/l}$.

Im Vergleich dazu stieg die Elastasekonzentration bei den unbehandelten Kontrollen auf $112,4 \pm 9,5 \mu\text{g/l}$.

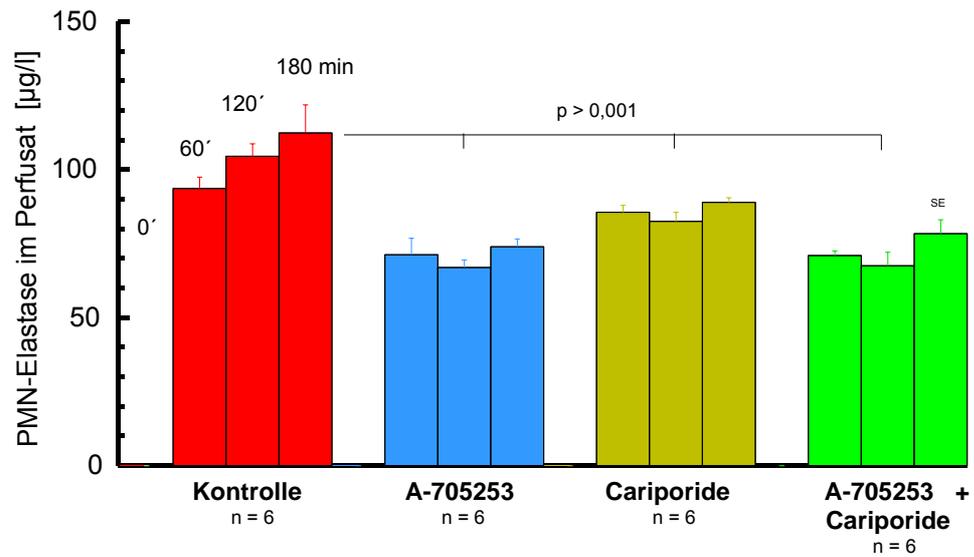


Abb. 5: Wirkung einer Calpaininhibition und/oder einer Hemmung des Na^+ - H^+ - Austausches auf die Freisetzung von Elastase nach intravasaler Aktivierung injizierter humaner Granulozyten (PMN) durch Zymosan in isoliert perfundierten Kaninchenlungen. Durch vorherige Verabreichung von Calpaininhibitor A-705253 (blaue Säulen), von Cariporide® (gelbe Säulen) oder von beiden Inhibitoren zusammen (grüne Säulen) wird die Freisetzung signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (rote Säulen) vermindert.

Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

3.2 In-vitro-Versuche zur Freisetzung von Elastase aus stimulierten Granulozyten

Die spontane Freisetzung von Elastase in heparinisiertem Vollblut konnte durch den Calpaininhibitor A-705253 ebenfalls vermindert werden und erreichte innerhalb von 24 Stunden Plasmakonzentrationen von $244,1 \pm 53,6 \mu\text{g/l}$ bzw. $294,3 \pm 59,3 \mu\text{g/l}$ bei den unbehandelten Proben.

Durch Stimulierung der Elastasefreisetzung mittels hitzeaggregiertem Immunglobulin wurden ohne Zusatz des Inhibitors A-705253 nach 24-stündiger Inkubation Plasmakonzentrationen von $536,4 \pm 1,2 \mu\text{g/ml}$ erreicht, mit Zusatz von A-705253 signifikant niedrigere Werte ($p < 0,05$) von $334,34 \pm 93,5 \mu\text{g/l}$.

Die Bestimmungsmethode zur Erfassung der freigesetzten PMN-Elastase wird durch den Calpaininhibitor A-705253 nicht beeinflusst.

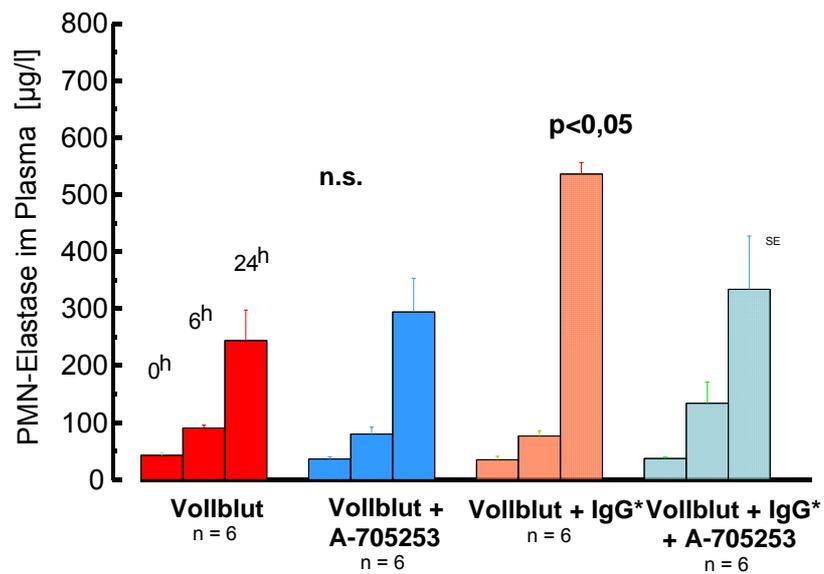


Abb.6: Wirkung des Calpaininhibitors A-705253 auf die spontane und mit hitzedenaturierten Immunglobulinen stimulierte Freisetzung von Elastase aus heparinisiertem, humanem Spenderblut.

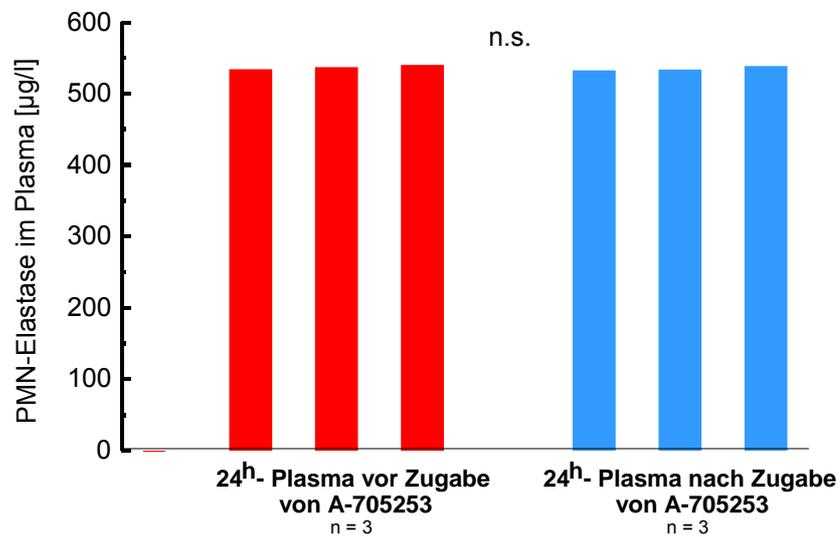


Abb. 7: Fehlender Einfluss des Calpaininhibitors A-705253 auf die Methode zur Bestimmung der PMN-Elastasekonzentration im Plasma.

Dargestellt sind je 3 einzelne Versuchsansätze.

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnten an dem von Neuhof und Mitarbeitern beschriebenen Modell der isoliert ventilierten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge (Neuhof et al. 1985) Hinweise gewonnen werden, dass durch die Zugabe des von Lubisch et al. (2003) synthetisierten Calpaininhibitors A-705253 oder des Na⁺-H⁺-Austausch-Hemmers Cariporide® (4-isopropyl-3-methylsfonyl-benzoylguanidin-methansulfonat) die Entstehung eines durch Stimulation von humanen polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) ausgelösten Lungenödems vermindert werden kann.

Die Perfusion der isoliert ventilierten Kaninchenlunge erfolgte mit einer zell- und plasmafreien Krebs-Henseleit-HAES-Lösung, um die Interaktion mit den klassischen humoralen Kaskadensystemen zu vermeiden und den Einfluss von Calpaininhibitor A-705253 und Cariporide® auf die von aktivierten Granulozyten ausgeschüttete PMN-Elastase zu untersuchen.

Um die Wirkung der vasoaktiven, nicht-proteolytischen Faktoren, vor allem der Arachidonsäure-Stoffwechselprodukte, auf den Gefäßtonus und die Gefäßpermeabilität zu unterbinden, wurde zusätzlich ein Inhibitor-Cocktail bestehend aus Diclofenac und WEB 2086 appliziert.

Das nichtsteroidale Antiphlogistikum Diclofenac blockiert dabei die Bildung von Arachidonsäuremetaboliten durch die Cyclo- und

Lipoxygenase nach Stimulation der PMN (Koch et al. 1992, Ku et al. 1986, Schro und Seidel 1988). Der Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks und die zunehmende kapillare Flüssigkeitsextravasation, die bei den völlig unbehandelten Perfusionsversuchen beobachtet werden konnten, ließen sich durch dieses Vorgehen verhindern.

Für den Anstieg des pulmonalen Widerstands, und damit des pulmonalarteriellen Drucks, wird vor allem die Vasokonstriktion durch das Cyclooxygenaseprodukt Thromboxan (TXA₂) verantwortlich gemacht (Farrukh et al. 1985, Malik et al. 1985, Seeger et al. 1982, 1983, 1985). Thromboxan wird im Lungengewebe durch die Cyclooxygenase aus der Arachidonsäure synthetisiert (Seeger et al. 1983). Diese Reaktion wird wahrscheinlich über eine Endothelläsion durch reaktive Sauerstoffprodukte aus dem "respiratory burst" stimuliert (Baird et al. 1986, Böhm 1994).

Lipoxygenaseprodukte wie Leukotriene und andere erhöhen die vaskuläre Permeabilität der Lungengefäße (Bray et al. 1981, Dahlen et al. 1981, Gay et al. 1984, Samuelsson 1983). Sie fördern außerdem die Chemotaxis, Migration und Adhärenz von Granulozyten an die Gefäßwand (Gay et al. 1984, Lee et al. 1987, Malik et al. 1985, Palmblad et al. 1981, Staub et al. 1985), aus denen sie zu einem großen Teil selbst synthetisiert und liberiert werden (Böhm 1994, Martin 1987).

Durch die Gabe von WEB 2086 wurde der Einfluss des Plättchen-Aktivierenden Faktors (PAF) auf das Lungengewebe und die Lungenstrombahn unterdrückt (Casals-Stenzel et al. 1987, Chen et al. 1992, Evans et al. 1988, Johnson et al. 1990, Koch et al. 1994,

Korth et al. 1989, McCormack et al. 1990, Sakamoto et al. 1993, Schaberg et al. 1991, Siebeck et al. 1994, Stahl et al. 1989). In der Pathogenese des ARDS und bestimmter Schockformen wird dem PAF eine wichtige Rolle zugeschrieben (Chang et al. 1987, Heuer et al. 1989, Huang et al. 1993, Matsumoto et al. 1992, Siebeck et al. 1994, Stahl et al. 1989). Dementsprechend konnten in der Bronchiallavageflüssigkeit von ARDS-Patienten deutlich erhöhte Mengen an PAF nachgewiesen werden (Matsumoto et al. 1992). Erhöhte Mengen an PMN, Albumin und Wasser nach Applikation von PAF konnten von Wortchen et al. (1983) bereits in Kaninchenlungen festgestellt werden. Das menschliche Lungengewebe enthält ferner spezifische Paff-Rezeptoren, die einen Zusammenhang des Mediatoren mit der Pathophysiologie einiger Lungenerkrankungen wahrscheinlich machen (Hwang et al. 1985).

PAF wird von PMN und verschiedenen anderen Zellpopulationen im Menschen und Kaninchen gebildet (Chang et al. 1987, Lotner et al. 1980, Lynch et al. 1979, Samet et al. 1992, Warren 1990). Es wirkt aktivierend und chemotaktisch auf Leukozyten und Thrombozyten (Braquet et al. 1987, Cusack 1980, Krögel et al 1989, Samet et al 1992, Warren et al. 1992, Wortchen et al. 1983) und erhöht direkt und indirekt über die Bildung von Arachidonsäuremetaboliten, wie Leukotrien C4 und TXA2, den Tonus und die Permeabilität der Lungengefäße (Braquet et al. 1987, Casals-Stenzel et al. 1987 , Chen et al. 1992 , Davidson et al. 1990 , Huang et al. 1993 und 1994, Lohman et Halonen 1993 , Mc Cormack et al. 1990 , Pedersen et al. 1991 , Sakamoto et al. 1993 , Shibamoto et al. 1993 , Worthen

et al. 1983). PAF scheint andererseits seine Wirkung auf Endothelien über die Bildung von reaktiven O₂-Spezies zu modulieren (Huang et al. 1993 , Schaberg et al. 1991).

Auf die Gabe von Histamin-Antagonisten wurde in der vorliegenden Untersuchung verzichtet. Histamin wird von Mastzellen und basophilen Granulozyten gebildet und sezerniert. Die Mastzellen befinden sich im Lungenparenchym, je nach pathophysiologischer Bedingung in schwankender Anzahl, vor allem perivaskulär (Haas und Bergofsky 1972 , Kay et al. 1974).

Die Effekte von Histamin auf die Compliance der Lungengefäße und den vaskulären Widerstand wurden in zahlreichen Studien untersucht (Hakim et al. 1982, Hyman 1969, Rippe et al. 1984). Stimulation von H₁-Rezeptoren führt zu pulmonaler Broncho- und Vasokonstriktion , wobei der Anstieg des pulmonalkapillären Drucks über einen Anstieg des postkapillären Widerstands erfolgt (Hyman 1969, Rippe et al. 1984, Tate et al. 1982, Hakim et al. 1982). Stimulation der H₂-Rezeptoren hingegen führt zur Erhöhung der Gefäßpermeabilität und zur pulmonalen Vasodilatation (Barman und Taylor 1989, Tucker et al. 1975, Korthuis et al. 1984). Der Permeabilitätsanstieg ist hierbei durch eine vorübergehende Erweiterung der Zwischenzellabstände der venösen Endothelzellen bedingt (Majno und Palade 1961, Rowley 1964, Casley-Smith und Window 1976).

In mehreren Voruntersuchungen und früheren Untersuchungsreihen zeigte sich jedoch keine Veränderung des Lungengewichts und des pulmonalarteriellen Drucks durch fehlende Histaminantagonisierung,

so dass in der vorliegenden Untersuchung auf Histamin-Antagonisten verzichtet wurde.

Um eine pulmonale Permeabilitätsstörung auszulösen, wurden humane PMN verwendet. Kaninchen-PMN lassen sich im Gegensatz zu menschlichen PMN nur zu einem geringeren Teil separieren und werden dabei teilweise aktiviert (Martin 1987). Ins Perfusionssystem injiziert, lässt sich nach ca. 60 Minuten eine Leukozytenadhäsion von etwa 90% im pulmonalen Gefäßbett nachweisen (Martin 1987). Zudem ließen sich so die vorhandenen immunologischen Assays zur Bestimmung menschlicher PMN-Elastase gebrauchen.

Für die vorliegende Untersuchung wurden jeweils durchschnittlich $250-300 \times 10^6$ PMN aus 100 ml menschlichem, heparinisiertem Vollblut nach dem von Bøyum (1968) beschriebenen Verfahren separiert. Dabei wurde eine Dichtegradientenzentrifugation mit Polymorphprep™ (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norwegen) durchgeführt und die so gewonnenen PMN in 10 ml Perfusatlösung resuspendiert. Bei den Versuchsreihen wurde diese Suspension dann mittels einer Spritze distal des 40 µm-Filters in den arteriellen Schenkel des Perfusionssystems injiziert. Nach der ersten Passage der PMN durch das pulmonale Kapillarsystem kommt es bereits zu einem Leukozytentrapping von etwa 80% bis 90%, das mit zunehmender Perfusionszeit weiter zunimmt (Lien et al. 1987, Martin 1987, Shaw und Henson 1982). Diese Adhäsion von nicht stimulierten PMN führt zu keiner physiologisch und histologisch nachweisbaren Schädigung des Lungenparenchyms (Martin 1987, Shaw et Henson 1982).

Zur Stimulation der PMN wurde bei den vorliegenden Perfusionsversuchen nicht-opsoniertes Zymosan A in der im Rezeptteil beschriebenen Konzentration verwendet. Zymosan A verweilt als unlöslicher, korpuskulärer Phagozytosestimulus intravasal und aktiviert die intravasalen Granulozyten u. a. zur Freisetzung ihrer lysosomalen Enzyme (Williams et al. 1986, Le Cabec et al. 2002). Die PMN reagieren dabei zu fast 100% mit einer Phagozytosereaktion auf die Anwesenheit von Zymosan A (Stoika et al. 2001).

Bei den Versuchen zur Hemmbarkeit der Elastasefreisetzung aus PMN in-vitro, wurden die PMN mit hitzedenaturiertem Immunglobulin G (IgG) stimuliert. Dieses wurde nach der Methode von Henson et al. (1972) hergestellt. Hitzeeinwirkung führt zu einer Aggregatbildung, die, ebenso wie Antigenbindung, eine Konformationsänderung des IgG-Moleküls bewirkt. Die biologische Aktivität des Moleküls, speziell des Fc-Stücks, wird dabei nicht beeinträchtigt (Weissmann et al. 1974). Das Fc-Stück bindet an Oberflächenrezeptoren auf menschlichen PMN (Messner und Jelinek 1970) und stellt so einen mit Komplementkomponenten, Bakterienpeptiden oder Immunkomplexen vergleichbaren physiologischen Stimulus dar (Klebanoff 1980).

Um die kapilläre Flüssigkeitsextravasation in die Lunge zu erfassen, wurde kontinuierlich das Lungengewicht gemessen. Der pulmonalarterielle Druck wurde zur Überwachung der intrapulmonalen Vasomotion ebenfalls kontinuierlich über einen Katheter im Truncus pulmonalis gemessen.

In den Versuchsgruppen 1 und 2 wurden die Lungen in Abwesenheit chemischer Substanzen (1), bzw. unter PAF- und Cyclooxygenase-Inhibition (2) perfundiert. Sie dienten dem Ausschluss einer pulmonalen Ödembildung auf dem Boden der klassischen humoralen Kaskadensysteme nach dem o.g. Mechanismen. In beiden Gruppen konnte während der 180 Minuten Versuchszeit kein Hinweis auf die Entstehung eines Lungenödems gefunden werden. Frühere Untersuchung am Modell der zellfrei perfundierten Kaninchenlunge kommen dabei zu gleichen Ergebnissen (Böhm 1994, Alvarez 2002). Die Versuchsreihe 3 diente als Kontrollgruppe. Nach intravasaler Injektion von PMN und anschließender Aktivierung mit Zymosan, stieg bei diesen Lungen das Gewicht als Ausdruck einer extremen pulmonalen Flüssigkeitsextravasation kontinuierlich auf $16,5 \pm 3,1$ g an. Wurden jedoch nur Zymosan, bzw. Diclofenac und WEB 2086 ohne PMN injiziert, nahm das Lungengewicht bis zum Versuchsende lediglich um $2,5 \pm 3,0$ g, bzw. $1,8 \pm 1,4$ g zu ($p < 0,0001$). Das beobachtete Lungenödem wurde durch PMN-Elastase hervorgerufen, wie Neuhof et al. 1989 und 2003 bei Versuchen mit Elastaseinhibitoren zeigen konnten.

Durch vorherige Verabreichung von Calpaininhibitor A-705253, von Cariporide® oder von beiden Inhibitoren in Kombination wurde der Gewichtsanstieg im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle hochgradig abgeschwächt ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$). Die stärkste Hemmende Wirkung zeigte A-705253 als Monotherapeutikum.

Bei allen Lungen, behandelten und unbehandelten, lies sich ein gleichförmiger Verlauf des pulmonalarteriellen Drucks beobachten.

Nach der Injektion der PMN fiel er bis zur Verabreichung von Zymosan kurzzeitig im Mittel zwischen 0,9 und 1,5 mmHg ab.

Im weiteren Verlauf stieg der Perfusionsdruck mit einer Latenz von 60 bis 90 Minuten bei allen Gruppen bis zum Versuchsende im Mittel zwischen 3,8 und 4,3 mmHg an. Eine Ausnahme bildeten hier nur die mit Cariporide® behandelten Lungen, deren pulmonalarteriellen Drücke über die gesamte Versuchszeit annähernd gleiche Werte zeigten.

Die Extravasation des Perfusats ins Lungengewebe erfolgt daher in diesem Versuchsmodell nicht durch eine hämodynamisch bedingte Steigerung der kapillären Filtration, sondern über eine Zunahme des Filtrationskoeffizienten, wie bereits von Koch et al. (1992) beschrieben.

Diese Erhöhung des Filtrationskoeffizienten ist der gefäßschädigenden und permeabilitätssteigernden Wirkung der PMN-Elastase zuzuschreiben. Sie bewirkt einerseits eine proteolytische Spaltung von Strukturkomponenten der Basalmembran wie z.B. Laminin, Fibronectin und Typ IV Kollagen (Pipoly und Crouch 1987, Watanabe et al. 1990, Heck et al. 1990), andererseits einen Abbau der endothelialen junction proteins Cadherin und β -Catenin (Carden et al. 1998). Folge dieses Prozesses ist eine Ablösung von Endothelzellen und eine interzelluläre Spaltenbildung (gap formation) mit Störung der endothelialen Schrankenfunktion bis zum vasculären Leck (vascular leakage) (Harlan et al. 1981, Suttorp et al. 1993).

Bei den unbehandelten Kontrollversuchen stieg die Elastasekonzentration bis auf $112,4 \pm 9,5 \mu\text{g/l}$ an. Im Gegensatz

dazu erreichten die Elastasewerte bei Vorbehandlung mit A-705253 bzw. Cariporide nur $73,9 \pm 2,6 \mu\text{g/l}$, bzw. $88,9 \pm 1,6 \mu\text{g/l}$. Bei Kombination beider Stoffe $78,4 \pm 4,6 \mu\text{g/l}$. Für die Freisetzung der Elastase sind allein die injizierten humanen PMN verantwortlich. Zwar sind in der Lungenstrombahn noch Kaninchenleukozyten zu erwarten (Ermert et al. 1993), diese sind aber im vorliegenden Versuchsmodell nicht an der Ödementstehung beteiligt, wie die fehlende Reaktion bei den Kontrollversuche mit Zymosan ohne gleichzeitige Verabreichung von PMN zeigt.

Die niedrigsten Elastasekonzentrationen im Perfusat ($p < 0,01$) wurden unter Calpain-Inhibition mit A-705253 beobachtet, also in der Versuchsgruppe mit der ebenfalls geringsten Ödementwicklung.

In der Literatur lassen sich zur Zeit keine direkten Erkenntnisse über die Beteiligung des Calpainsystems an der Enzymfreisetzung aus Granulozyten finden, eine Beteiligung bei bestimmten PM-Funktionen ist aber durchaus denkbar. So enthalten diese Zellen μ - und m-Calpain (Legendäre und Jones 1988, Murachi et al. 1989). Für eine Verminderung der Elastase-Freisetzung aus PMN durch Calpaininhibition sind im Wesentlichen zwei Mechanismen denkbar.

Untersuchungen von Pontremoli et al. (1986, 1987, 1988) sprechen dafür, dass die für die Degranulation erforderliche Reorganisation des Zytoskeletts über den Abbau von Strukturproteinen durch eine gemeinsame, koordinierte Wirkung von Proteinkinase C und Calpain bewirkt wird. Pontremoli et al. hatten eine verminderte Degranulierung von Granulozyten nach Zugabe von monoklonalen

Anti-Calpain-Antikörpern beobachtet. Gleichzeitig war auch die Konversion der membrangebundenen Ca^{2+} /phospholipidabhängigen Proteinkinase C zu der aktiven, löslichen, Ca^{2+} /phospholipid-unabhängigen Form der Proteinkinase C vermindert. Auf diese Weise könnte die Degranulation von PMN durch Calpaininhibition behindert werden.

Eine weitere Erklärung für die unter Calpaininhibition geringere Elastasefreisetzung nach PM-Stimulation könnte in der Hemmung der Mobilisation von β -Integrin-Rezeptoren gesehen werden. β -Integrin-Rezeptoren sind für die Aktivierung und schnelle Phagozytose von PMN erforderlich und werden Calpain-mediert mobilisiert (Dewitt und Hallett, 2002). Weiterhin ist die Adhäsion neutrophiler Granulozyten am Endothel wesentlich abhängig von der Aktivierung der β 2-Integrine CD11b/CD18. Diese Aktivierung vollzieht sich durch Spaltung ihrer Bindungsproteine Actin und Talin zum Zytoskelett durch Calpaine (Walzog et al. 1994, Inomata et al 1996). Die Freisetzung von PMN-Elastase in engem Kontakt zum Endothel könnte somit durch Calpaininhibition vermindert werden. Der gleiche Effekt ist von der down-regulation der zur Leukozytenadhäsion notwendigen P-Selectin-Expression am koronaren Endothel unter Calpain-Hemmung bei Ischämie und Reperfusion zu erwarten (Ikeda et al. 2002). Aus diesem Versuchsmodell und den gewonnenen Messdaten kann nicht entnommen werden, inwieweit eine verminderte Endotheladhäsion der PMN zum beobachteten therapeutischen Nutzen der Calpain-

Inhibition beiträgt. Dazu wären weitere Untersuchungen notwendig, wie etwa die Messung des intrapulmonalen Leukozytenpools unter Calpaininhibition.

Für die protektive Wirkung des Calpain-Inhibitors A-705253 kommt nicht nur die Hemmung der proteolytischen Schädigung der Endothelbarriere durch PMN-Elastase in Betracht, sondern auch eine Verminderung funktioneller Störungen der Gefäßpermeabilität. Diese Veränderungen der endothelialen Schrankenfunktion werden durch Formveränderungen (rounding) der Endothelzellen mit interzellulärer Spaltenbildung (gap formation) bewirkt (Lum und Malik 1996). Dieser Vorgang wird zum einen durch die Proteinkinase C (PKC) bedingte Phosphorylierung von Bindungsproteinen der Zell-Zell und Zell-Matrix- Verbindungen gesteuert, die mit einer Endothelzellabrundung und vermehrten Permeabilität für Makromoleküle einhergeht (Lynch et al. 1990). Zum anderen führt eine Aktivierung der myosin light chain kinase (MLCK) zu einer Aktin-Myosin-medierten Kontraktion der Endothelzellen und damit zu einer endothelialen Formveränderung (Lum und Malik 1996). Es bestehen experimentelle Hinweise auf eine Beteiligung des Calpain-Systems an dieser Regulation der endothelialen Permeabilität.

Die Proteinkinase C wird so z.B. durch direkte proteolytische Konversion durch μ -Calpain aktiviert (Kishimoto et al. 1983). Weiterhin erfolgt indirekt auch die Aktivierung der MLCK über eine PKC bedingte Phosphorylierung (Naka et al. 1983). Eine Verminderung der durch die oben beschriebenen Prozesse

ausgelösten endothelialen Schrankenstörung durch Calpain-Inhibition, ist auf dem Boden dieser Mechanismen denkbar.

Es gibt derzeit in der Literatur keine direkten Untersuchungen zur Wirkung von Cariporide® auf die Enzymfreisetzung aus Leukozyten in der Lunge. Gut belegt ist dagegen seine kardioprotektive Wirkung bei Ischämie/Reperfusionsschäden des Herzens (Symons et al. 1998, Gumina et al. 1999). Dabei wird der Verhinderung eines Kalzium-Overloads der Myozyten durch Hemmung der Na^+ - H^+ -Pumpe und infolge dessen fehlender Aktivierung der Na^+ - Ca^{2+} -Pumpe die entscheidenden Rolle zugesprochen (Fröhlich und Karmazyn 1997).

In den vorliegenden Versuchen zeigte Cariporide® als Monotherapeutikum bezüglich der Elastase-Freisetzung aus PMN einen weniger stark ausgeprägten protektiven Effekt als A-705253 und als die Kombinationen beider Wirkstoffe. Die Elastase-Konzentration im Perfusat stieg unter Calpain-Inhibition mit A-705253 nur auf $73,9 \pm 2,6 \mu\text{g/l}$, unter NHE-Inhibition mit Cariporide® auf $88,9 \pm 1,6 \mu\text{g/l}$ und bei Kombination beider Wirkstoffe auf $78,4 \pm 4,6 \mu\text{g/l}$.

Die Kombination beider Stoffe ist therapeutisch nicht wirksamer als die alleinige Gabe von A-705253. Cariporide® alleine wiederum ist schlechter wirksam als die Kombinationen beider Stoffe. Diese Ergebnisse sprechen für eine Beziehung zwischen NHE-Inhibition und Calpain-Inhibition. Wie in der Einleitung bereits beschrieben, werden Calpaine kalziumabhängig aktiviert. Cariporide® wäre als NHE-Inhibitor in der Lage den intrazellulären Kalziumanstieg zu

vermindern und der Calpain-Aktivierung entgegen zu wirken. Zu der gleichen Vermutung kommen Chen et al. (2002) bei ihren Ischämie/Reperfusionversuchen.

Die Wirksamkeit von Cariporide® in Bezug auf die verminderte Elastase-Ausschüttung und der damit herabgesetzten Ödemneigung der Kaninchenlungen scheint also über eine indirekte Calpain - "Hemmung" erklärbar.

Redlin et al. (2001) konnten zudem zeigen, dass eine NHE-Inhibition postischämische inflammatorische Reaktionen vermindern kann. Die Leukozytenadhäsion -und migration sowie die L-selectin-Expression der aktivierten Leukozyten konnten bei ihren Versuchen durch Cariporide® gehemmt werden.

Ob es auch bei den vorliegenden Versuchsreihen zu entsprechenden Veränderungen der PMN oder zu einer Abnahme des pulmonalen Leukozytenpools durch NHE-Hemmung gekommen ist, lässt sich mit dem verwendeten Versuchsmodell nicht beantworten. Dazu wären mikroskopische und zytometrische Untersuchungen notwendig.

Die im Tierexperiment eindeutig nachweisbare Beziehung zwischen Calpain-Hemmung und verminderter HLE-Freisetzung aus aktivierten PMN, ließ sich auch bei den In-vitro-Versuchen bestätigen.

Die vorliegende Untersuchung zeigt eine eindeutige Beteiligung des Calpainsystems an der Ausbildung einer ALI im tierexperimentellen Modell und dessen therapeutische Beeinflussbarkeit. Sie kann einen kleinen Teil dazu beitragen, die bisher in weiten Teilen ungeklärte Pathophysiologie der ALI und des ARDS aufzuklären. Dazu sind eine

Vielzahl weiterer Experimente und Studien notwendig. Die Beeinflussung des Calpainsystems könnte in Zukunft auch therapeutisch interessant werden, denn wie in dieser Untersuchung gezeigt, kann die erste Phase der Entstehung von ALI und ARDS, die Entwicklung eines Lungenödems, durch geeignete Inhibitoren im Tierexperiment nahezu vollständig verhindert werden. Die klinische Calpain-Hemmung wäre durch das ubiquitäre Vorkommen und die scheinbar herausragende Rolle dieses Systems allerdings mit weit reichenden Risiken verbunden. Ob und wie ein sinnvoller therapeutischer Einsatz stattfinden kann, wird Gegenstand zukünftiger Studien sein.

Im experimentellen Bereich ergeben sich in verschiedenen Organsystemen vielversprechende Ansätze. So kann der zu Beginn der Reperfusionphase gegebener Calpaininhibitor A-705253 das Herzinfarktareal bei isoliert perfundierten Kaninchenherzen um über 60% verkleinern (Fabiunke 2005). Eine weitere Untersuchung, die das große therapeutische Potential einer Calpain-Hemmung unterstreicht.

5. Zusammenfassung

Die Ausbildung eines permeabilitätsbedingten Lungenödems stellt die erste Phase einer "Acute Lung Injury – ALI" dar, aus der sich im dramatischsten Fall ein "Adult Respiratory Distress Syndrome – ARDS" entwickeln kann.

Die Freisetzung humaner Leukozytenelastase (HLE) aus aktivierten polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) in die Perfusionsflüssigkeit führt im Modell der isoliert ventilerten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge zu einer extremen Flüssigkeitsextravasation.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss einer Calpain-Inhibition mit dem spezifischen Inhibitor A-705253 und einer Na^+ - H^+ - Anitporter-Inhibition (NHE-Inhibition) mit Cariporide® auf die HLE-Ausschüttung aus aktivierten PMN in das Perfusat und das Ausmaß der pulmonalen Ödembildung untersucht. In einem zweiten Ansatz wurde die HLE-Freisetzung aus aktivierten PMN in-vitro überprüft.

Es zeigte sich ein klarer Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der HLE-Freisetzung und der Ödembildung in der Lunge. Wurden die Inhibitoren vor der Aktivierung der ins Perfusionssystem injizierten PMN verabreicht, so wurde die pulmonale Flüssigkeitsextravasation stark gehemmt. Parallel dazu zeigte sich eine signifikant verminderte HLE-Ausschüttung. Dabei konnte der stärkste protektive Effekt unter Calpain-Hemmung beobachtet werden, gefolgt von einer Kombination aus Calpain und NHE-Hemmung. Cariporide® allein zeigte die schwächste Wirkung.

Aufgrund dieser Ergebniskonstellation ist anzunehmen, dass die Cariporide® - Wirkung auf eine indirekte Calpain-Hemmung zurückzuführen ist.

Unter in-vitro-Bedingungen wird die spontane Elastase-Freisetzung aus aktivierten PMN durch Calpain-Inhibition signifikant vermindert.

Unsere Untersuchungen konnten im Tierexperiment eine Beteiligung des Calpainsystems an der durch HLE ausgelösten pulmonalen Ödembildung aufzeigen. Weitere Experimente und Studien sind nötig, um die Pathogenese und Pathophysiologie der ALI und des ARDS weiter zu entschlüsseln. Das Calpainsystem scheint dabei eine entscheidende Rolle zu spielen und seine Hemmung könnte in Zukunft therapeutisch interessant werden - auch wenn die Inhibition eines solch ubiquitär vorkommenden "Schlüsselenzyms" mit Risiken behaftet sein wird.

6. Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

Aharonovits, O., Zaun, H. C., Balla, T., York, J. D., Orlowski, J., Grinstein, S.:

“Intracellular pH regulation by Na^+ / H^+ exchange requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate.” *J. Cell. Biol.* 150 (1), 2000, 213 – 24.

Alvarez, J. R. F.:

“Wirkung des synthetischen Inhibitors CE-1037 bei der durch Granulozytenstimulation ausgelösten pulmonalen Permeabilitätsstörung am Modell der isoliert ventilierten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge“. Diss. Giessen, 2002.

Badalamente, M. A., Stracher, A.:

“Delay of muscle degeneration and necrosis in mdx mice by calpain inhibition.” *Muscle Nerve.* 23(1), 2000, 106 – 11.

Baird, B. R., Cheronis, J. C., Sandhaus, R. A., Berger, E. M., White, C. W., Repine, J. E.:

“ O_2 -Metabolites and Neutrophil Elastase Synergistically Cause Edematous Injury in Isolated Rat Lungs”. *J. Appl. Physiol.* 61, 1986, 2224 – 2229.

Barman, S. A., Taylor, A. E.:

“Histamine’s Effect on Pulmonary Vascular Resistance and Compliance on Elevated Tone”. *Am. J. Physiol.* 257 (Heart Circ. Physiol. 26), 1989, H 618 – H 625.

Biswas, S., Harris, F., Dennison, S., Singh, J., Phoenix, D. A.:

“Calpains: targets of cataract prevention?”
Trends. Mol. Med. 10(2), 2004, 78 – 84.

Bradford, H. N., Schmaier, A. H., Colman, R. W.:

“Kinetics of inhibition of platelet calpain by human kininogens.” *Biochem. J.* 270(1), 1990, 83 – 90.

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

Braude, S., Royston, D., Coe, C., Barnes, P. J. :

“Histamine Increases Lung Permeability by an H₂-Receptor Mechanism”. *Lancet.* 2, 8399, 1984, 372 – 374.

Bray, M.A., Cunningham, F.M., Ford-Hutchinson, A.W., Smith, M. J. H.:

“Leukotriene B₄: A Mediator for Vascular Permeability”. *Br. J. Pharmacol.* 72, 1981, 483 – 486.

Böhm, K. D.:

“Akute Veränderungen des pulmonalen Gefäßtonus und der Permeabilität durch stimulierte Granulozyten“. Diss. Giessen, 1994.

Bøyum, A.:

“A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. General sedimentation properties of white blood cells in a 1 g gravity field.”

Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 97, 1968, 51 – 76.

Carden, D., Xiao, F., Moak, C., Willis, B. H., Robinson-Jackson, S., Alexander, S.:

“Neutrophil elastase promotes lung microvascular injury and proteolysis of endothelial cadherins.” Am. J. Physiol. 275, 1998, H 385 – 392.

Carragher, N. O., Westhoff, M. A., Riley, D., Potter, D. A., Dutt, P., Elce, J. S., Greer, P. A., Frame, M. C.:

“v-Src-induced modulation of the Calpain-calpastatin proteolytic system regulates transformation.” Mol. Cell. Biol. 22(1), 2002, 257 – 69.

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.

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.

Chaitman, B. R.:

“A Review of the GUARDIAN Trial Results: Clinical Implications and the Significance of Elevated Perioperative CK-MB on 6-Month Survival “. Journal of Cardiac Surgery 2003, Volume 18 Issue s1, 13 – 20.

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.

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.

Chen, M., Won, D.J., Krajewski, S., Gottlieb, A.R.:

“Calpain and mitochondria in Ischemia/Reperfusion Injury.”

J. Biol. Chem. 277 (32), 2002, 29181 – 6.

Cong, J. Y., Goll, D. E., Peterson, A. M., Kapprell, H. P.:

“The role of autolysis in activity of the Ca^{2+} -dependent

proteinases (μ -calpain and m-calpain).” J. Biol. Chem.

264(17), 1989, 10096 – 10103.

Cong, J., Thompson, V. F., Goll, D. E.:

“Effect of monoclonal antibodies specific for the 28-kDa

subunit on catalytic properties of the calpains.” J. Biol. Chem.

268(34), 1993, 25740 – 7.

Cong, J., Thompson, V. F., Goll, D. E.:

“Phosphorylation of the Capain Abstract.” Mol. Biol. Cell. 11,

2000, 386a.

Coolican, S. A., Hathaway, D. R.:

“Effect of L-phosphatidylinositol on an vascular smooth muscle

Ca^{2+} -dependent protease.” J. Bio. Chem. 259(19), 1984,

11627 – 30.

Cottin, P., Vidalence, P. L., Ducastaing, A.:

“Ca²⁺ -dependent association between a Ca²⁺ -activated neutral proteinase (CaANP) and its specific inhibitor”. FEBS Lett. 136(2), 1981, 221 – 4.

Crawford, C.:

“Protein and peptide inhibitors of calpains.” In: Intra-cellular Calcium-Dependent Proteolysis. Boca Raton, FL, 1990: CRC p. 75 – 89.

Crawford, C., Brown, N. R., Willis, A. C.:

“Studies of the active site of m-calpain and the interaction with calpastatin.” Biochem. J. 296, 1993, 135 – 42.

Croal, D. E., Demartino, G. N.:

“Calcium-activated neutral proteases (calpain) systems structure, function, and regulation.” Physiol. Rev. 71(3), 1991, 813 – 47.

Cusak, N. J.:

“Platelet-Activating Factor”. Nature, 285, 1980, 193 - 195

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.

Davidson, D., Singh, M., Wallace, G. F.:

“Role of Leukotriene C4 in Pulmonary Hypertension: Platelet-Activating Factor vs. Hypoxia”. J. Appl. Physiol. 68, 4, 1990, 1628 – 1633

Dayton, W. R.:

“Comparison of low- and high-calcium-requiring forms of the calcium-activated protease with their autocatalytic breakdown products.” Biochim. Biophys. Acta. 709(2), 1982, 166 – 72.

De Luca, C. I., Davies, P. L., Samis, J. A., Elce, J. S.:

“Molecular cloning and bacterial expression of cDNA for rat calpain II 80 kDa subunit.” Biochim. Biophys. Acta. 1216(1), 1993, 81 – 93.

Dewitt, S., Hallett, M. B.:

“Cytosolic free Ca²⁺ changes and calpain activation are required for β integrin-accelerated phagocytosis by human neutrophils.” J. Cell. Biol. 159(1), 2002, 181 – 9.

Downey, G.P., Dong, Q., Kruger, J., Dedhar, S., Cherapanov, V.:

“Regulation of neutrophil activation in acute lung injury.”

Chest 116, 1999, Suppl. 1: S46 – S54.

Edmunds, T., Nagainis, P. A., Sathe, S. K., Thompson, V. F., Goll, D.

E.:

“Comparison of the autolyzed and unautolyzed forms of μ - and m-calpain from bovine skeletal muscle.” Biochim. Biophys. Acta. 1077(2), 1991, 197 – 208.

Elce, J. S., Hegadorn, C., Arthur, J. S. C.:

“Autolysis, Ca^{2+} –requirement, and heterodimer stability in m-calpain.” J. Biol. Chem. 272(17), 1997, 11268 – 75.

Eriksson, S.:

”Alpha-1-antitrypsin deficiency: lessons learned from the bedside to the gene and back again: historic perspectives.”

Chest 95, 1989, 181 – 189.

Ermert, L., Seeger, W., Duncker, H. R.:

“Computer-Assisted Morphometry of the Intracapillary Leukocytes Pool in the Rabbit Lung”. Cell Tissue Res. 271, 1993, 469 – 476.

Ermert, L., Duncker, H. R., Rosseau, S., Schüttle, H., Seeger, W.:

“Morphometric Analysis of Pulmonary Intracapillary Leukocyte Pools in Ex Vivo-Perfused Rabbit Lungs”. Am. J. Physiol. 267, 1994, L 64 – L70.

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.

Fabiunke, V.:

“Wirkung eines potischämisch verabreichten Calpaininhibitors auf die Größe des Infarktareals und die Myokardfunktion nach lokaler und zeitlich begrenzter Ischämie am modifizierten Langendorff-Modell des Kaninchenherzen.” Diss. Gießen, 2005.

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.

Fliegel, L., Frohlich, O.:

“The Na⁺ /H⁺ - exchanger: an update on structure, regulation and cardiac physiology.” *Biochem. J.* 296, 1993, 273 – 85.

Fliegel, L.:

“Functional and cellular regulation of the myocardial Na⁺ – H⁺ - exchanger.” *J. Thromb. Thrombolysis.* 8 (1), 1999, 9 -14.

Fox J.E. ,Kulkarni S., Saido T.C., Suzuki K.:

“Calpain mediates integrin-induced signaling at a point upstream of Rho family members.” *J Biol Chem.* 1999 Jul 23;274(30):21265-75.

Fröhlich O, Karmazyn M:

“The Na-H exchanger revisited: an update on Na-H exchange regulation and the role of the exchanger in hypertension and cardiac function in health and disease.” *Cardiovasc Res* 36, 1997, 138–48.

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 B₄”. *Blood.* 64, 1984, 780 – 785.

Gil-Parado, S., Popp, O., Knoch, T. A., Zahler, S., Bestvater, F., Felgenträger, M., Holloschi, A., Fernández-Montalván, A., Auerswald, E. A., Fritz, H., Fuentes-Prior, P., Machleidt, W., Spiess, E.:

“Subcellular localization and in vivo subunit interactions of ubiquitous μ -calpain.” *J. Biol. Chem.* 278(18), 2003, 16336 – 46.

Goll, D. E., Thompson, V. F., Taylor, R. G., Zalewska, T.:

“Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and Calpastatin?” *Bioessays*.14, 1992, 549 – 556.

Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W., Cong, J.:

“The Calpain System“. *Physiol. Rev.* 83(3), 2003, 731 – 801.

Gumina RJ, Buerger E, Eickmeier C, et al.:

„Inhibition of the Na^+/H^+ exchanger confers greater cardioprotection gainst 90 minutes of myocardial ischemia than ischemic preconditioning in dogs.“ *Circulation* 100, 1999, 2519–26.

Haas, F., Bergofsky, E. H.:

“Role of the Mast Cell in the Pulmonary Pressor Response to Hypoxia“. *J. Clin. Invest.* 51, 1972, 3154 – 3162

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.

Harlan, J. M., Killen, P. D., Harker, L. A., Striker, G. E., Wright, D. G.:

“Neutrophil-mediated endothelial injury in vitro mechanisms of cell detachment.” *J. Clin. Invest.* 68 (6), 1981, 1394 – 1403.

Harris, F., Biswas, S., Singh, J., Dennison, S., Phoenix, D. A.:

“Calpains and their multiple roles in diabetes mellitus.”
Ann N Y Acad. Sci. 2006, 1084, 452 – 80.

Haworth, R.S., McCann, C., Snabaitis, A.K., Roberts N. A., Avkiran, M.:

“Stimulation of the plasma membrane Na^+ / H^+ exchanger NHE1 by sustained intracellular acidosis. Evidence for a novel mechanism mediated by the ERK pathway.” *J. Biol. Chem.* 278(34), 2003, 31676 – 84.

Heck, L. W., Blackburn, W. D., Irwin, M. H., Abrahamson, D. R.:

“Degredation of basement membrane laminin by human neutrophil elastase and cathepsin G.” *Am J. Pathol.* 136 (6), 1990, 1267 – 1274.

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.

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.

Hosfield, C. M., Elce, J S., Davies, P. L., Jia, Z.:

“Crystal structure of Calpain reveals the structural basis for Ca^{2+} -dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation”. *EMBO J.* 18(24), 1999, 6880 – 9.

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.

Huang, Y. C., Nozik, E. S., Piantadosi, C. A.:

“Superoxide Dismutase Potentiates Platelet-Activating Factor induced Injury in Perfused Rabbit Lung”. *Am. J. Physiol.* 266, 3 Pt. 1, 1994, L246 – L 254.

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.

Hyman, A. L.:

“The Direct Effects of Vasoactive Agents on Pulmonary Veins. Studies of Responses to Acetylcholine, Serotonin, Histamine, and Isoprenaline in Intact Dogs”. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 168, 1969, 96 - 105

Iizuka, K., Kawaguchi, H., Yasuda, H.:

“Calpain is activated during hypoxic myocardial cell injury.” *Biochem. Med. Metab. Biol.* 46(3), 1991, 427 – 31.

Ikedo Y., Young L.H., Lefer A.M.:

“Attenuation of neutrophil-mediated myocardial ischemia-reperfusion injury by a calpain inhibitor.” *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002 Apr;282(4):H1421-

Imajoh, S., Suzuki, K.:

“Reversible interaction between Ca^{2+} -activated neutral protease (CANP) and its endogenous inhibitor.” FEBS Lett. 187(1), 1985, 47 – 50.

Imajoh, S., Kawasaki, H., Suzuki, K.:

“The amino-terminal hydrophobic region of the SC subunit of calcium-activated neutral protease (CANP) is essential for its activation by phosphatidylinositol.” J. Biochem. 99(4), 1986, 1281 – 1284.

Inomata, M., Hayashi, M., Nakamura, M., Saito, Y., Kawashima, S.:

“Properties of erythrocyte membrane binding and autolytic activation of calcium-activated neutral protease.” J. Biol. Chem. 264(31), 1989, 18838 – 43.

Inomata, M., Saito, Y., Kon, K., Kawashima, S.:

“Binding sites for calcium-activated neutral protease on erythrocyte membranes are not membrane phospholipids.” Biochem. Biophys. Res. Commun. 171(2), 1990, 625 – 32.

Inomata M., Hayashi M., Ohno-Iwashita Y., Tsubuki S., Saido T.C., Kawashima S.:

“Involvement of calpain in integrin-mediated signal transduction.” Arch Biochem Biophys. 1996 Apr 1;328(1):129-34.

Ishiura, S., Nonaka, I., Sugita, H.:

“Calcium-activated neutral protease: its degraditive role in muscle cells.” In: Proceedings of International Symposium on Muscular Dystrophy, edited by Ebashi S. Tokyo: Univ. of Tokyo Press. 1980, P. 265 – 282.

Jacquemond, V.:

“Indo-1 fluorescence signals elicited by membrane depolarization in enzymatically isolated mouse skeletal muscle fibers.” *Biophys. J.* 73(2), 1997, 920 – 8.

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.

Kapprell. H. P., Goll, D. E. :

“Effect of Ca^{2+} on binding of the calpains to Calpastatin.” *J. Biol. Chem.* 264(30), 1989, 17888 – 96.

Kay, J. M., Waymire, J. C., Grover, R. F.:

“Lung Mast Cell Hyperlasia and Pulmonary Histamine Forming Capacity in Hypoxic Rats”. *Am. J. Physiol.* 226, 1974, 178 – 184.

Kidd, V. J., Lathi, J. M., Teitz, T.:

“Proteolytic regulation of apoptosis.” *Semin. Cell. Dev. Biol.*
11(3), 2000, 191 – 201.

Kinsella, J. L., Heller, P., Froehlich, J. P.:

“Na⁺ / H⁺ –exchanger: proton modifier site regulation of
activity.” *Biochem. Cell Biol.* 76 (5), 1998, 743 – 9.

Kishimoto, A., Mikawa, K., Hashimoto, K., Yasuka, I., Tanaka, S.,
Tominaga, M., Kuroda, T., Nishimura, Y.:

“Limited proteolysis of protein kinase C subspecies by
calcium-dependent neutral protease (Calpain).” *J. Biol. Chem.*
264(7), 1989, 4088 – 92.

Klebanoff, S. J.:

“Oxygen Metabolism and the toxic Properties of Phagocytes”.
Ann. Int. Med. 93, 1980, 480 – 489.

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.

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.

Korth, R., Hirafuji, M., Keraly, C. L., Delautier, D., Bidault, J.,
Benveniste, J.:

“Interaction of the PAF Antagonist WEB 2086 and its
Hexazepine Analogues with Human Platelets and Endothelial
Cells”.

Br. J. Pharmacol. 98, 2, 1989, 653 – 661.

Korthuis, R. J., Wang, C. Y., Spielman, W. S.:

“Transient Effects of Histamine on the Capillary Filtration
Coefficient”. Microvasc. Res., 28, 1984, 322 – 344.

Krögel, C., Yukawa, T., Dent, G., Venge, P., Chung, K. F., Barnes P.
J.:

“Stimulation and Degranulation from Human Eosinophils by
Platelet-Activating Factor”. J. Immunol. 142, 10, 1989, 3518 –
3526

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.

Kuboki, M., Ishii, H., Kazama, M.:

“Characterization of calpain I-binding proteins in human erythrocyte plasma membrane.” *J. Biochem.* 107, 1990, 776 – 80.

Kuboki, M., Ishii, H., Horie, S., Kazama, M.:

“Procalpain I in cytoplasm is translocated onto platelet and granule membranes during platelet stimulation with thrombin and then activated on the membranes.” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185(3), 1992, 1122 – 7.

Kumamoto, T., Kleese, W. C., Cong, J., Goll, D. E., Pierce, P. R., Allen, R. E.:

“Localization of the Ca^{2+} -dependent proteinases and their inhibitor in normal, fasted, and denervated rat skeletal muscle”. *Anat. Rec.* 232(1), 1992, 60 – 77.

Kunimatsu, M., Tada, T., Narita, Y., Ozaki, Y., Liu, Z-Q., Shearer, T. R., Sasaki, M.:

“Activation of Calpain in myocardial infarction: an immunohistochemical study using a calpain antibody raised against active site histidine-containing peptide.” *Cardiovasc. Pathol.* 8(1), 1999, 7 -15.

Le Cabec, V., Carreno, S., Moisand, A., Bordier, C., Maridonneau-Parini, I. :

"Complement receptor 3 (CD11b/CD18) mediates type I and type II phagocytosis during nonopsonic and opsonic phagocytosis, respectively." *J. Immunol.* 169(4), 2002, 2003 – 2009.

Lee, C. W., Jung, W., Lewis, R. A., Hales, C. A.:

"LTB₄ Mediated Hypoxemia in Guinea Pigs: Relationship to Pulmonary and Cardiovascular Pathophysiology". *Prostaglandins.* 33, 1987, 3 – 16

Lee, W. L., Downey, G.P.:

"Leukocyte Elastase: Physiological Functions and Role in Acute Lung Injury." *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164(5), 2001, 896 – 904.

Legendre, J. L., Jones, H. P.:

"Purification and characterization of calpain from human polymorphonuclear leukocytes." *Inflammation* 12(1), 1988, 51 – 65.

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 Localisation in Capillaries”. *J. Appl. Physiol.* 62, 3, 1987, 1236 – 1243.

Linn, G. D., Chattopadhyay, D., Maki, M., Wang, K. K. W., Carson, M., Jin, L., Yuen, P., Takano, E., Hatanaka, M., Delucas, L. J., Narayana, S. V. L.:

“Crystal structure of a calcium bound domain VI of Calpain at 1.9 angstrom resolution and its role in enzyme assembly.” *Nature Struct. Biol.* 4(7), 1997, 539 – 47.

Lin, X., Barber, D. L.:

“A calcineurin homologues protein inhibits GTPase stimulated $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ exchange.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 (22), 1996, 12631 – 6.

Linz, W., Albus, U., Crause, P., Jung, W., Weichert, A., Schölkens, B. A., Scholz, W.:

“Dose-dependent reduction of myocardial infarct mass in rabbits by NHE 1 inhibitor Cariporide (HOE 642).” *Clin. Exp. Hypertens.* 20 (7), 1998, 733 – 49.

Lohman, I. C., Halonen, M.:

“The Effects of Combined Histamin and Platelet-Activating Factor Antagonism on Systemic Anaphylaxis Induced by Immunoglobulin E in the Rabbit”. *Am. Rev. Respir. Dis.* 147, 5, 1993, 1223 - 1228

Lotner, G. Z., Lynch, J. M., Betz, S. F., Henson, P. M.:

“Human Neutrophil Derived Platelet Activating Factor“. *J. Immunol.* 124, 1980, 676 – 680.

Lubisch, W., Beckenbach, E., Bopp, S., Hofmann, H. P., Kartal, A., Kastel, C., Lindner, T., Metz-Garrecht, M., Reeb, J., Regner, F., Vierling, M., Moller, A.:

“Benzoylalanine-derived ketoamides carrying vinylbenzyl amino residues: discovery of potent water-soluble calpain inhibitors with oral bioavailability.” *J. Med. Chem.* 46(12), 2003, 2404 – 2412.

Lum H., Malik A.B.:

“Mechanisms of increased endothelial permeability.”
Can J Physiol Pharmacol. 1996 Jul;74(7):787-800. Review.

Lynch J.J., Ferro T.J., Blumenstock F.A., Brockenauer A.M., Malik A.B.:

“Increased endothelial albumin permeability mediated by protein kinase C activation.” *J Clin Invest.* 1990 ;85(6):1991-8.

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.

Maki, M., Narayana, S., Hitomi, K.:

“A growing family of the Ca^{2+} -binding proteins with five EF-hand motifs“. Biochem. J. 328, 1997, 718 – 20.

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.

Malkov, M., Ben-Yosef, D., Glaser, T., Shalgi, R.:

“Changes in calpain during meiosis in the rat egg.“ Mol. Reprod. Dev. 48(1), 1997, 119 – 26.

Manjo, 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.

Maravall, M., Mainen, Z. F., Sabatini, B. L., Svoboda, K.:

“Estimating intracellular calcium concentrations and buffering without wavelength ratioing.“ Biophys. J. 78(5), 2000, 2655 – 67.

Martin, U.:

“Experimentelle Untersuchungen zum Einfluss freigesetzter Granulozytenproteinasen auf die pulmonal-vasculäre Permeabilität“. Diss. Giessen, 1987.

Matthay, M.A., Zimmerman, G.A.:

“Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management.” *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 33(4), 2005, 319 – 27.

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

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.

Mellgren, R. L.:

“Calcium-dependent proteases: an enzyme system active at cellular membranes?” *FASEB J.* 1(2), 1987, 110 – 115.

Messner, R. P., Jelinek, J.:

“Receptors for Human γ G-Globulin on Human Neutrophils“.

J. Clin. Invest. 49, 1970, 2165 – 2171.

Meyer, M., Lehnart, S., Pieske, B., Schlottauer, K., Munk, S.,
Holubarsch, C., Just, H., Hasenfuss, G.:

“Influence of endothelin I on human atrial myocardium-
myocardial function and subcellular pathways.“ Basic Res.

Cardiol. 91 (1), 1996, 86 – 93

Moldoveanu, T., Hosfield, C. M., Lim, D., Elce, J. S., Jia, Z., Davies,
P.L.:

“A Ca^{2+} switch aligns the activity site of Calpain.” Cell. 108(5),
2002, 649 – 60.

Moor, A. N., Fliegel, L.:

“Protein kinase mediated regulation of the $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ exchanger
in the rat myocardium by MAP-kinase-dependent pathways.”

J. Biol. Chem. 274 (3), 1999, 22985 – 92.

Murachi, T.:

“Intracellular Ca^{2+} protease and its inhibitor protein: Calpain
and calpastatin.” In: Calcium and Cell Function, edited by
Cheung, W. Y.. New York: Academic. Vol. IV, 1983, p. 377 –
410.

Murachi, T.:

“Intracellular regulatory system involving calpain and calpastatin.” *Biochem. Int.* 18(2), 1989, 263 – 294.

Naka M., Nishikawa M., Adelstein R.S., Hidaka H.:

„Phorbol ester-induced activation of human platelets is associated with protein kinase C phosphorylation of myosin light chains.” *Nature.* 1983 Dec 1-7;306(5942):490-2.

Nakagawa, T., Yuan, J.:

“Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of Caspase-12 by calpain in apoptosis.” *Cell. Biol.* 150 (4), 2000, 887 – 94.

Neuhof, C., Fabiunke, V., Deibele, K., Speth, M., Möller, A., Lubisch, W., Fritz, H., Tillmanns, H., Neuhof, H.:

“Reduction of myocardial infarction by calpain inhibitors A-705239 and A-705253 in isolated perfused rabbit hearts.” *Biol. Chem.* 385(11), 2004, 1077 – 82.

Neuhof, C., Götte, O., Trumbeckaite, S., Attenberger, M., Kuzkaya, N., Gellerich, F., Möller, A., Lubisch, W., Speth, M., Tillmanns, H., Neuhof, H.:

“A novel water-soluble and cell-permeable calpain-inhibitor protects myocardial and mitochondrial function in postischemic reperfusion.” *Biol. Chem.* 384(12), 2003, 1597 – 1603.

Neuhof, C., Oliva, M. L. V., Maybauer, D., Maybauer, M., de Oliveira, C., Sampaio, M. U., Sampaio, C. A. M., Neuhof, H.:

“Effect of Plant Kunitz Inhibitors from *Bauhinia bauhinioides* And *Bauhinia rufa* on Pulmonary Edema caused by Activated Neutrophils” *Biol. Chem.* 384, 2003, 939 – 944.

Neuhof, H., Hoffmann, C., Seeger, W., Suttorp, N., Fritz, H.

“Proteases as mediators of pulmonary vascular permeability” *Prog. Clin. Biol. Res.* 308, 1989, 305 – 314.

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.

Ohno, S., Emori, Y., Suzuki, S.:

“Nucleotide sequence of a cDNA coding for the SC subunit of human calcium-dependent protease.” *Nucleic. Acids. Res.* 14(13), 1986, 5559.

Ohno, S., Minoshima, S., Kudoh, J., Fukuyama, R., Shimizu, Y., Ohmi-Imajoh, S., Shimizu, N., Suzuki, K.:

“Four genes for the calpain family locate on four distinct human chromosomes”. *Cytogenet. Cell Genet.* 53(4), 1990, 225 – 9.

Ojha, M., Wallace, C. J. A.:

“Novel Ca^{2+} -activated neutral protease from an aquatic fungus, *Allomyces arbuscula*.” *J. Bacteriol.* 170(3), 1988, 1254 – 60.

Orlowski, J., Grinstein, S.:

“ Na^+ / H^+ exchangers of mammalian cells.” *J. Biol. Chem.* 272 (36), 1997, 22373 – 6.

Otani, H., Uchiyama, T., Yamamura, T., Nakao, Y., Hattori, R., Nimomiya, H., Kawaguchi, H., Osako, M., Imamura, H.:

“Effects of the $\text{Na}^+ -\text{H}^+$ exchange inhibitor cariporide (HOE642) on cardiac function and cardiomyocyte cell death in rat ischaemic-reperfused heart.” *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 27, 2000, 387 – 93.

Otsuka, Y., Goll, D. E.:

“Purification of the Ca^{2+} -dependent proteinase inhibitor from bovine cardiac muscle and its interaction with the millimolar Ca^{2+} -dependent proteinase.” *J. Biol. Chem.* 262(12), 1987, 5839 – 51.

Palmblad, J., Malmsten, C. L., Uden, A.-M., Radmark, O., Engsted, L., Samuelsson, B.:

“Leukotriene B₄ is a Potent and Stereospecific Stimulator of Neutrophil Chemotaxis and Adherence”. *Blood*. 58, 1981, 658 – 662.

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.

Petrecca K., Atanasiu R., Grinstein S., Orlowski J., Shrier A.:

“Subcellular localization of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 in rat myocardium.” *Am J Physiol.* 1999 Feb;276(2 Pt 2):H709-17.

Pipoly, D.J., Crouch, E.C.:

“Degredation of native type IV procollagen by human neutrophil elastase. Implications for leucocyte-mediated degradation of basement membranes.” *Biochemistry* 26 (18), 1987, 5748 – 5754.

Pontremoli, S., Melloni, E., Michetti, M., Sacco, O., Salamino, F., Sparatore, B., Horecker, B. L.:

“Biochemical response in activated human neutrophils mediated by protein kinase C and a Ca²⁺-requiring proteinase.” J. Biol. Chem. 261(18), 1986, 8309 – 8313.

Pontremoli, S., Melloni, E., Michetti, M., Sparatore, B., Salamino, F., Sacco, O., Horecker, B. L.:

“Phosphorylation by protein kinase C of a 20-kDa cytoskeletal polypeptide enhances its susceptibility to digestion by calpain.” Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84(2), 1987, 398 – 401.

Pontremoli, S., Melloni, E., Damiani, G., Salamino, F., Sparatore, B., Michetti, M., Horecker, B. L.:

“Effects of a monoclonal anti-calpain antibody on response of stimulated human neutrophils. Evidence for a role for proteolytically modified protein kinase C.” J. Biol. Chem. 263(4), 1988, 1915 – 1919.

Pretolani, M., Lefort, J., Malanchere, E., Vargaftig, B. B.:

“Interference by the Novel PAF-Acether Antagonist WEB 2086 with the Bronchopulmonary Response to PAF-Acether and to Active and Passive Anaphylactic Shock in Guinea-Pigs”. Eur. J. Pharmacol. 21, 140, 3, 1987, 311 – 321.

Redlin, M., Werner, J., Habazettl, H., Griethe, W., Kuppe, H., Pries, A. R.:

“Cariporide (HOE 642) attenuates leukocyte activation in ischemia and reperfusion.” *Anesth. Analg.* 93 (6), 2001, 1472 – 9.

Reverter, D., Sorimachi, H., Bode, W. :

“The structure of calcium-free human m-calpain: implications for calcium activation and function.” *Trends. Cardiovasc. Med.* 11(6), 2001, 222 – 9.

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.

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.

Saido, T C., Mizuno, K., Suzuki, K. :

“Proteolysis of protein kinase C by Calpain: effect of acidic phospholipids.” *Biomed. Biochim Acta.* 50, 1991, 485 – 487.

Saido, T C., Nagao, S., Shiramine, M., Tsukaguchi, M., Sorimachi, H., Murofushi, H., Tsuchiya, T., Ito, H., Suzuki, K. :

“Autolytic transformation of μ -calpain upon activation as resolved by antibodies distinguishing between the pre- and post-autolysis form.” J. Biochem. 111(1), 1992, 81 – 6.

Saido, T C., Shibata, M., Takenawa, T., Murofushi, H., Suzuki, K. :

“Positive regulation of μ -calpain action by polyphosphoinositides.” J. Biol. Chem. 267(34), 1992, 24585 – 90.

Saido, T. C., Suzuki, H., Yamazaki, H., Tanoue, K., Suzuki, K.:

“In situ capture of μ -calpain activation in platelets.” J. Bio. Chem. 268(10), 1993, 7422 – 6.

Saido, T. C., Sorimachi, H., Suzuki, K.:

“Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathophysiological involvement.” FASEB J. 8(11), 1994, 814 – 22.

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.

Samet, J. M., Noah, T. L., Devlin, R. B., Yankaskas, J. R., Mc
Kinnon, 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.

Samuelsson, B.:

“Leukotrienes: Mediators of Immediate Hypersensitivity.
Reactions and Inflammation”. *Science.* 220, 1983, 568 – 575

Sandmann, S., Spormann, J., Prenzel, F., Shaw, L., Unger, T.:

“Calcium channel blockade limits transcriptional, translational
and functional up-regulation of the cardiac Calpain system
after myocardial infarction.” *Eur. J. Pharmacol.* 453(1), 2002,
99 – 109.

Santella, L., Kyojuka, K., Hoving, S., Munchbach, M., Quadroni, M.,
Dainese, P., Zamparelli, C., James, P., Carafoli, E.:

“Breakdown of cytoskeletal proteins during meiosis of starfish
oocytes and proteolysis induced by Calpain.” *Exp. Cell. Res.*
259(1), 2000, 117 – 26.

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.

Schorr, K., Seidel, H.:

“Blood-Vessel Wall Arachidonate Metabolism and its Pharmacological Modification in a new Vitro Assay System”. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 337, 2, 1988, 177 – 182.

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.

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.

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.

Seeger, W., Wolf, H., Stähler, G., Neuhof, H., Roka, L.:

“Increased Pulmonary Vascular Resistance and Permeability due Arachidonate Metabolism in Isolated Rabbit Lungs”. *Prostaglandins.* 23, 1982, 157 – 173.

Shaw, J. O., Henson, P. M.:

“Pulmonary Intravascular Sequestration of Activated Neutrophils”. *Am. J. Pathol.* 108, 1982, 17 – 23.

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.

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.

Smith, T. P. L., Simmen, F. A., Zhao, G., Vallet, J. L.:

“Rapid communication: nucleotide sequences of two isoforms of porcine micromolar calcium-activated neutral protease 1 cDNA.” *J. Anim. Sci.* 79(2), 2001, 552 – 3.

Squier, M. K., Sehnert, A. J., Sellins, K. S., Malkinson, A.M., Takano, E., Cohen, J. J.:

“Calpain and calpastatin regulate neutrophil apoptosis.”
J. Cell Physiol. 178(3), 1999, 309 – 311.

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.

Staub, N. C., Schultz, E. L., Koike, K., Albertine, K. H.:

“Effect of Neutrophil Migration Induced by Leukotriene B4 on Protein Permeability in Sheep Lung”. *Fed. Proc.* 44, 1985, 30 – 35

Stoika, R., Kashchak, N., Lutsik-Kordovsky, M., Boyko, M., Tsyurulnyk, A.:

“In vitro response of phagocytic cells to immunomodulating agents”. *Med Sci Monit.* 2001, Jul-Aug; 7(4), 652 – 658.

Strobel, S., Fernandez-Catalan, C., Braun, M., Huber, R., Masumoto, H., Nakaga, K., Irie, A., Sorimachi, H., Bourenkow, G., Bartunik, H., Suzuki, K., Bode, W.:

“The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium.” *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97(2), 2000, 588 - 92.

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 (3). 1993, 187 – 203.

Suzuki, K., Imajoh, S., Emori, Y., Kawasaki, H., Minami, Y., Ohno, S. :

“Calcium-activated neutral protease and its endogenous inhibitor.” *FEBS Lett.* 220, 1987, 271 – 277.

Suzuki, K.:

“The structure of the calpains and the Calpain gene.”

In: *Intracellular Calcium-Dependent Proteolysis*, edited by Mellgren, R. L. and Murachi, T.. Boca Raton, FL,1990: CRC. P. 25 – 35.

Symons JD, Correa SD, Schaefer S.:

“Na-H exchange inhibition with cariporide limits functional impairment caused by repetitive ischemia.”

J Cardiovasc Pharmacol 32, 1998, 853–62.

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.

Taylor, R. G., Christiansen, J. A., Goll, D. E.:

“Immunolocalization of the calpains and calpastatin in human and bovine platelets.” Biomed. Biochem. Acta. 50, 1991, 491 – 8.

Tompa P., Emori Y., Sorimachi H., Suzuki K., Friedrich P.:

“Domain III of calpain is a Ca^{2+} -regulated phospholipid-binding domain.” Biochem Biophys Res Commun. 2001 Feb 9;280(5):1333-9.

Tucker, A., Weir, E. K., Reeves, J. T., Grover, R. F.:

“Histamine H1- and H2-Receptors in Pulmonary and Systemic Vasculature of the Dog”. Am. J. Physiol. 229, 4, 1975, 1008 – 1013.

Wakabayashi, S., Shigekawa, M., Pouyssegur, J.:

“Molecular physiology of vertebrate Na⁺ – H⁺ exchangers.”

Physiol. Rev. 778 (1), 1997, 51 – 74.

Walzog B., Schuppan D., Heimpel C., Hafezi-Moghadam A.,

Gaetgens P., Ley K.:

“The leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) contributes to binding of human granulocytes to collagen.” Exp Cell Res.

1995 May;218(1):28-38.

Wang, K. K. W., Yuen, P. W.:

“Calpain substrates, assay methods, regulation, and its inhibitory agent.” In: Calpain: Pharmacology and Toxicology of Calcium-Dependent Protease. Taylor & Francis.p., 1999, 77 – 101.

Ware, L.B., Matthay, M.A.:

“The acute respiratory distress syndrome.”

N. Engl. J. Med. 342, 2000, 1334 – 1349.

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

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.

Watanabe, H., Hattori, S., Katsuda, S., Nakanishi, I., Nagai, Y.:

“Human neutrophil elastase: Degredation of basement membrane components and immunolocalization in the tissue.” *J. Biochem.* 108 (5), 1990, 753 – 759.

Watanabe, N., Vande Woude, G. F., Ikawa, Y., Sagata, N.:

“Specific proteolysis of the c-mos proto-oncogene product by Calpain in fertilization of *Xenopus* eggs.” *Nature.* 342(6249), 1989, 505 – 11.

Weismann, G., Brand, A., Franklin, E. C.:

“Interactions of Immunoglobulins with Liposomes”. *J. Clin. Invest.* 53, 1974, 536 – 543.

Williams, J. D., Topley, N., Alobaidi, H. M., Harber, M. J.:

“Activation of human polymorphonuclear leucocytes by particulate zymosan is related to both its major carbohydrate components: glucan and mannan.” *Immunology.* 58(1), 1986, 117 – 124.

Wirth, K. J., Maier, T., Busch, A. E.:

“NHE1-inhibitor cariporide prevents the transient reperfusion-induced shortening of the monophasic action potential after coronary ischaemia in pigs.” *Basic res. Cardiol.* 96(2), 2001, 192 – 7.

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.

Xie, X., Dwyer, M. D., Swenson, L., Parker, M. H., Botfield, M. C.:

“Crystal structure of calcium-free human sorcin: a member of the penta-EF-hand protein family”. *Protein Sci.* 10(12), 2001, 2419 – 25.

Yount, R. G.:

“Subfragment 1: the first crystalline motor. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 14(6), 1993, 547 – 51.

6.2 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ALI	Acute Lung Injury
ARDS	Adult Respiratory Distress Syndrome
Fc-Stück	Chrystalisabel Fragment (des Immunglobulins)
HLE	humane Leukozytenelastase
IgG	Immunglobulin G
IRDS	Infant Respiratory Distress Syndrome
i.v.	intravenös
KHHP	Krebs-Henseleit-Haes-Puffer
mRNA	messenger Ribonucleinacid
MLCK	Myosin light chain kinase
NHE	Na ⁺ – H ⁺ - Exchanger
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PEEP	Positive end expiratory pressure
PI	Phosphatidylinositol
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphonat
PKC	Proteinkinase C
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
TXA	Thromboxan A

6.3 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. Heinz Neuhof und seiner Frau PD Dr. med. Christiane Neuhof für die kontinuierlich gute Betreuung und Begleitung während der Entstehung dieser Arbeit.

Außerdem gilt mein Dank dem gesamten Laborteam, Frau Antje Weber, Frau Tiziana Wieth und ganz besonders Herrn Harald Michnacs (verstorben im Januar 2005). Seine unvergleichlich humorvolle Art sorgte stets für ein angenehmes, fast familiäres Arbeitsklima.

Allen Kommilitonen und Kollegen die mir als Blutspender zur Verfügung standen, möchte ich ebenfalls danken.

Für ihre Unterstützung, aufmunternde und auch ermahnende Worte und vor allem für ihre Geduld, danke ich meiner Partnerin Ann-Kathrin Frahm ganz herzlich.

6.4 Erklärung

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

Mike Sebastian Strunden

6.5 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Mike Sebastian Strunden
Geburtsdatum: 23. Oktober 1976
Geburtsort: Lüdenscheid
Wohnort: Eberhardstraße 3, 22041 Hamburg

Schul- und Hochschulbildung:

1983 – 1987 Grundschulen in Lüdenscheid
1987 – 1996 Zeppelin-Gymnasium in Lüdenscheid
1998 – 2005 Studium der Humanmedizin an der
Justus-Liebig-Universität Gießen
2004 – 2005 Praktisches Jahr am Klinikum Wetzlar, der
Asklepios-Klinik Lich und am Kantonsspital Zug
(CH)

Berufsausbildung- und Tätigkeit:

1995 – 1997 Ausbildung zum Rettungsassistenten, z.T. in
Abendschulform
01/98 – 06/98 Angestellt als Rettungsassistent bei der
Johanniter-Unfall-Hilfe in Lüdenscheid
2000 – 2005 Angestellt als Rettungsassistent bei der
Rettungsdienst-Mittelhessen gmbH (Teilzeit)

Zivildienst:

1996 – 1997 Medizinischer Rettungsdienst der
Berufsfeuerwehr Iserlohn

Ärztliche Tätigkeit:

08/2005 – 09/2007 Assistenzarzt an der Klinik für Anästhesiologie
und Intensivtherapie der Klinikum Chemnitz
gGmbH

Seit 10/2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Zentrum für
Anästhesiologie und Intensivmedizin,
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie,
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf