

Sandra Högl

**Die Wirkungen von inhaliertem Interleukin-10  
während experimenteller Endotoxinämie in der Ratte**



Aus dem  
Institut für Chirurgische Forschung  
ehem. Vorstand: Professor Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Meßmer  
komm. Leiter: Professor Dr. med. U. Pohl  
und der  
Klinik für Anästhesiologie  
Direktor: Professor Dr. med. Dr. h.c. K. Peter  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

# **Die Wirkungen von inhaliertem Interleukin-10 während experimenteller Endotoxinämie in der Ratte**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sandra Högl

aus  
München

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. med. B. Zwißler

Mitberichterstatter: Professor Dr. rer. nat. Dr. med. habil. E. Fink  
Professor Dr. med. H. Ostermann

Mitbetreuung durch die  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. C. Hofstetter  
Dr. med. M. Flondor

Dekan: Professor Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 13.10.2005

**Meinen Eltern**

# Inhaltsverzeichnis

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| 1         | EINLEITUNG.....  | 1  |
| 1.1       | Epidemiologie und Pathogenese des ARDS .....             | 1  |
| 1.2       | Antiinflammatorische Therapie des ARDS.....              | 2  |
| 1.3       | Inhalationstherapie.....                                 | 3  |
| 1.4       | Fragestellung.....                                       | 5  |
| 2         | EIGENE UNTERSUCHUNGEN .....                              | 6  |
| 2.1       | Entwicklung des Jetverneblersystems .....                | 6  |
| 2.1.1     | Aufbau des Jetverneblersystems.....                      | 6  |
| 2.1.2     | Evaluation des Jetverneblersystems in vitro.....         | 8  |
| 2.1.2.1   | Material und Methodik .....                              | 8  |
| 2.1.2.2   | Versuchsdurchführung .....                               | 9  |
| 2.1.3     | Evaluation des Jetverneblersystems in vivo .....         | 10 |
| 2.1.3.1   | Material und Methodik .....                              | 10 |
| 2.1.3.1.1 | Aerosolproduktion.....                                   | 10 |
| 2.1.3.1.2 | Versuchstiere .....                                      | 10 |
| 2.1.3.1.3 | Anästhesie und Instrumentierung.....                     | 10 |
| 2.1.3.1.4 | Beatmung und Vernebelung .....                           | 11 |
| 2.1.3.1.5 | Versuchsprotokoll .....                                  | 12 |
| 2.1.3.2   | Versuchsdurchführung .....                               | 13 |
| 2.1.3.2.1 | Einfluss der Vernebelung auf das Versuchstier .....      | 13 |
| 2.1.3.2.2 | Nachweis der intrapulmonalen Deposition.....             | 13 |
| 2.2       | Vernebelung von IL-10.....                               | 16 |
| 2.2.1     | Material und Methodik.....                               | 16 |
| 2.2.1.1   | Versuchsaufbau und Studiendesign .....                   | 16 |
| 2.2.1.2   | Experimentelle Endotoxinämie .....                       | 16 |
| 2.2.1.3   | Interleukin-10.....                                      | 17 |
| 2.2.2     | Versuchsdurchführung.....                                | 17 |
| 2.2.2.1   | Anästhesie, chirurgische Präparation und Monitoring..... | 17 |

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| 2.2.2.2   | Versuchsgruppen und -protokoll.....                                     | 18 |
| 2.2.2.3   | Gewinnung und Aufarbeitung der Blutproben.....                          | 20 |
| 2.2.2.4   | Durchführung und Aufarbeitung der BAL.....                              | 20 |
| 2.2.2.5   | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -Freisetzung aus Alveolarmakrophagen ..... | 21 |
| 2.2.2.6   | O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -Freisetzung aus Alveolarmakrophagen .....  | 22 |
| 2.2.2.7   | Bestimmung der Proteinkonzentration in der BAL.....                     | 23 |
| 2.2.2.8   | Zytokinbestimmungen in BAL und Plasma.....                              | 23 |
| 2.3       | Statistik.....  | 24 |
| 3         | ERGEBNISSE.....   | 25 |
| 3.1       | Entwicklung und Evaluation des Jetverneblersystems.....                 | 25 |
| 3.2.1     | Evaluation des Jetverneblersystems in vitro.....                        | 25 |
| 3.1.2     | Evaluation des Jetverneblersystems in vivo .....                        | 26 |
| 3.1.2.1   | Einfluss der Vernebelung auf das Versuchstier.....                      | 26 |
| 3.1.2.2   | Nachweis der intrapulmonalen Deposition .....                           | 28 |
| 3.1.2.2.1 | Qualitativer Nachweis der Deposition.....                               | 28 |
| 3.1.2.2.2 | Quantitativer Nachweis der Deposition .....                             | 28 |
| 3.2       | Vernebelung von IL-10.....  | 30 |
| 3.2.1     | Hämodynamik.....  | 30 |
| 3.2.2     | Lungenmechanik.....   | 32 |
| 3.2.3     | Arterielle Blutgasanalyse.....  | 33 |
| 3.2.4     | Blutbild.....   | 37 |
| 3.2.5     | Charakteristik der BAL.....   | 40 |
| 3.2.6     | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -Freisetzung aus Alveolarmakrophagen.....  | 41 |
| 3.2.7     | O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -Freisetzung aus Alveolarmakrophagen .....  | 42 |
| 3.2.8     | Zytokinbestimmungen in der BAL.....                                     | 43 |
| 3.2.9     | Zytokinbestimmungen im Plasma.....                                      | 46 |
| 4         | DISKUSSION .....  | 50 |
| 4.1       | Diskussion der Methodik.....  | 50 |
| 4.1.1     | Tiermodell.....   | 50 |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| 4.1.2     | Aerosolproduktion.....   | 50 |
| 4.1.3     | Experimentelle Endotoxinämie.....  | 51 |
| 4.1.4     | Interleukin-10 .....   | 52 |
| 4.2       | Diskussion der Ergebnisse.....   | 53 |
| 4.2.1     | Entwicklung des Jetverneblersystems.....   | 53 |
| 4.2.1.1   | Charakterisierung des Aerosols .....   | 53 |
| 4.2.1.2   | Einfluss der Vernebelung auf das Versuchstier.....   | 54 |
| 4.2.1.3   | Intrapulmonale Deposition des Aerosols .....   | 55 |
| 4.2.2     | Vernebelung von IL-10 .....  | 59 |
| 4.2.2.1   | Lokale Wirkung auf die Lunge.....  | 59 |
| 4.2.2.1.1 | Lungenmechanik und Gasaustausch.....   | 59 |
| 4.2.2.1.2 | Charakteristik der BAL.....  | 59 |
| 4.2.2.1.3 | Freisetzung reaktiver Stickstoff- und<br>Sauerstoffmetabolite aus Alveolarmakrophagen..... | 61 |
| 4.2.2.1.4 | Zytokinfreisetzung in der Lunge .....  | 65 |
| 4.2.2.2   | Systemische Wirkung.....   | 69 |
| 4.2.2.2.1 | Hämodynamik.....   | 69 |
| 4.2.2.2.2 | Blutbild.....  | 70 |
| 4.2.2.2.3 | Systemische Zytokinfreisetzung .....   | 72 |
| 4.3       | Schlussfolgerung und Ausblick.....   | 75 |
| 5         | ZUSAMMENFASSUNG .....  | 77 |
| 6         | VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN.....   | 80 |
| 7         | LITERATURVERZEICHNIS.....  | 82 |

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Epidemiologie und Pathogenese des ARDS

Beim klinischen Bild des „*Acute Respiratory Distress Syndrome*“, abgekürzt „ARDS“ handelt es sich um eine akut auftretende, inflammatorische Erkrankung der Lunge [60]. Das Krankheitsbild ist gekennzeichnet durch ein generalisiertes interstitielles und alveoläres Ödem, eine Verschlechterung der Lungenmechanik sowie des Gasaustausches. Prädisponierend für das Auftreten eines ARDS sind zum einen direkte Lungenschädigungen wie Lungenkontusion und Aspiration von saurem Mageninhalt zum anderen indirekte Lungenschädigungen durch z. B. Sepsis oder Schock jeder Genese. Die Sepsis birgt das höchste Risiko, ein ARDS zu entwickeln [84]. Trotz Weiterentwicklung supportiver Therapieformen weist das Krankheitsbild des ARDS eine – mit zwischen 40 – 60 % – immer noch unbefriedigend hohe Letalität auf [104;178].

In der akuten Phase des ARDS kommt es zur Zerstörung von Bronchialepithelzellen und vor allem von Typ-I-Zellen des Alveolarepithels. Die Alveole wird durchlässig für proteinreiche Flüssigkeit, Erythrozyten, Leukozyten und Fibrin; es entsteht ein interstitielles und alveoläres Ödem. Dadurch wird Surfactant inaktiviert und das fibrinöse Exsudat formiert sich zu sogenannten „hyalinen Membranen“. In den Lungenkapillaren werden hyaline Mikrothromben, Thrombozytenaggregate und Fibrinthromben beschrieben. Neutrophile Granulozyten adhärieren am geschädigten Kapillarendothel und wandern in die Alveole ein. Alveolarmakrophagen werden aktiviert, setzen Entzündungsmediatoren frei und unterhalten lokal die perpetuierende Inflammation der Lunge. Schreitet die Erkrankung weiter fort, verdicken sich Endothel, Epithel und Interstitium; schließlich kommt es zum irreversiblen, fibrotischen Umbau des Lungengewebes [163].

Die in der Lunge selbst synthetisierten Entzündungsmediatoren nehmen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des ARDS ein. In der Bronchoalveolären Lavage



(BAL) von ARDS-Patienten konnten erhöhte Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine (wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) [116;181], Interleukin-1 $\beta$  (IL-1) [37;116;181], Interleukin-6 (IL-6) [116]) nachgewiesen werden, während die Konzentrationen ihrer physiologischen, antiinflammatorischen Gegenspieler (wie Interleukin-10 (IL-10) [37;116], löslicher TNF- $\alpha$ -Rezeptor (TNFsRp) [181], IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1Ra) [37]) erniedrigt waren.

## 1.2 Antiinflammatorische Therapie des ARDS

Aufgrund der pathophysiologischen Bedeutung proinflammatorischer Mediatoren entstand das Konzept, diese zu neutralisieren. Zur immunmodulatorischen Therapie der Sepsis bzw. des septischen ARDS wurden u.a. TNF- $\alpha$ -Antikörper [3;26], TNFsRp [52] und IL-1Ra [53] in klinisch-experimentellen Studien intravenös appliziert. Obgleich sich diese Substanzen im Vorfeld ihres klinischen Einsatzes im Tierversuch als jeweils wirksam erwiesen hatten, bewirkten sie im Patienten keine signifikanten benefiziellen Effekte (Übersichten zum Themenkomplex antiinflammatorische Therapie bei ARDS: [17;42;100]).

Es ist davon auszugehen, dass die Aktivierung der Entzündungskaskade bereits in der Initiierungsphase des ARDS von entscheidender Bedeutung ist. So konnten in der BAL von Patienten mit erhöhtem ARDS-Risiko schon vor dem tatsächlichen Auftreten des Syndroms erhöhte Konzentrationen des proinflammatorisch wirksamen IL-8 nachgewiesen werden [36]. Bei manifestem ARDS ist das intrapulmonale Verhältnis von TNF- $\alpha$  und IL-10 zugunsten des TNF- $\alpha$  verschoben [7]; vermutlich ist dies durch eine verminderte pulmonale Syntheseleistung für IL-10 infolge der Schädigung von Bronchialepithelzellen bedingt [15]. Niedrige Konzentrationen von IL-10 in der BAL von ARDS-Patienten korrelieren signifikant mit erhöhter Sterblichkeit [37].

Interleukin-10 besitzt ein ausgeprägtes antiinflammatorisches Wirkspektrum und hemmt die Produktion von Entzündungsmediatoren simultan auf unterschiedlichen

Ebenen [69]. IL-10 wird vor allem in Monozyten [30] bzw. Makrophagen [15;166] sowie T- und B-Lymphozyten [69;123;134;212] produziert. Normalerweise liegt die Serumkonzentration von IL-10 unterhalb der Nachweisgrenze [57] und steigt erst durch inflammatorische Stimulation an. So führen Sepsis [32;70;95;103;114], ARDS [139] oder Traumata [130;167] regelhaft zum Anstieg der endogenen IL-10-Synthese. IL-10 wirkt hemmend auf aktivierte Entzündungszellen. In Monozyten und Makrophagen supprimiert IL-10 die Synthese von TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 und IL-8 [10;51;159;200], die Bildung freier Sauerstoffradikale [14] und reaktiver Stickstoffmonoxid-Metabolite [28] [Übersicht bei [69]] sowie deren prokoagulatorische Aktivität [147;147]. In neutrophilen Granulozyten hemmt IL-10 die Freisetzung von IL-8 [199]. Daneben stimuliert IL-10 die Sekretion von TNFsRp [34;78;93] und IL-1Ra [90;194] aus aktivierten Monozyten.

Experimentelle Befunde deuten darauf hin, dass die Synthese von IL-10 im Rahmen einer Entzündung, verglichen mit der Synthese proinflammatorischer Mediatoren, relativ spät erfolgt: Während humane Monozyten proinflammatorische Mediatoren bereits innerhalb der ersten 3-6 Stunden nach Stimulation mit bakteriellem Endotoxin (Lipopolysaccharid, LPS) freisetzen, können erhöhte IL-10-Wirkspiegel erst nach ca. 7 h (Peak nach 48 h) nachgewiesen werden [29].

Vor diesem Hintergrund steht das Konzept des therapeutischen Einsatzes von IL-10. Für die Therapie des ARDS erscheint eine Gabe *per inhalationem* interessant: Bei diesem Applikationsweg kann die erwünschte Dosis direkt in das Zielorgan Lunge appliziert werden. Für das Krankheitsbild ARDS ist es vorstellbar, dass die intrapulmonale Suppression proinflammatorischer Sequenzen durch topisch appliziertes IL-10-Aerosol wesentliche therapeutische Vorteile bringt.

### **1.3 Inhalationstherapie**

Die Inhalation von Pharmaka ist ein attraktives Konzept zur Behandlung unterschiedlicher pulmonaler, pulmonal-vaskulärer und bronchialer Erkrankungen.

Über die direkte Applikation eines Pharmakons in die Lunge wird eine Metabolisierung – vor allem durch die Leber – mit möglichem Wirkungsverlust oder Giftung umgangen. Dies führt zu geringeren systemischen Nebenwirkungen (pulmonale Selektivität). Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass suffiziente lokale Wirkspiegel erreicht werden können, ohne hohe systemische Dosen applizieren zu müssen. Dadurch können zum einen ebenfalls systemische Nebenwirkungen weitgehend vermieden und zum anderen Therapiekosten gesenkt werden.

Eine etablierte Methode zur Inhalation löslicher Substanzen ist die Vernebelung des Pharmakons mittels Druckluft (sog. Jetvernebelung) [1;124]. In der vorliegenden Untersuchung sollte ein mittels Jetvernebler produziertes IL-10-Aerosol zur Therapie des akuten, experimentellen Lungenschadens in der Ratte während kontrollierter Beatmung eingesetzt werden.

Um ein Aerosol mit einem zur alveolären Deposition geeigneten Partikelspektrum zu erzeugen, sind in der Verneblerkammer bestimmte Gasströme erforderlich. In einem herkömmlichen Beatmungssystem bewirken diese Gasströme zusammen mit dem Inspirationsvolumen Spitzendrücke respektive -volumina, welche in der Lunge eines Kleintieres ein Barotrauma auslösen können und somit keine nebenwirkungsfreie Vernebelung zulassen.

Daher war die Entwicklung und Evaluation eines Systems zur Jetvernebelung während kontrollierter Beatmung im Kleintier zentraler Gegenstand der Vorarbeiten.

## 1.4 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Versuche zur Charakterisierung der Wirkung von inhaliertem Interleukin-10 auf den Endotoxin-induzierten, akuten Lungenschaden in der Ratte.

Folgenden Fragestellungen wurde nachgegangen:

- Hemmt inhaliertes IL-10 die intrapulmonale Synthese und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine?
- Hemmt inhaliertes IL-10 die Synthese und Freisetzung reaktiver Stickstoff- und Sauerstoffradikale aus ex vivo kultivierten Alveolarmakrophagen?
- Verbessert inhaliertes IL-10 die Lungenmechanik und den Gasaustausch?
- Verhindert IL-10 die Entstehung eines alveolären Ödems und den Einstrom von Entzündungszellen in den Alveolarraum?
- Beeinflusst die pulmonal-topische Applikation von IL-10 die systemische Entzündungsreaktion, speziell im Hinblick auf systemische proinflammatorische Zytokinkonzentrationen?

In vorhergehenden, umfangreichen in vitro und in vivo Untersuchungen wurde ein spezielles Verneblersystem zur Anwendung im Kleintier konstruiert, charakterisiert und evaluiert.

Zunächst wurde(n) daher:

- die apparativen Voraussetzungen zur Jetvernebelung während kontrollierter Beatmung in der Ratte geschaffen.
- die aerodynamische Größenverteilung des vom entwickelten Verneblersystem produzierten Aerosols bestimmt.
- die intrapulmonale Deposition des vom entwickelten Verneblersystem produzierten Aerosols in vivo nachgewiesen und quantifiziert.
- der Einfluss der Vernebelung auf das Versuchstier untersucht.

## **2 EIGENE UNTERSUCHUNGEN**

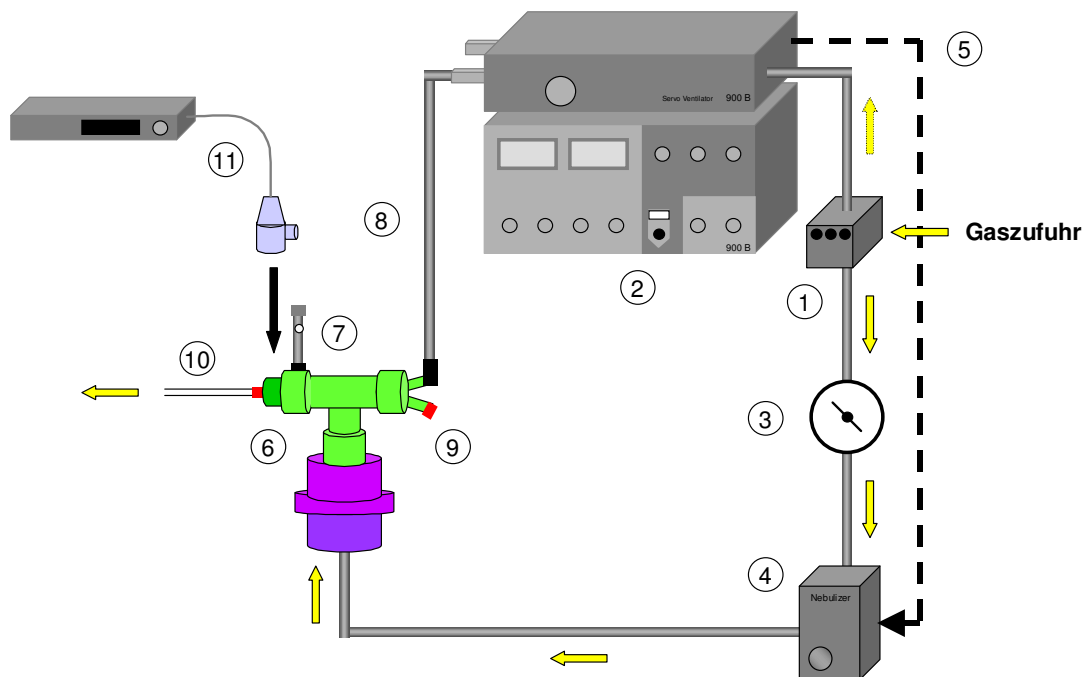
### **2.1 Entwicklung des Jetverneblersystems**

#### **2.1.1 Aufbau des Jetverneblersystems**

Die Basis für das neu entwickelte Jetverneblersystem ist ein Respirator (Siemens-Servo 900 B®, Siemens, Erlangen) mit einem zugehörigen elektronischen Druckventil (Siemens-Nebulizer-945®, Siemens, Erlangen) zur Steuerung der Vernebelung. Dieses Druckventil regelt den Gasfluss zur Verneblerkammer, so dass nur in der Inspirationsphase des Respirators Aerosol produziert wird.

Um dieses Jetverneblersystem in der Ratte einsetzen zu können, wurden folgende Modifikationen vorgenommen:

Zunächst wurde ein stufenlos regelbarer Druckminderer (O<sub>2</sub>-Druckminderer, Kuhnke, Malente) in den Versorgungsschenkel des Nebulizers eingebaut, dies erlaubte eine Reduktion des Versorgungsdrucks von 4.5 auf 1.5 bar. Dieser Versorgungsdruck entspricht einem Gasfluss von  $5.8 \pm 0.3$  l/min durch die Verneblerkammer (gemessen mit: PTS 2000™, Mallinckrodt Europe, Hertogenbosch, Niederlande). Durch Einbau eines stufenlos regelbaren Ventils im T-Stück, direkt vor der Endotrachealkanüle, wurde es möglich, den Spitzendruck während der Beatmung stufenlos zu regulieren. Zusätzlich wurde der Inspirationsschenkel vom Y-Stück, also unmittelbar vor dem Endotrachealtubus, abgekoppelt. Als Folge des Umbaus wird das Tier nunmehr nur durch den Nebulizer beatmet. Zur Bestimmung der Beatmungsdrücke und des expiratorischen Atemminutenvolumens wurde ein Atemgasanalysator (PM 8030, Dräger, Lübeck) an das Beatmungssystem angeschlossen (Abbildung 1).



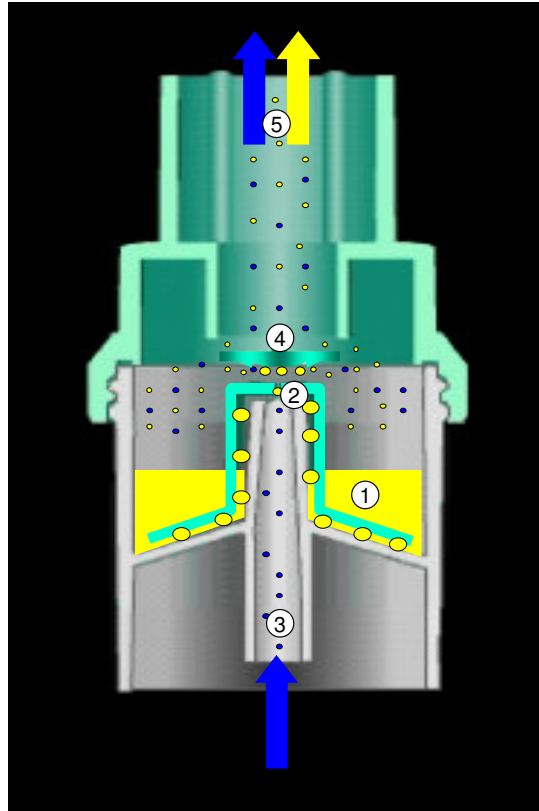
**Abb. 1** Schematische Darstellung des entwickelten Verneblersystems.

(1) Gasverteiler, (2) Respirator (Siemens-Servo 900 B<sup>®</sup>), (3) Druckminderer (Kuhnke), (4) Nebulizer (Siemens-Nebulizer-945<sup>®</sup>), (5) inspiratorische Triggerung des Nebulizers, (6) T-Stück mit Verneblerkammer (Micro Cirrus<sup>™</sup>), (7) regelbares, mechanisches Ventil, (8) Expirationsschenkel, (9) abgekoppelter Inspirationsschenkel, (10) Trachealkanüle, (11) Atemgasanalysator (PM 8030, Dräger).

Abbildung 2 zeigt Aufbau und Funktionsprinzip der verwendeten Verneblerkammer (Micro Cirrus<sup>™</sup>, Intersurgical, St. Augustin). Bei einem Gasstrom von 8 l/min liefert die Kammer ein Partikelspektrum, bei dem 90 % der Aerosolteilchen einen Durchmesser unter 2  $\mu\text{m}$  aufweisen.

**Abb. 2** Funktionsprinzip der verwendeten Verneblerkammer (Micro Cirrus™).

In der Mitte der Kammer – gefüllt mit Medikamentenlösung (1) – befindet sich eine Röhre, über der eine Düse (2) angebracht ist. Atemgas (3) strömt mit hoher Geschwindigkeit durch die Röhre und wird an der engen, oberen Öffnung der Düse noch einmal beschleunigt. Dadurch wird an dieser Stelle ein Unterdruck erzeugt (Venturi- oder Bernoulli-Effekt), und Flüssigkeit wird unter die Düse gesogen. Die Flüssigkeitssäule reißt ab; es entstehen Tröpfchen. Enthält dieses Primäraerosol zu große Tröpfchen, werden diese an der Prallplatte (4) abgeschieden und fallen zurück in die Medikamentenkammer oder sie zerfallen an der Prallplatte. Es entsteht ein inhalierfähiges Sekundäraerosol (5).



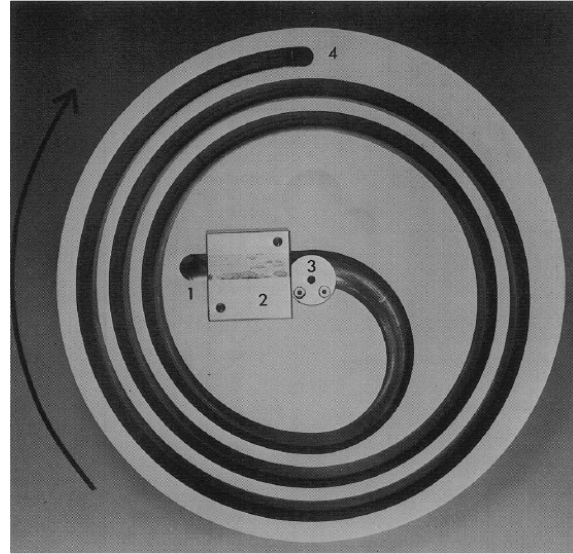
## 2.1.2 Evaluation des Jetverneblersystems in vitro

### 2.1.2.1 Material und Methodik

Wesentliches Charakteristikum eines Verneblers ist die Partikelgrößenverteilung des von ihm produzierten Aerosols. Die Bestimmung dieser Größenverteilung für das hier beschriebene, neu entwickelte Verneblersystem wurde mit Hilfe einer Aerosolzentrifuge nach Stöber (siehe Abbildung 3) [175] in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. W. G. Kreyling am Institut für Aerosolbiologie der GSF-Neuherberg durchgeführt. Um die Aerosolpartikel hierfür radioaktiv zu markieren, wurden zu 5 ml einer IL-10-Lösung (0,33 µg/ml in 0,81 prozentiger, pyrogenfreier, phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, Apotheke Innenstadt, Universitätsklinikum München)) 0,1 ml einer mit 70 MBq <sup>99m</sup>Tc-markierten Pertechnatlösung (Amersham Buchler, Braunschweig) gegeben.

**Abb. 3** Abbildung einer Stöberzentrifuge, Zentrifugenrotor mit spiralförmigem Aerosolkanal [175].

Während sich die Zentrifuge dreht (Pfeil: Rotationsrichtung), tritt Luft in den Einlass des Aerosolkanals (1) und wird durch einen Laminator (2) geführt. Das zuvor getrocknete Aerosol tritt im Zentrum des Zentrifugenrotors (3) an der Innenseite eines spiralförmigen Kanals ein und strömt parallel zur Führungsluft durch den Kanal. Aufgrund der Zentrifugalkraft werden die Aerosolteilchen durch die Kanalbreite transportiert und scheiden sich in Abhängigkeit ihres aerodynamischen Durchmessers auf der an der Kanalaußenwand liegenden Folie ab, während die Führungsluft die Zentrifuge am Aerosolaustritt (4) verlässt. Die Aktivitätsmenge des  $^{99m}\text{Tc}$  ist proportional zur Menge der abgeschiedenen IL-10-Partikel.



### 2.1.2.2 Versuchsdurchführung

Das vom Verneblersystem generierte Aerosol wurde durch einen Endotrachealtubus (Innendurchmesser: 9.0 mm, SIMS Portec Ltd., Hythe, Großbritannien) in eine mit trockener Luft gefüllte Mischkammer geleitet. Von hier wurde das getrocknete Aerosol kontinuierlich in die Aerosolzentrifuge abgegeben. Die radioaktive Aktivitätsverteilung der  $^{99m}\text{Tc}$ -Aerosolpartikel auf der Folie wurde mit einem Detektor ermittelt [48]. Nach vorheriger Kalibration der Zentrifuge mit monodispersen Latexaerosolen bekannter Größe wurde anhand einer Eichfunktion die aerodynamische Größenverteilung des Aerosols bestimmt [47]. Aus dieser aerodynamischen Größenverteilung des getrockneten Aerosols wurde dann die geometrische Größenverteilung der abgeschiedenen  $^{99m}\text{Tc}$ -markierten IL-10-Partikel berechnet. Anschließend wurde die Partikelgrößenverteilung des Testaerosols basierend auf der bekannten Konzentration der IL-10-Lösung bestimmt. Die Einstellungen am Respirator bzw. Nebulizer entsprachen denen, die später im Tiermodell angewendet wurden: Atemminutenvolumen (AMV): 0.01 l/min, Atemfrequenz (AF): 40  $\text{min}^{-1}$ , Inspirations- / Expirationszeit (I : E): 1 : 2.



## **2.1.3 Evaluation des Jetverneblersystems in vivo**

### **2.1.3.1 Material und Methodik**

#### **2.1.3.1.1 Aerosolproduktion**

Vor Beginn der tierexperimentellen Untersuchung erfolgte die Ermittlung der Vernebelungsfraction aus dem Vernebler. Durch Wiegen der Verneblerkammer vor und nach jeweils 10-minütigen Vernebelungsphasen (Sartorius, Analytical Scales, Göttingen) für die Dauer von insgesamt 60 Minuten, konnte der in dieser Zeitspanne vernebelte Anteil des zu Beginn der Vernebelung eingesetzten Volumens (5 ml) festgestellt werden. Dies wurde an sechs Verneblerkammern untersucht. Es zeigte sich, dass pro 10 Minuten ein mittleres Volumen von 0.26 (0.006) ml (Median (IQR)) vernebelt wurde.

#### **2.1.3.1.2 Versuchstiere**

Die tierexperimentelle in vivo Evaluation des Verneblersystems wurde am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Für die Versuche wurden 24 männliche Sprague-Dawley Ratten (Charles River Wiga, Sulzfeld) verwendet, das mittlere Körpergewicht der Tiere betrug  $550 \pm 49$  g. Alle Tiere wurden gemäß der Vorgaben der gültigen Tierschutzbedingungen im Tierstall des Institutes für Chirurgische Forschung betreut. Die vorliegende Untersuchung war von der zuständigen Kommission der Regierung von Oberbayern unter dem Aktenzeichen 211-2531-50/2000 genehmigt worden.

#### **2.1.3.1.3 Anästhesie und Instrumentierung**

Die Narkoseeinleitung erfolgte durch die intraperitoneale Injektion von Pentobarbital-Natrium (0.05 mg/kgKG; Narcoren, Merial, Halbergmoos) und Fentanyl (0.005 mg/kgKG; Fentanyl-Janssen, Janssen-Cilag, Neuss). Die Tiere wurden auf dem Rücken liegend auf einer Heizmatte gelagert, um die Körpertemperatur zwischen 37° und 38 °C zu halten. Die Körpertemperatur wurde kontinuierlich mit

einer rektalen Temperatursonde (Siemens Sirecust 404, Siemens, Erlangen) gemessen. Nach Erreichen von chirurgischer Toleranz wurden die Tiere tracheotomiert und mit einer 13 Gauge Kanüle (Innendurchmesser (ID): 2.0 mm, Aussendurchmesser (AD): 2.5 mm, Abbott, Wiesbaden) intubiert. Diese Kanüle wurde mittels eines Konnektors für pädiatrische Endotrachealtuben (2.5 Charrière) mit dem Beatmungsschlauch verbunden. Zur Abdichtung und Verhinderung einer Dislokation während des Versuchs wurde die Kanüle in der Trachea mit einer Ligatur gesichert. Nach chirurgischer Präparation wurden flüssigkeitsgefüllte Polyurethankatheter (ID: 0.58 mm, AD: 0.96 mm, SIMS Portex Ltd., Hythe, Großbritannien) in die rechte Arteria femoralis – zur Abnahme von Blutproben und kontinuierlicher Messung des Blutdrucks – bzw. Vena femoralis – zur intravenösen Narkoseführung – inseriert. Mittels einer Spritzenpumpe (Braun-Sicura, B. Braun, Melsungen) wurden kontinuierlich Pentobarbital (5 - 10 mg/kgKG/h) und Fentanyl (0.0025 – 0.005 mg/kgKG/h) infundiert. Während der Versuche wurden die Herzfrequenz (HF) mittels subkutanen Nadelelektroden und der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) über einen elektromechanischen Druckwandler (Statham Physiological Pressure Transducer P23x1-1, Viggo-Spectramed, Oxnard, CA, USA) kontinuierlich registriert. Die Darstellung der Parameter erfolgte auf einem Siemens Sirecust 404 Monitor (Siemens, Erlangen).

#### **2.1.3.1.4 Beatmung und Vernebelung**

Außerhalb der Vernebelungsphase wurden die Tiere mit einem neonatologischen Intensivrespirator (Stephanie®, Stephan Medizintechnik, Gackenbach) druckkontrolliert (PCV) beatmet:  $p_{\max}$ : 18 mbar, PEEP: 4 mbar, AF: 40  $\text{min}^{-1}$ ,  $\text{FiO}_2$ : 0.5, I : E: 1 : 2. Der Respirator verfügt über einen Lungenmessplatz, der unter anderem die kontinuierliche Bestimmung der dynamischen Compliance und Resistance gestattet. Die Compliance (C) beschreibt die elastischen Eigenschaften des Atmungsapparates. Sie ist definitionsgemäß das Verhältnis von Volumenänderung zu der damit verbundenen Druckänderung und wird in ml/mbar angegeben. Die

Resistance (R) ist ein Maß für den Atemwegswiderstand. Sie wird definiert durch das Verhältnis von der Druckdifferenz zwischen Atmosphäre und Alveolen und dem pro Zeiteinheit durchströmten Gasvolumen (= Flow) und wird in mbar/l/s angegeben.

Die 40-minütige Vernebelungsphase des Testaerosols wurde mit dem neu entwickelten Verneblersystem durchgeführt. Vor Beginn und nach Ende der Vernebelung wurden die Verneblerkammern gewogen (Sartorius, Analytical Scales, Göttingen), um aus der Massendifferenz die Menge der vernebelten Lösung zu ermitteln. Der Spitzendruck ( $p_{\max}$ ) im Vernebelungssystem wurde zu Beginn der Vernebelung auf 15 mbar eingestellt (Zwischenschaltung des Atemgasmonitors PM 8030). Nach 20 Minuten und am Ende der jeweiligen Vernebelungsphase wurde diese Einstellung verifiziert.

#### **2.1.3.1.5 Versuchprotokoll**

Nach der chirurgischen Präparation wurden die Tiere für 40 Minuten mit dem neonatologischen Respirator (Stephanie®) beatmet. Nach dieser Stabilisierungsphase folgte die 40-minütige Vernebelungsphase. Nach der Vernebelung wurden die Tiere abermals für 40 Minuten mit dem neonatologischen Respirator beatmet. Am Ende des Protokolls erfolgte die Tötung der Tiere durch eine Überdosis Pentobarbital und gleichzeitige Exsanguination über den arteriellen Zugang. Über die Vena femoralis wurde das Gefäßsystem für 5 Minuten mit PBS perfundiert (Flussrate: 10 ml/min). Anschließend erfolgte eine mediane Thorakotomie und das Herz-Lungen-Paket wurde entnommen. Die Pulmonalarterie wurde kanüliert und nochmals mit PBS (5 ml) perfundiert. Danach wurde die Lunge isoliert und entsprechend dem jeweiligen Protokoll präpariert (siehe 2.1.3.2.1.2, 2.1.3.2.2.2 und 2.1.3.2.2.3).

## **2.1.3.2 Versuchsdurchführung**

### **2.1.3.2.1 Einfluss der Vernebelung auf das Versuchstier**

#### 2.1.3.2.1.1 Versuchsablauf und Messungen

Das mögliche Auftreten unerwünschter Nebenwirkungen wurde durch die Vernebelung eines NaCl-Testaerosols (Natrium-Chlorid 0.9 %, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) an 8 Tieren untersucht. Neben den kontinuierlichen Messungen von HF und MAP wurden zu den Messzeitpunkten vor, während (20 Minuten nach Vernebelungsbeginn) und 10 Minuten nach Ende der Vernebelung arterielle Blutgase (arterieller Sauerstoffpartialdruck ( $p_{aO_2}$ ), arterieller Kohlendioxidpartialdruck ( $p_{aCO_2}$ )) bestimmt. Die Lungencompliance und –resistance wurden vor und in der ersten Minute nach Ende der Vernebelung dokumentiert. Die Lungen der Tiere wurden entnommen und für die lichtmikroskopische Untersuchung aufgearbeitet.

#### 2.1.3.2.1.2 Histologische Untersuchung

Nach Fixation in Formalin für 48 h (4%ige Formaldehydlösung, Apotheke Innenstadt, Universitätsklinikum München) wurden von jeder Lungenregion mehrere Längs- und Querschnitte (cranial, medial, caudal, frontal, dorsal) angefertigt. Die Gewebeproben wurden in Paraffin eingebettet, 2  $\mu$ m dick geschnitten (Mikrotom Hn 40, Fa. Leica, Nußloch) und mit Hämatoxylin und Eosin (Carl-Roth, Karlsruhe) gefärbt. Nach dem Trocknen wurden die Präparate lichtmikroskopisch (Axiophot-Mikroskop, Carl Zeiss, Oberkochen) von einem Pathologen untersucht.

### **2.1.3.2.2 Nachweis der intrapulmonalen Deposition**

#### 2.1.3.2.2.1 Präparation der Mikrosphären

Der Nachweis der pulmonalen Deposition der vom Verneblersystem produzierten Aerosolpartikel erfolgte mit Hilfe von fluoreszierenden Mikrosphären (FM). Verwendet wurden monodisperse Polystyren-Mikrosphären (FluoSpheres<sup>®</sup>, yellow-green, Durchmesser: 1  $\mu$ m, Molecular Probes, Leiden, Holland) mit einer maximalen

Exzitationswellenlänge von 458 nm und einer maximalen Emissionswellenlänge von 506 nm in einer 2%igen Verdünnung ( $3.6 \times 10^{10}$  FM/ml, in aqua dest.).

Vor der Vernebelung wurde diese Ausgangslösung für 10 Minuten Vortex-gemischt (Vortex-Reagenzglas mixer, VM300, neoLab, Heidelberg) und anschließend 20 Minuten im Ultraschallbad (Sonorex TK52H, Bandelin) behandelt. Es wurde 1 ml der Lösung entnommen, mit 4 ml destilliertem Wasser (aqua dest., Apotheke Innenstadt, Universitätsklinikum München) verdünnt und nochmals im Vortex (10 Minuten) und im Ultraschallbad (20 Minuten) gemischt. Unmittelbar vor den jeweiligen Vernebelungen wurde dieses Prozedere wiederholt, um die FM möglichst als Einzelsphären in Lösung zu halten. Für die Vernebelung wurden 2 ml dieser Mikrosphärenlösung in die Verneblerkammer gefüllt. Zur Quantifikation der pulmonalen Deposition der vernebelten FM (siehe 3.1.3.2.2.3) wurde jeweils eine Probe der vernebelten Mikrosphärenlösungen als individuelle Referenzprobe asserviert.

#### 2.1.3.2.2.2 Qualitativer Nachweis der Deposition

Die Untersuchung zur Lokalisierung der intrapulmonal deponierten FM wurde ebenfalls in 8 Tieren durchgeführt. Fixierte, ungefärbte Lungenschnitte wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dazu wurden die Lungen unmittelbar nach Entnahme am Versuchsende gebläht (mittlerer intratrachealer Druck:  $1.2 \pm 0.2$  kPa), um die anatomische Struktur der Lunge zu erhalten. Danach wurden die Lungen in flüssigem Stickstoff fixiert. Bis zum Schneiden der einzelnen Lungen mit dem Gefriermikrotom (Kryostat 1720, Fa. Leica, Nußloch) in 20  $\mu$ m dünne Schnitte, wurden die Organe bei  $-80$  °C aufbewahrt. Die Schnitte wurden mit einem Zeiss®-Axiophot-Mikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen) untersucht. Mit Fluoreszenzauflicht der Wellenlänge 450 – 490 nm (Filter: Leitz, Wetzlar) wurden die FM zur Emission gebracht; die Darstellung der pulmonalen Strukturen erfolgte mit konventioneller Lichtmikroskopie.

#### 2.1.3.2.2.3 Quantitativer Nachweis der Deposition

Der quantitative Nachweis der Deposition erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Glenny et al. [66;67]. Die isolierten Lungen von 8 Tieren wurden hierbei vor Entnahme ebenfalls gebläht und für 48 h bei 45 °C getrocknet. Nach dem Abpräparieren der Trachea und der großen Bronchien wurden die Lungenlappen entlang der intrapulmonalen Bronchien bis zur Aufzweigung der Bronchio-Alveolar-Gänge mikrodissiziert. Auf Grund seiner Größe wurde der linke Lungenflügel horizontal in drei Abschnitte aufgeteilt. Nach Wiegen der Lungenproben (Sartorius, Analytical Scales, Göttingen) wurden diese einzeln für 24 h in Polypropylengefäßen (Nunc, Roskilde, Dänemark) mit 2.0 ml Cellosolve® (2-Ethoxy-Ethyl-Acetat, 99 %, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen) inkubiert. Cellosolve® löst den Fluoreszenzfarbstoff aus den im Gewebe deponierten FM, so dass sich der Farbstoff homogen in der Lösung verteilt. Schließlich wurde aus jedem Gefäß eine Flüssigkeitsprobe entnommen und die Fluoreszenzintensität mit einem automatisierten Lumineszenz-Spektrophotometer (LS 50 B, Perkin Elmer, Überlingen) [192] bestimmt.

Um von der Fluoreszenzintensität auf die Anzahl der FM rückschließen zu können, muss eine direkte Proportionalität zwischen beiden Parametern bestehen. Um diesen Zusammenhang mittels einer Eichkurve zu ermitteln, wurde eine Verdünnungsreihe in 10 Stufen ( $3.6 \times 10^6$  bis  $720 \times 10^6$  FM/ml) hergestellt. Zur Einstellung einer bestimmten Anzahl FM pro Volumen wurden die jeweiligen Mikrosphärenlösungen manuell in einer Zählkammer (Neubauer-improved, Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf) ausgezählt. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität spektrophotometrisch ermittelt (LS 50 B, Perkin Elmer, Überlingen).

Aus dem Verhältnis der in den Lungen nachweisbaren FM zu den vernebelten FM wurde die Aerosoldeposition errechnet. Hierfür wurde zunächst die jeweils vernebelte FM-Fraktion mittels der Gravimetrischen Methode bestimmt. Dazu wurde vor und nach der Vernebelung die gefüllte Verneblerkammer gewogen sowie

die individuelle Fluoreszenzintensität der vernebelten Lösung spektrophotometrisch bestimmt. Über die Massendifferenz konnte auf die vernebelte Fraktion geschlossen werden.

## **2.2 Vernebelung von IL-10**

### **2.2.1 Material und Methodik**

#### **2.2.1.1 Versuchsaufbau und Studiendesign**

Mit der Entwicklung und Evaluation des Verneblersystems waren die notwendigen methodischen Voraussetzungen geschaffen, um den Einfluss von Interleukin-10-Aerosol auf die pulmonale und systemische Entzündungsreaktion während experimenteller Endotoxinämie in der Ratte zu untersuchen. Die vorliegende Untersuchung erfolgte als kontrollierte, prospektive und randomisierte Studie.

Die Tierexperimente wurden ebenfalls am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Für die Versuche wurden insgesamt 24 männliche Sprague-Dawley Ratten (Charles River Wiga, Sulzfeld) mit einem mittleren Körpergewicht von  $550 \pm 50$  g verwendet. Alle Tiere wurden gemäß den Vorgaben der gültigen Tierschutzbestimmungen im Tierstall des Instituts für Chirurgische Forschung der Universität München betreut. Die vorliegende Untersuchung war zuvor von der zuständigen Kommission der Regierung von Oberbayern unter dem Aktenzeichen 211-2531-50/2000 genehmigt worden.

#### **2.2.1.2 Experimentelle Endotoxinämie**

Die Induktion des experimentellen Lungenschadens erfolgte durch intravenöse Injektion von Endotoxin (Lipopolysaccharid, LPS, E. coli Serotyp 055:B5, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen). Das lyophilisierte LPS wurde in PBS gelöst bzw. verdünnt (Konzentration: 5 mg/ml) und bis zur Verwendung in Aliquots zu je 1 ml bei  $-20$  °C gelagert.

Bei LPS handelt es sich um den löslichen Bestandteil der Hüllmembran gram-negativer Bakterien. Die Applikation von LPS führt via Freisetzung proinflammatorischer Substanzen zu Entzündungsreaktionen, die lokal beschränkt oder auch systemisch auftreten können. Bei Versuchstieren unterschiedlicher Spezies bewirkt die systemische Applikation von LPS pulmonale Veränderungen, die denen des Menschen bei ARDS qualitativ entsprechen [73]. In der Ratte kommt es durch LPS-Stimulation zu einer Alveolitis, die durch eine gestörte Integrität des Gefäßendothels sowie die Akkumulation und alveoläre Sequestration von neutrophilen Granulozyten gekennzeichnet ist [128;188].

### **2.2.1.3 Interleukin-10**

Für die vorliegende Studie wurde rekombinantes Interleukin-10 der Ratte (R&D Systems, Wiesbaden; als Lyophilisat zu je 25 µg, Reinheit >98 %, spezifische Aktivität:  $5 \times 10^5$  U/mg (Herstellerangaben)) verwendet. Nach dem Wiederauflösen in PBS wurden durch weitere Zugabe von PBS Einzelproben mit einer IL-10-Endkonzentration von 5 µg/ml hergestellt. Diese Proben wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

## **2.2.2 Versuchsdurchführung**

### **2.2.2.1 Anästhesie, chirurgische Präparation und Monitoring**

Die Narkoseführung, Instrumentierung und das kontinuierliche Monitoring entsprechen der unter 2.1.3.1 beschriebenen Vorgehensweise. Zur Vernebelung wurde das neu entwickelte und im ersten Teil der vorliegenden Arbeit beschriebene Verneblersystem verwendet. Außerhalb der Vernebelungsphase wurden die Tiere mit dem bereits in der Vorstudie verwendeten, neonatologischen Intensivrespirator (Stephanie®) druckkontrolliert beatmet ( $p_{\max}$ : 18, PEEP: 4 cm H<sub>2</sub>O, AF: 40 min<sup>-1</sup>, FiO<sub>2</sub>: 0.5, I:E: 1:2). Über den intravenösen Zugang erfolgte die Volumensubstitution (NaCl 0.9 %, 7.5 – 15 ml/kgKG/h) und in Abhängigkeit von der Versuchsgruppe die Injektion von LPS. Zur Aufrechterhaltung eines ausreichenden Perfusionsdrucks der



Systemzirkulation wurden bei Unterschreiten eines MAP von 80 mmHg Hydroxyethylstärke (HAES, 200/0.5, 10 %, Hemohe, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) und NaCl-Lösung (im Verhältnis 1:1) bis zu 4 ml pro Stunde i.v. appliziert. Bei einem weiteren Blutdruckabfall erfolgte die kontinuierliche Perfusion von Noradrenalin (0.02 - 1 mg/kg/h, i.v., Arterenol, Aventis, Frankfurt).

Zu den Messzeitpunkten wurden aus dem arteriellen Katheter zwei 80 µl fassende heparinisierte Glaskapillaren (Clinitubes, Fa. Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) zur Blutgasanalyse (Chiron Diagnostics, Fernwald) und zur Analyse des peripheren Blutbildes (Hemocytometer, Coulter ACT Counter, Coulter Electronics, Krefeld) entnommen. Eine eventuell bestehende metabolische Azidose (pH < 7.30, negativer Basenüberschuss (BE) < -5, keine respiratorische Komponente) wurde mit Bicarbonatlösung (NaHCO<sub>3</sub>-Bedarf, entsprechend:  $\text{NaHCO}_3_{[\text{mEq}]} = \text{BE}_{[\text{mEq/l}]} \times 0.3 \times \text{KG}_{[\text{kg}]}$ ) korrigiert.

### **2.2.2.2 Versuchsgruppen und -protokoll**

Es wurden randomisiert drei Versuchsgruppen (je n = 8) gebildet. Die Gruppeneinteilung erfolgte nach Abschluss der chirurgischen Präparation:

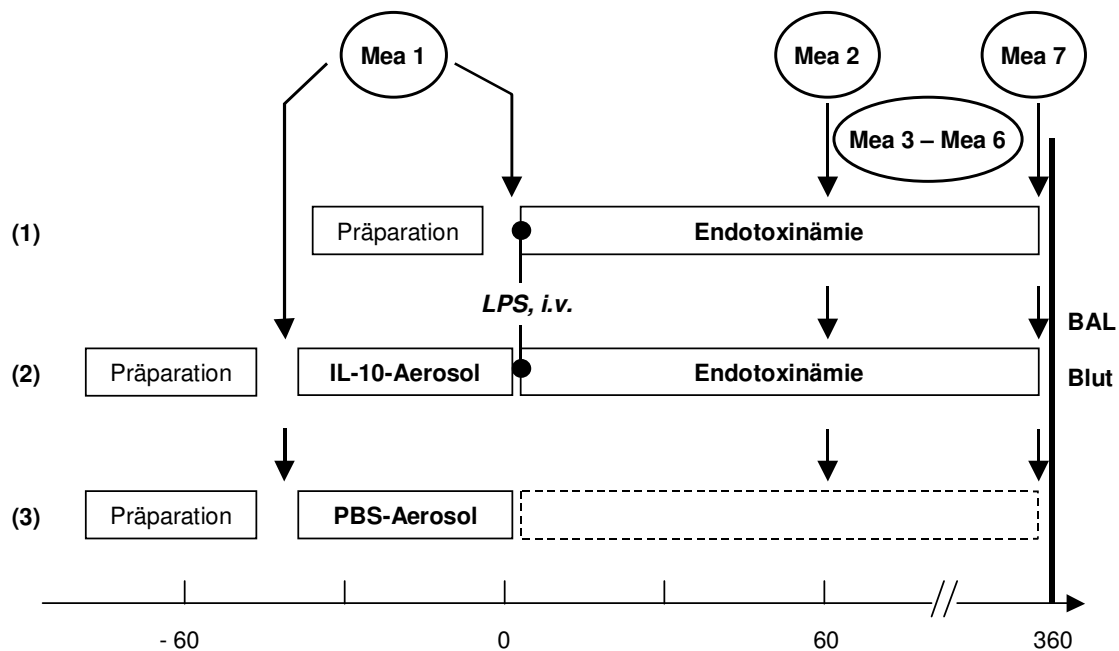
*LPS-Gruppe:* Nach der chirurgischen Präparation und einer 15-minütigen Stabilisierungsphase erfolgte die Induktion des inflammatorischen Lungenschadens durch intravenöse LPS-Injektion (5 mg/kgKG, über 10 Minuten).

*IL-10-Gruppe:* Unmittelbar vor LPS-Stimulation der Tiere erfolgte eine Behandlung mit IL-10-Aerosol. Ziel war eine intrapulmonale Deposition von 0.1 µg IL-10 pro Tier. Dies wurde durch Vernebelung von 1 ml der eingesetzten IL-10 Lösung (Konzentration: 5 µg/ml) erreicht; hierzu wurde eine Vernebelungsdauer von 40 Minuten benötigt (siehe 2.1.3.1.1).

*Kontrollgruppe (SHAM):* Evaluation der Auswirkung von Narkose, chirurgischer Präparation und Beatmung bzw. Applikation von Aerosol auf die untersuchten

Parameter. Die Tiere dieser Gruppe erhielten die IL-10-Trägerlösung (PBS, 1 ml in 40 Minuten) per inhalationem, gefolgt von einer Injektion mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0.9 %) anstelle von LPS.

Nach Injektion von LPS bzw. NaCl wurden die Tiere aller Versuchsgruppen für einen Zeitraum von 6 Stunden druckkontrolliert beatmet. Während des Versuchs wurden die Beatmungs- und Vitalparameter kontinuierlich überwacht und stündliche laborchemische Messungen durchgeführt (Mea 1 - 7). Am Ende des Beobachtungszeitraumes wurden die Tiere durch eine Überdosis Pentobarbital und gleichzeitige Exsanguitation über den arteriellen Zugang getötet. Anschließend wurde eine Bronchoalveoläre Lavage (BAL) durchgeführt. Eine Darstellung des genauen Ablaufs der Versuche bei den einzelnen Versuchsgruppen zeigt Abbildung 4.



**Abb. 4** Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls.

Nach Abschluss der Präparation Randomisierung der Versuchsgruppen. **(1)** LPS-Gruppe: Induktion der Endotoxinämie mit LPS. **(2)** IL-10-Gruppe: Vernebelung von IL-10-Aerosol und anschließend Induktion der Endotoxinämie mit LPS. **(3)** Kontrollgruppe: alleinige Vernebelung von PBS-Aerosol. Mea = Measurement; Messzeitpunkt.

### **2.2.2.3 Gewinnung und Aufarbeitung der Blutproben**

Zunächst wurde mit einem Hemocytometer die Anzahl der Leukozyten im heparinisierten Blut bestimmt (Heparin-Natrium, Ratiopharm, Ulm). Zur Analyse des Differentialblutbildes wurden zwei Blutaussstriche angefertigt und nach der Methode von Pappenheim (May-Grünwald-Giemsa-Färbung, Fa. Carl-Roth, Karlsruhe) gefärbt und mikroskopisch differenziert (in 100 Leukozyten). Zur Gewinnung von Plasma wurde das restliche Blut 10 Minuten bei 2500 Umdrehungen/min zentrifugiert (Hettich Rotanda/S Zentrifuge, Wagner & Munz, München), der Überstand abpipettiert und bis zur weiteren Aufarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### **2.2.2.4 Durchführung und Aufarbeitung der BAL**

Der Thorax wurde eröffnet und die Lunge mobilisiert. Die Lunge wurde mit 10 Aliquots á 10 ml PBS über die liegende Trachealkanüle in situ gespült. Die von jedem Tier gewonnene Lavageflüssigkeit (BAL) wurde gepoolt und ihr Gesamtvolumen bestimmt. Nach Zentrifugation bei 1500 U/min für 10 Minuten wurde der Überstand abgenommen und das entstandene Zellpellet einmal mit PBS gewaschen. Der zellfreie Überstand des Pellets (BALF; Bronchoalveolar lavage fluid) wurde nochmals zentrifugiert (3000 U/min) und in Einzelproben bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Das Zellpellet wurde in 2 ml Kulturmedium (RPMI 1640, Seromed, Berlin) mit 2 mM L-Glutamin (Seromed, Berlin), 0.16 mg/ml Gentamycin (Merck, Darmstadt) und 10 % fetalem Rinderserum (FCS, Boehring, Mannheim) resuspendiert. Die Gesamtzellzahl dieser Zellsuspension wurde mit dem Hemocytometer bestimmt. Zur Zelldifferenzierung wurden mit Hilfe einer Zytozentrifuge (5 Minuten bei 500 U/min; Shandon Life Science, Frankfurt) Zellpräparate angefertigt. Nach May-Grünwald-Giemsa-Färbung konnte anhand morphologischer Kriterien der Anteil der Alveolarmakrophagen bestimmt werden. Der Anteil vitaler Zellen an der Gesamtzellzahl (= Viability) wurde mit der Trypanblaumethode [135] (1 %ige Trypanblau-Lösung, Fluka AG, Neu Ulm) bestimmt. In Zellen mit einer intakten Zellmembran kann der Farbstoff

nicht eindringen, d.h. die Anzahl ungefärbter Zellen pro 100 Zellen ergibt die Viability in Prozent. Für die weiteren Analysen wurde die restliche Zellsuspension auf  $1 \times 10^6$  vitale Zellen/ml eingestellt.

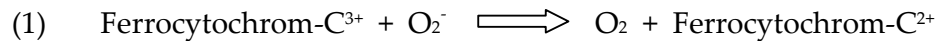
### **2.2.2.5 $\text{NO}_2^-$ -Freisetzung aus Alveolarmakrophagen**

Über Adhärenz wurden die Alveolarmakrophagen (AM) von den restlichen Zellen in der Zellsuspension getrennt. Dazu wurde die Zellsuspension in 96-well Kulturplatten (Flachboden; Nuclon Delta Surface, Nunc, Roskilde, Dänemark) ausgesät ( $0.2 \times 10^6$  AM/well, 200  $\mu\text{l}$ /well) und für 2 h bei 37 °C bei 5 %  $\text{CO}_2$  und 21 %  $\text{O}_2$  kultiviert. Nach dieser Zeit wurden die nun adhärennten Alveolarmakrophagen einmal gewaschen (mit RPMI 1640, + 2 mM  $\text{l}$ -Glutamin, + 0.16 mg/ml Gentamycin), um nicht-adhärennte Zellen zu entfernen. Danach wurde den AM 200  $\mu\text{l}$ /well frisches Kulturmedium (RPMI 1640, + 2 mM  $\text{l}$ -Glutamin, + 0.16 mg/ml Gentamycin, + 10 % FCS) zugesetzt. Ein Teil der AM wurde mit LPS (1  $\mu\text{g}$ /ml; E. coli, Serotype 0.55:B5, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h kultiviert (37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ , 21 %  $\text{O}_2$ ).

Nach Ablauf dieser Zeit wurde das freigesetzte Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) mit Hilfe der Griess-Reaktion bestimmt [35;74]. Das Verfahren beruht auf dem Nachweis der stabilen Oxidationsprodukte Nitrat und Nitrit durch eine Azoreaktion im Zellüberstand. Dazu wurden die Kulturplatten zentrifugiert (2000 U/min, 10 Minuten), und jeweils 50  $\mu\text{l}$  des Überstandes abpipettiert. Die Überstände wurden mit 50  $\mu\text{l}$  Griessreagenz (1 % Sulfanilamid, 0,1 % Naphthylethylendiamin, 2,5 % Phosphorsäure) für 10 Minuten inkubiert; anschließend Messung der Absorption bei 550 nm (Microplate Reader Ear 400 AT, Salzburger Labortechnik, Salzburg, Österreich). Gleichzeitig wurde auch eine vorher angefertigte Verdünnungsreihe mit Natriumnitrat gemessen. Abschließend konnte der Nitritgehalt der Zellkulturüberstände anhand dieser Standardkurve ermittelt werden.

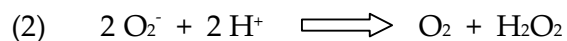
### 2.2.2.6 O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Freisetzung aus Alveolarmakrophagen

Die in vitro Produktion von Superoxidanionen (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) durch Alveolarmakrophagen wurde mit Hilfe eines Superoxidanionenassays bestimmt. Dieses Verfahren basiert auf der Reduktion von Ferrocytochrom-C durch freigesetzte Superoxidanionen [38;144] (Gleichung 1).



Diese Reduktionsreaktion bewirkt eine Absorptionszunahme im Zellüberstand, die photometrisch bei 550 nm bestimmt werden kann.

Die Zellsuspension wurde in 96-well Kulturplatten (0.2 x 10<sup>6</sup>/well) ausgesät und für 2 h zur Adhärenz der Alveolarmakrophagen kultiviert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 21 % O<sub>2</sub>). Nach diesen 2 h wurden die AM zweimal mit 37°C warmer HBSS (Hanks` Balanced Salt Solution, + Ca<sup>2+</sup>, + Mg<sup>+</sup>, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen) gewaschen, um nicht adhärente Zellen zu entfernen. Danach wurden die AM mit 200 µl/well der jeweiligen Reaktionslösung inkubiert. Die Reaktionslösungen bestanden aus HBSS versetzt mit Cytochrom-C (160 µM, Typ VI from Horse Heart, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen), wobei bei einem Teil der AM zur Stimulation PMA (20 nM, Phorbol-12-myristat-13-acetat, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen), ein potentes Stimulans der Sauerstoffradikalproduktion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) aus Gewebemakrophagen [143] zugesetzt wurde. Außerdem wurde für beide Gruppen (unstimuliert / stimuliert) in einem Vergleichsansatz die unspezifische Reduktion des Cytochrom-C durch Zugabe des Cytochrom-C-Inhibitors Superoxiddismutase (SOD, 300 U/ml, von bovinen Erythrozyten, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen) erfasst. SOD katalysiert folgende Reaktion (Gleichung 2):



Nach Kultivierung der Mikrotiterplatten für 1 h bzw. 2 h wurde mittels eines Spektrophotometers die Absorption bei 550 nm bestimmt. Die O<sub>2</sub><sup>-</sup>-spezifische

Cytochrom-C Reduktion ergibt sich aus der Differenz des Reaktionsansatzes *ohne* SOD und des Vergleichsansatzes *mit* SOD. Zur Umrechnung der Absorptionsdifferenz in  $\text{nmol O}_2^- / 0.2 \times 10^6$  Makrophagen wurde ein Extinktionskoeffizient von  $15,87 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  verwendet [144].

### **2.2.2.7 Bestimmung der Proteinkonzentration in der BAL**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in der zellfreien Lavageflüssigkeit wurde mit einem Bicinchoninsäure (BCA)-Assay (Pierce, Rockford, USA) nach der Methode von Smith et al. [171] unter Verwendung einer Albumin-Standardkurve (Bovines Serumalbumin, BSA, Behring, Marburg) durchgeführt. In einem alkalischen System reduziert Protein  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu einem farbigen Komplex (Biuret-Reaktion), der mit Bicinchoninsäure (BCA) verstärkt wird. Dieser  $\text{Cu}^{1+}$ -BCA-Komplex ist sehr stabil und farbintensiv mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm.

### **2.2.2.8 Zytokinbestimmungen in BAL und Plasma**

Die quantitative Bestimmung von Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1), Interleukin-6 (IL-6), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), RANTES (engl.: *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*) und Interleukin-10 (IL-10) erfolgte mit standardisierten ELISA-Kits (Quantikine, R&D Systems, Wiesbaden). Hierbei handelt es sich um einen Sandwich-Enzym-Immunoassay, d.h. die Mikroplatte ist bereits mit einem monoklonalen Antikörper (capture antibody) beschichtet, der spezifisch gegen ein bestimmtes Zytokin gerichtet ist. Standards, Kontrollen und das Probenmaterial werden auf die Platte pipettiert, und das zu bestimmende Zytokin bindet an den Antikörper an der Oberfläche der Platte. Nach Waschen der Platte wird ein enzymgekoppelter, polyklonaler Antikörper (detection antibody), spezifisch für ein sekundäres Epitop des Zytokins, hinzugegeben. Es bildet sich ein Zytokin-Antikörper-Komplex. Nach nochmaligem Waschen wird dann die Substratlösung hinzugegeben, die enzymatisch in ein farbiges Produkt umgewandelt wird. Die Farbintensität wird photometrisch bestimmt und ist proportional zur Menge des im

ersten Schrittes an die Platte gebundenen Zytokins. Anhand der Standardkurve kann die Zytokinkonzentration in pg/well bzw. pg/ml berechnet werden.

Um den zeitlichen Verlauf der IL-10-Plasmakonzentration verfolgen zu können, wurden zusätzlich je 2 Tiere der LPS- bzw. IL-10-Gruppe benötigt (Versuchsgruppen: vgl. 2.2.2.2). Abweichend vom zuvor beschriebenen Versuchsprotokoll wurden hierfür beginnend unmittelbar nach LPS-Injektion halbstündliche Blutabnahmen (je 0.5 ml, heparinisiert) durchgeführt. Zur Gewinnung von Plasma wurde das Blut 10 Minuten bei 2500 Umdrehungen/min zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und bis zur Bestimmung der IL-10-Konzentrationen mittels ELISA bei -80°C eingefroren.

## **2.3 Statistik**

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SigmaStat® 2.0 (SPSS-Jandel Scientific, Erkrath). Ein Teil der Daten war nicht normalverteilt, weshalb ausschließlich nichtparametrisch getestet wurde. Alle Versuchsgruppen wurden mittels Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks und anschließender post-hoc Analyse mit Hilfe des Student-Newmann-Keuls Tests gegeneinander auf signifikante Unterschiede getestet. Innerhalb jeder Gruppe wurden die Daten mit Hilfe der wiederholten verbundenen Varianzanalyse nach Friedman und anschließender post-hoc Analyse mittels Dunnett-Test auf signifikante Änderungen gegenüber den Ausgangswerten (Baseline) getestet. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$  war auf 5 % festgelegt; bei  $p < 0.05$  wurde die zugehörige Nullhypothese „kein Unterschied zwischen den Messzeitpunkten“ verworfen. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt als Median mit Interquartilsabstand (IQR, Differenz zwischen 75. und 25. Perzentil bzw. 3. und 1. Quartil).

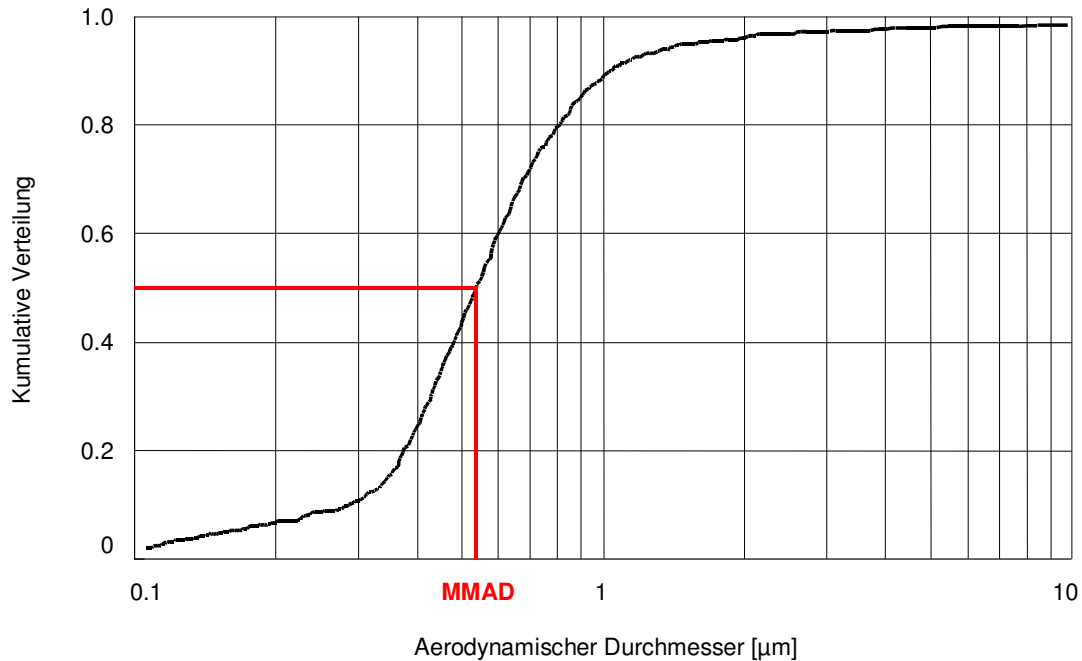
## **3 ERGEBNISSE**

### **3.1 Entwicklung und Evaluation des Jetverneblersystems**

#### **3.2.1 Evaluation des Jetverneblersystems in vitro**

Die kumulative Größenverteilung der Aerosolteilchen, die das neu entwickelte Verneblersystem produziert, ist in Abbildung 5 dargestellt. Die kumulative Verteilung beschreibt die relative Teilchenmasse eines bestimmten Durchmessers an der Gesamtheit der untersuchten, trockenen Teilchen. Die Partikelgröße, die mit 50 % der kumulativen Verteilung korrespondiert, entspricht dem medianen aerodynamischen Massendurchmesser (Mass Median Aerodynamic Diameter, MMAD). Im vorliegenden Falle lag der MMAD der getrockneten IL-10-Partikel bei  $0.54 \mu\text{m}$ . Dies entspricht einem geometrischen Teilchendurchmesser von  $2.0 \mu\text{m}$ . Die Geradensteigung an dieser Stelle entspricht der geometrischen Standardabweichung (GSD); hier 1.6.





**Abb. 5** Aerodynamische Größenverteilung des Aerosols.

Kumulative Verteilungsfraction der getrockneten  $^{99m}\text{Tc}$ -IL-10-Aerosol-Partikel als Funktion ihres aerodynamischen Durchmessers.

### 3.1.2 Evaluation des Jetverneblersystems in vivo

#### 3.1.2.1 Einfluss der Vernebelung auf das Versuchstier

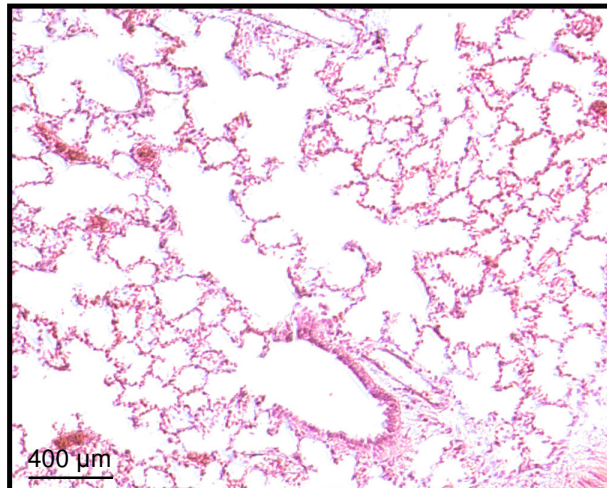
Weder die Herzfrequenz, der mittlere arterielle Blutdruck, der arterielle Sauerstoffpartialdruck noch der arterielle Kohlendioxidpartialdruck unterschieden sich zu den Messzeitpunkten vor, während und nach der 40-minütigen Vernebelung signifikant voneinander. Die Parameter der Lungenmechanik (Compliance, Resistance) unterschieden sich nach der Vernebelung ebenfalls nicht von denen vor der Vernebelung (Tabelle 1).

**Tabelle 1** In vivo Parameter vor (PRE), während (VN) und nach (POST) der 40-minütigen Vernebelung von Testaerosol (NaCl (0.9 %), 1 ml). (Median (IQR)).

|      | HF<br>[min <sup>-1</sup> ] | MAP<br>[mmHg] | paO <sub>2</sub><br>[mmHg] | paCO <sub>2</sub><br>[mmHg] | C<br>[ml/mbar] | R<br>[mbar/l/s] |
|------|----------------------------|---------------|----------------------------|-----------------------------|----------------|-----------------|
| PRE  | 357 (14)                   | 135 (22)      | 143 (21)                   | 30 (7)                      | 0.45 (0.25)    | 123 (23)        |
| VN   | 350 (19)                   | 142 (36)      | 156 (65)                   | 28 (8)                      | -              | -               |
| POST | 347 (26)                   | 147 (33)      | 141 (52)                   | 27 (11)                     | 0.45 (0.25)    | 126 (20)        |

HF = Herzfrequenz; MAP = mittlerer arterieller Blutdruck; paO<sub>2</sub> = arterieller Sauerstoffpartialdruck; paCO<sub>2</sub> = arterieller Kohlendioxidpartialdruck; C = Compliance; R = Resistance

Die histologische Untersuchung des Lungengewebes ergab keinen Hinweis auf gewebsschädigende Effekte durch die Vernebelung mit dem neu konstruierten Jetverneblersystem. Das Bronchialepithel und der bronchio-alveoläre Übergang zeigten eine reguläre Morphologie. Es fand sich keine interstitielle oder intraalveoläre Entzündungsreaktion sowie kein Zeichen für ein Barotrauma. Abbildung 6 zeigt exemplarisch einen Schnitt aus dem rechten Mittellappen.

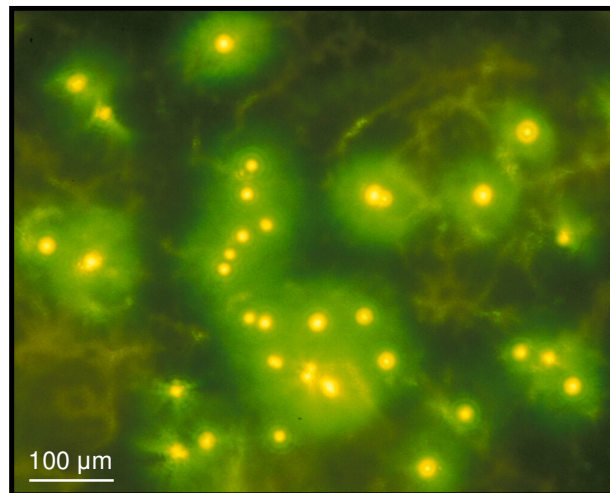


**Abb. 6** Histologischer Lungenschnitt nach 40-minütiger Vernebelung, (rechter Mittellappen, HE-Färbung, 100x).

### 3.1.2.2 Nachweis der intrapulmonalen Deposition

#### 3.1.2.2.1 Qualitativer Nachweis der Deposition

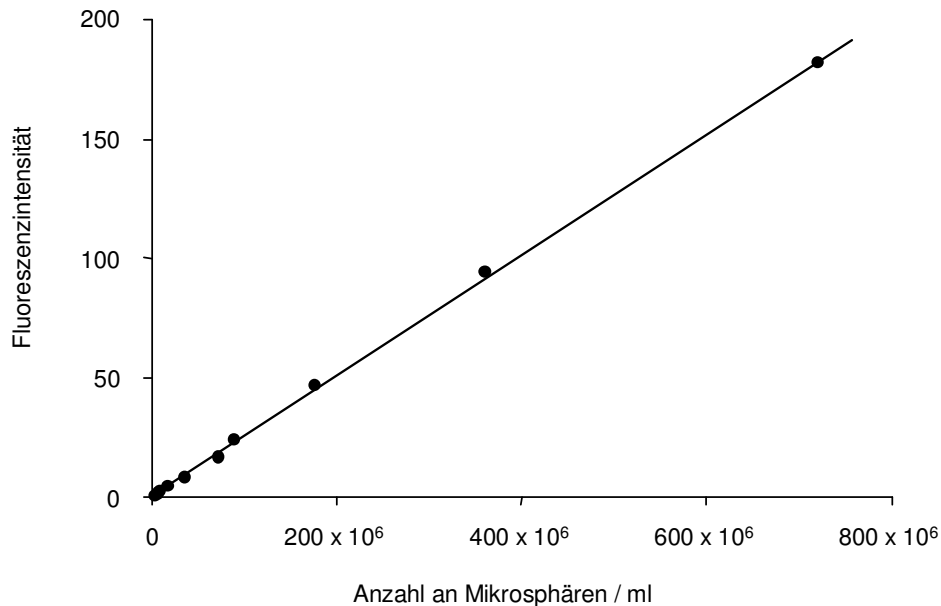
Die vernebelten, fluoreszierenden Mikrosphären waren bis in die Alveolen nachweisbar (Abbildung 7). Dargestellt ist ein Schnitt aus dem rechten Mittellappen. In allen – aus verschiedenen Lungenbereichen – angefertigten Schnitten zeigte sich ein entsprechendes Bild.



**Abb. 7** Intrapulmonal deponierte fluoreszierende Mikrosphären. Fluoreszenzmikroskopie rechter Mittellappen (Gefrierschnitt, ungefärbt, 400x).

#### 3.1.2.2.2 Quantitativer Nachweis der Deposition

Die Fluoreszenzintensität als Funktion der Mikrosphärenzahl ist in Abbildung 8 gezeigt. Die Messung der Fluoreszenz war im Bereich von  $3.6 \times 10^6$  bis  $720 \times 10^6$  FM/ml nahezu linear abhängig von der Anzahl der FM. Der lineare Korrelationskoeffizient  $r$  war  $> 0.99$ . Die Gleichung der Regressionsgeraden lautete:  
$$y(x) = 2.52 \cdot 10^{-7} x + 0.49.$$



**Abb. 8** Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Anzahl der Mikrosphären (Eichkurve).

Die Fluoreszenz steigt linear mit der Mikrosphärenzahl. Anhand der Regressionsgeraden bzw. Geradengleichung kann aus der Stärke des Fluoreszenzsignals die Mikrosphärenzahl berechnet werden.

Von der vernebelten FM-Ausgangslösung deponierten 3.8 (1.3) % (Median (IQR)) auf alveolärer Ebene. Zur Bestimmung der regionalen Verteilung wurde die Gesamtdeposition gleich 100 % gesetzt. Die Werte für die verschiedenen Lungenabschnitte sind gewichtskorrigiert. Sowohl im Lobus anterior, Lobus medialis, Lobus posterior und im post-cavalen Lappen der rechten Lunge als auch im in drei Abschnitte unterteilten, singulären linken Lungenflügel verteilten sich die Aerosolteilchen nahezu homogen (siehe Tabelle 2).

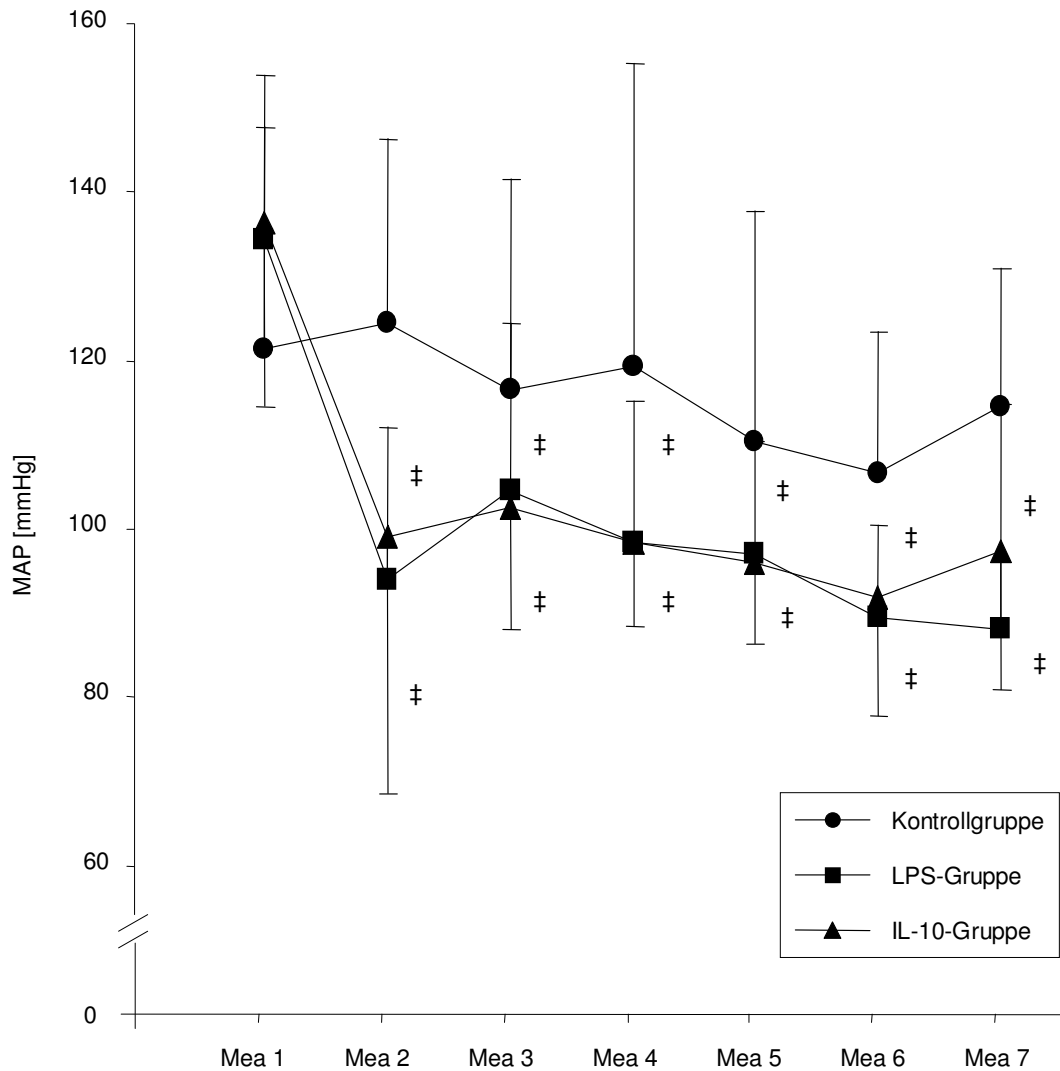
**Tabelle 2** Regionale Verteilung der intrapulmonal deponierten, fluoreszierenden Mikrosphären. Dargestellt ist die regionale Deposition als Fraktion der Gesamtdeposition. (Median (IQR))

| <b>Lungenlappen</b> | <b>Lungenabschnitt</b> | <b>Deposition [%]</b> |
|---------------------|------------------------|-----------------------|
| Rechte Lunge        | Lobus anterior         | 12.8 (0.43)           |
|                     | Lobus medialis         | 13.7 (0.54)           |
|                     | Lobus posterior        | 14.7 (0.34)           |
|                     | Post-cavaler Lappen    | 13.5 (0.41)           |
| Linke Lunge         | Pars proximalis        | 12.0 (0.11)           |
|                     | Pars medialis          | 13.4 (0.48)           |
|                     | Pars distalis          | 16.0 (0.65)           |

## 3.2 Vernebelung von IL-10

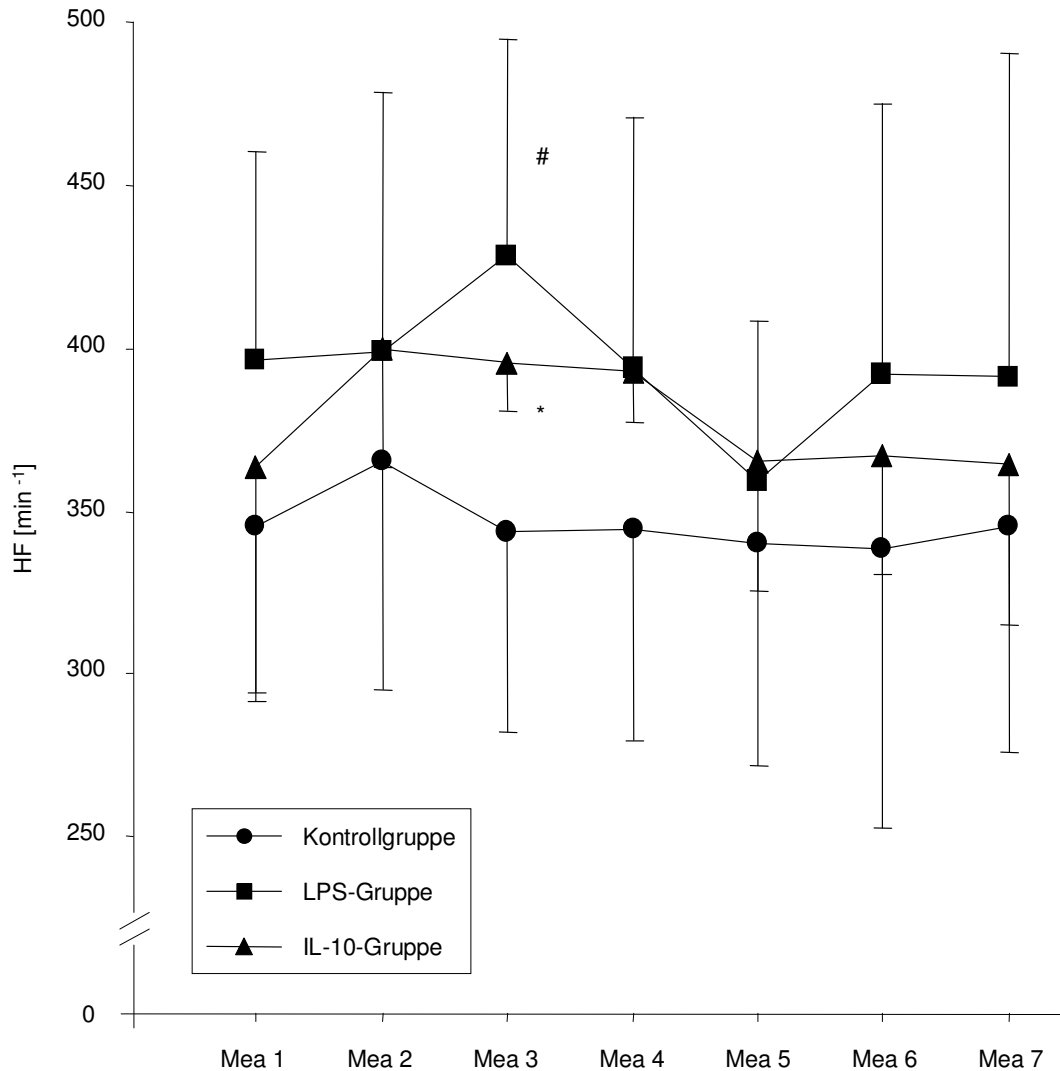
### 3.2.1 Hämodynamik

Der mittlere arterielle Blutdruck (Abbildung 9) nahm in den LPS- und IL-10-Gruppen, d.h. bei den endotoxämischen Tieren, nach Endotoxingabe über den Versuchsablauf (Mea 2 bis Mea 7) im Vergleich zum Ausgangswert (Mea 1) signifikant ab. Aufgrund der therapeutischen Interventionen (Gabe von Volumen und Noradrenalin) wurde ein längerfristiges Absinken unter 80 mmHg nicht beobachtet. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen konnten nicht festgestellt werden.



**Abb. 9** Verlauf des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) während des Versuchszeitraumes. (Median (IQR)); Mea 1: Ausgangswert, Mea 2–7: stündliche Messzeitpunkte nach LPS- / NaCl-Injektion;  $p < 0.05$ , ‡ vs. Mea 1.

Die Herzfrequenz (Abbildung 10) veränderte sich über die Zeit in keiner Gruppe, bei Mea 3 war die Herzfrequenz bei beiden endotoxämischen Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (LPS:  $428 (67) \text{ min}^{-1}$  vs.  $344 (62) \text{ min}^{-1}$ ; IL-10:  $395 (14) \text{ min}^{-1}$  vs.  $344 (62) \text{ min}^{-1}$ ).



**Abb. 10** Verlauf der Herzfrequenz (HF) während des Versuchszeitraumes. (Median (IQR)); Mea 1: Ausgangswert, Mea 2–7: stündliche Messzeitpunkte nach LPS- / NaCl-Injektion  $p < 0.05$ , # LPS vs. Kontrolle, \* IL-10 vs. Kontrolle.

### 3.2.2 Lungenmechanik

Sowohl die Compliance als auch die Resistance wiesen über den gesamten Untersuchungszeitraum keine Unterschiede zwischen den Gruppen auf. Auch innerhalb der einzelnen Gruppen gab es keine signifikanten Veränderungen dieser Parameter (Tabelle 3).

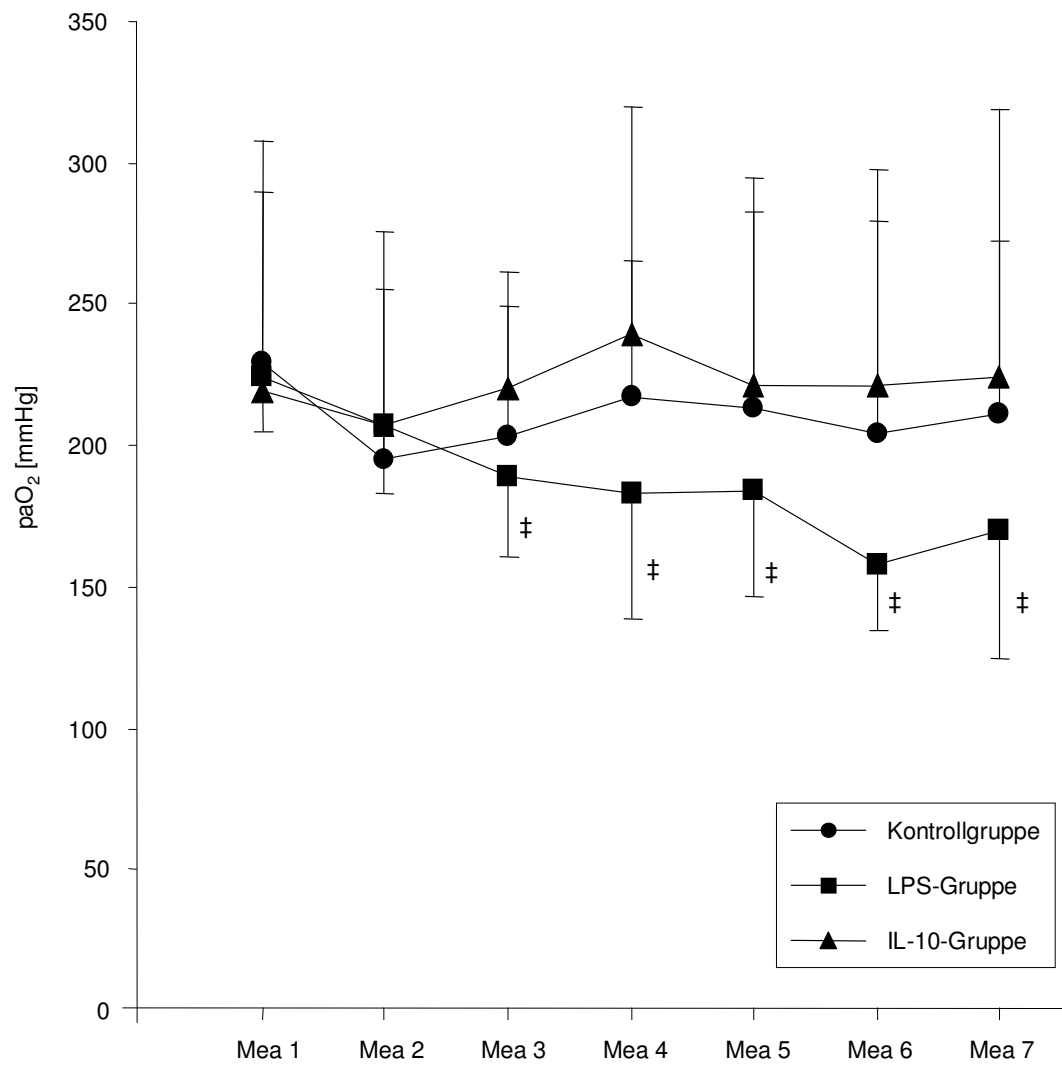
**Tabelle 3** Verlauf von Compliance (C) und Resistance (R) während des Versuchszeitraumes. (Median (IQR)); Mea 1: Ausgangswert, Mea 2 – 7: stündliche Messzeitpunkte nach LPS- / NaCl-Injektion.

| Versuchsgruppe      | Mea 1          | Mea 2          | Mea 3          | Mea 4          | Mea 5          | Mea 6          | Mea 7          |
|---------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| <b>C [ml/mbar]</b>  |                |                |                |                |                |                |                |
| <b>Kontrolle</b>    | 0.60<br>(0.13) | 0.60<br>(0.15) | 0.50<br>(0.13) | 0.50<br>(0.10) | 0.55<br>(0.13) | 0.50<br>(0.13) | 0.50<br>(0.10) |
| <b>LPS</b>          | 0.65<br>(0.23) | 0.65<br>(0.13) | 0.60<br>(0.13) | 0.70<br>(0.13) | 0.65<br>(0.13) | 0.65<br>(0.23) | 0.60<br>(0.23) |
| <b>IL-10</b>        | 0.65<br>(0.13) | 0.60<br>(0.20) | 0.55<br>(0.15) | 0.60<br>(0.20) | 0.60<br>(0.20) | 0.65<br>(0.20) | 0.60<br>(0.13) |
| <b>R [mbar/l/s]</b> |                |                |                |                |                |                |                |
| <b>Kontrolle</b>    | 157<br>(27)    | 152<br>(28)    | 143<br>(37)    | 145<br>(29)    | 149<br>(27)    | 143<br>(23)    | 141<br>(28)    |
| <b>LPS</b>          | 152<br>(22)    | 159<br>(26)    | 159<br>(23)    | 156<br>(30)    | 155<br>(17)    | 156<br>(24)    | 151<br>(23)    |
| <b>IL-10</b>        | 160<br>(26)    | 152<br>(19)    | 159<br>(38)    | 153<br>(29)    | 146<br>(18)    | 145<br>(22)    | 146<br>(27)    |

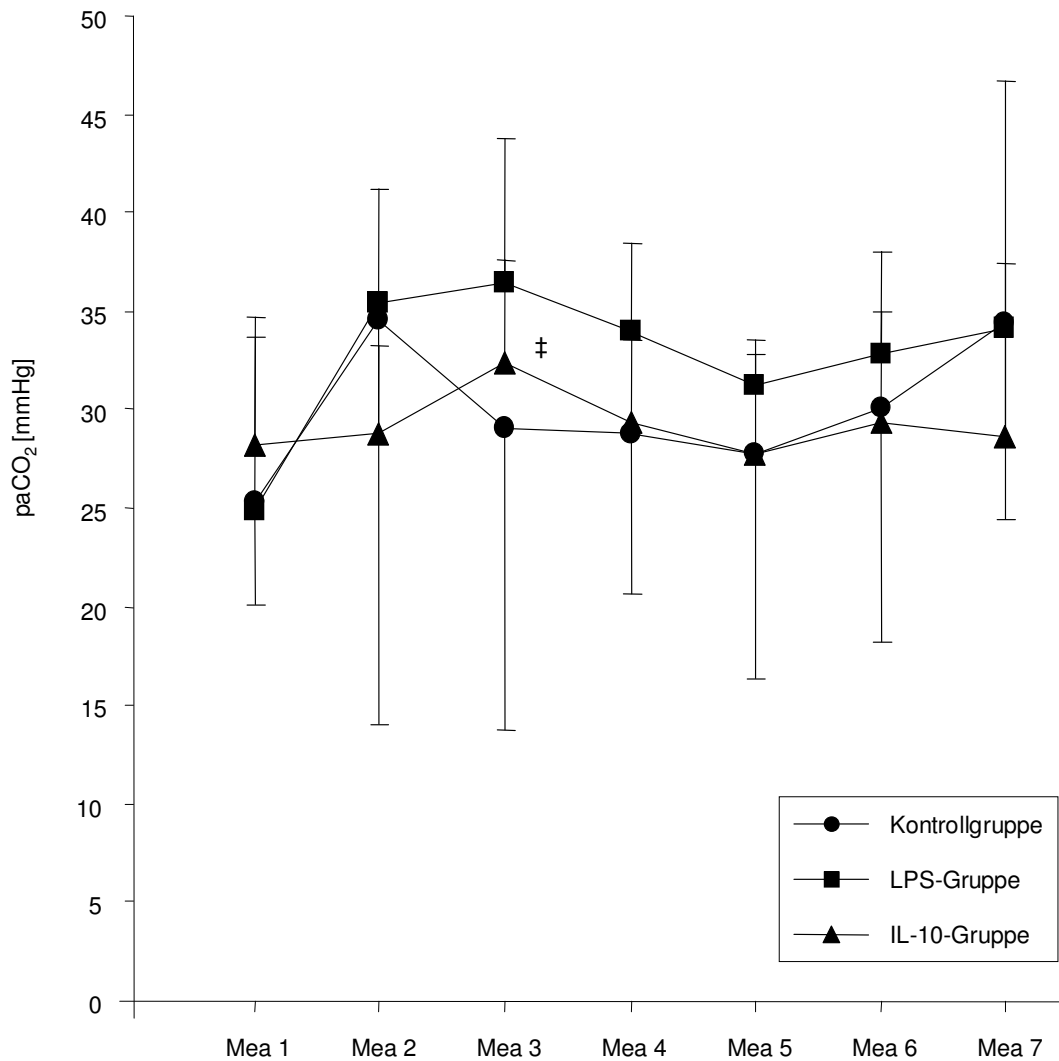
### 3.2.3 Arterielle Blutgasanalyse

Die Ergebnisse der arteriellen Blutgasanalyse sind als Liniendiagramme dargestellt (Abbildung 11 - 14). Der arterielle Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruck zeigten im Intragruppenvergleich zu allen Messzeitpunkten keine Unterschiede. Im zeitlichen Verlauf zeigte sich, dass der Sauerstoffpartialdruck in der LPS-Gruppe ab Mea 2 signifikant absank. Der Kohlendioxidpartialdruck veränderte sich in keiner Versuchsgruppe signifikant über die Zeit (Ausnahme: Mea 3 vs. Mea 1 bei IL-10-Gruppe: 32 (5) mmHg vs. 28 (7) mmHg).



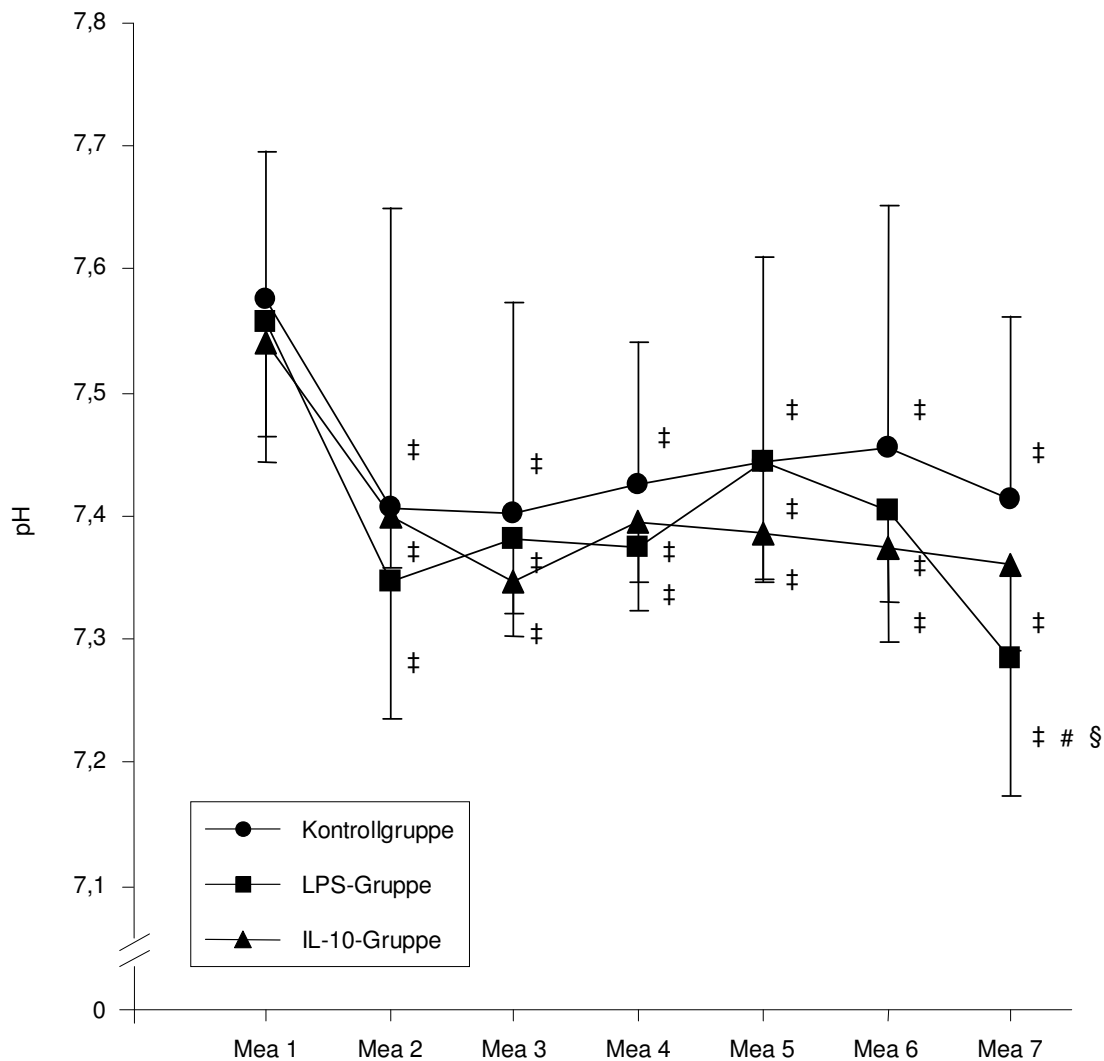


**Abb. 11** Verlauf des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks ( $paO_2$ ) während des Versuchszeitraumes. (Median (IQR)); Mea 1: Ausgangswert, Mea 2 – 7: stündliche Messzeitpunkte nach LPS- / NaCl-Injektion;  $p < 0.05$ , ‡ vs. Mea 1.



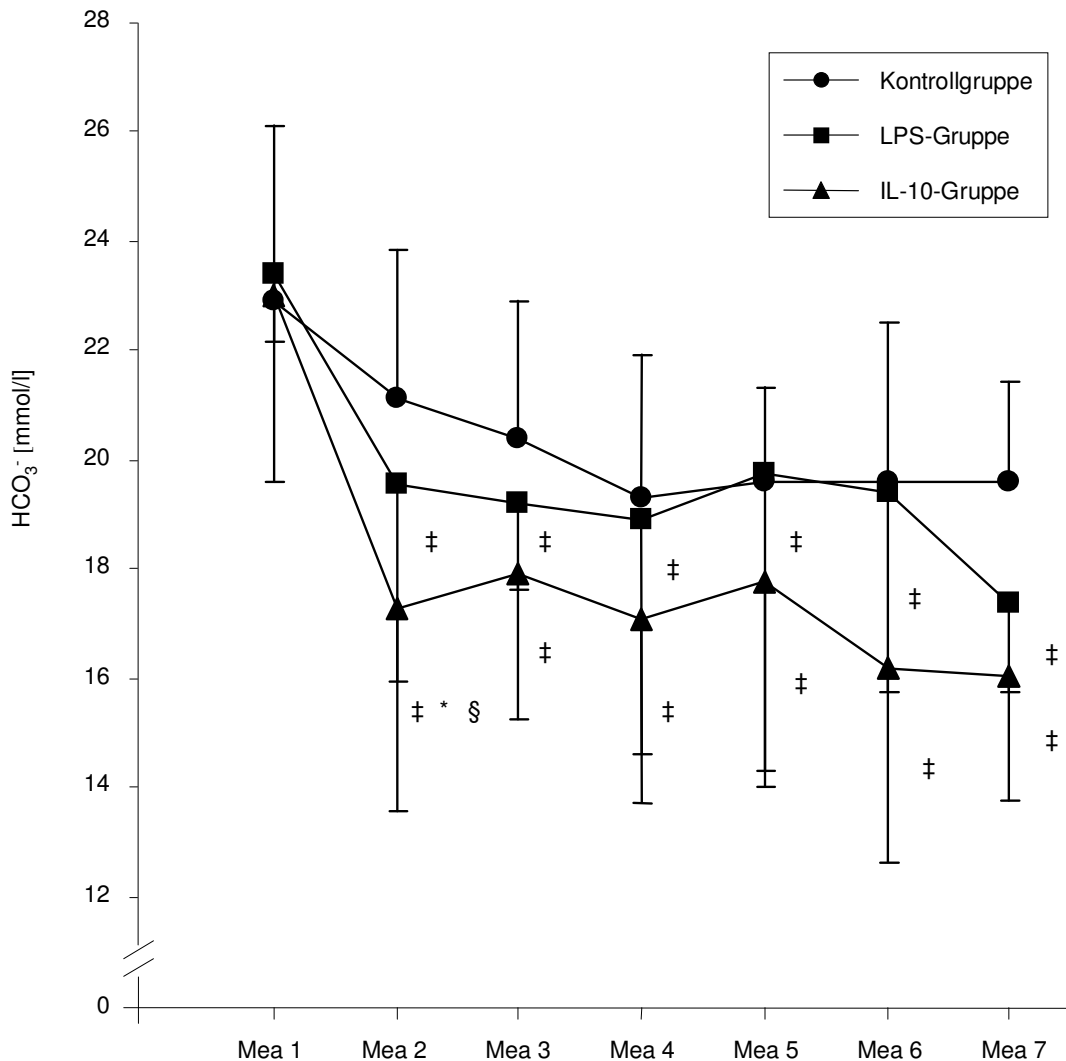
**Abb. 12** Verlauf des arteriellen Kohlendioxidpartialdrucks ( $\text{paCO}_2$ ) während des Versuchszeitraumes. (Median (IQR)); Mea 1: Ausgangswert, Mea 2 – 7: stündliche Messzeitpunkte nach LPS- / NaCl-Injektion;  $p < 0.05$ , ‡ vs. Mea 1.

Im Vergleich zu Baseline sank bereits ab Mea 2 in allen Versuchsgruppen der pH-Wert signifikant ab. Dabei ist zu beachten, dass dem Absinken unter physiologische Werte (7,35 – 7,45) mit der Gabe von Bicarbonatlösung begegnet wurde. Zwischen den Gruppen bestand nur bei Mea 7 ein Unterschied, der pH-Wert der LPS-Gruppe war signifikant niedriger als bei Kontroll- und IL-10-Gruppe (7.28 (0.11) vs. 7.41 (0.15), 7.28 (0.11) vs. 7.36 (0.07)).



**Abb. 13** Verlauf des pH-Wertes (pH) während des Versuchszeitraumes. (Median (IQR)); Mea 1: Ausgangswert, Mea 2–7: stündliche Messzeitpunkte nach LPS-/NaCl-Injektion;  $p < 0.05$ , ‡ vs. Mea 1, # LPS vs. Kontrolle, § IL-10 vs. LPS.

Die Plasmabicarbonatkonzentration ( $\text{HCO}_3^-$ ) sank in beiden endotoxämischen Gruppen (LPS- und IL-10-Gruppe) ab der ersten Stunde nach LPS-Injektion signifikant ab. Im Intergruppenvergleich war bei Mea 2 die  $\text{HCO}_3^-$  in der IL-10-Gruppe im Vergleich zu Kontroll- und LPS-Gruppe erniedrigt (17.3 (3.7) mmol/l vs. 21.2 (2.7) mmol/l, 17.3 (3.7) mmol/l vs. 19.6 (3.6) mmol/l).



**Abb. 14** Verlauf der Bicarbonatkonzentration ( $\text{HCO}_3^-$ ) während des Versuchszeitraumes. (Median (IQR)); Mea 1: Ausgangswert, Mea 2 – 7: stündliche Messzeitpunkte nach LPS- / NaCl-Injektion;  $p < 0.05$ , ‡ vs. Mea 1, \* IL-10 vs. Kontrolle, § IL-10 vs. LPS.

### 3.2.4 Blutbild

Die Veränderungen des peripheren Blutbildes während der Versuche sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Zwischen den Gruppen zeigte sich bei der Hämoglobinkonzentration (Hb), dem Hämatokrit (Hkt) und der Anzahl der Thrombozyten (PLT) kein signifikanter Unterschied. Im zeitlichen Verlauf sanken

der Hb und Hkt in allen Gruppen ab. Auch bei der Anzahl der Thrombozyten war ein tendenzieller Abfall zu beobachten. Dieses Phänomen war bei der LPS- und IL-10-Gruppe etwas ausgeprägter als bei der Kontrollgruppe. Die Zahl der zirkulierenden Leukozyten (WBC) war in beiden endotoxämischen Gruppen zwischen Mea 2 und Mea 5 signifikant geringer als bei der Kontrollgruppe. Über die Zeit betrachtet, zeigte sich zudem in diesen beiden Gruppen ein signifikanter WBC-Abfall.

**Tabelle 4** Verlauf der hämatologischen Parameter. Hämoglobinkonzentration (Hb), Hämatokrit (Hkt), Thrombozytenkonzentration (PLT), Leukozytenkonzentration (WBC). (Median (IQR)); Mea 1: Ausgangswert, Mea 2 – 7: stündliche Messzeitpunkte nach LPS- / NaCl-Injektion.

| Versuchsgruppe                    | Mea 1         | Mea 2           | Mea 3           | Mea             | Mea 5           | Mea 6           | Mea 7           |
|-----------------------------------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <b>Hb [g/dl]</b>                  |               |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
| Kontrolle                         | 14.8<br>(1.9) | 13.3<br>(1.5) † | 13.2<br>(1.3) † | 12.8<br>(1.3) † | 11.9<br>(2.1) † | 12.2<br>(2.0) † | 12.2<br>(1.1) † |
| LPS                               | 15.3<br>(1.1) | 14.5<br>(2.0)   | 13.6<br>(2.3) † | 12.6<br>(1.3) † | 11.5<br>(1.2) † | 11.8<br>(0.8) † | 11.7<br>(0.2) † |
| IL-10                             | 15.2<br>(1.2) | 14.8<br>(1.7) † | 12.9<br>(1.4) † | 11.7<br>(1.1) † | 11.7<br>(1.5) † | 11.6<br>(1.5) † | 11.6<br>(1.6) † |
| <b>Hkt [%]</b>                    |               |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
| Kontrolle                         | 42.1<br>(3.2) | 38.7<br>(5.3) † | 37.1<br>(5.0) † | 33.5<br>(7.2) † | 32.3<br>(7.0) † | 33.3<br>(7.2) † | 33.1<br>(6.5) † |
| LPS                               | 41.7<br>(4.1) | 39.3<br>(4.1) † | 34.7<br>(5.9) † | 33.2<br>(5.8) † | 32.8<br>(5.5) † | 34.1<br>(3.3) † | 33.3<br>(2.9) † |
| IL-10                             | 43.0<br>(2.6) | 42.7<br>(4.7)   | 36.5<br>(4.4) † | 32.1<br>(2.7) † | 32.5<br>(4.1) † | 32.4<br>(3.6) † | 32.7<br>(3.8) † |
| <b>PLT [<math>10^6</math>/ml]</b> |               |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
| Kontrolle                         | 639<br>(273)  | 661<br>(222)    | 564<br>(355)    | 643<br>(213)    | 532<br>(177)    | 553<br>(80)     | 453<br>(241)    |
| LPS                               | 605<br>(241)  | 664<br>(176)    | 522<br>(294)    | 564<br>(254)    | 491<br>(149)    | 415<br>(98)     | 350<br>(233)    |
| IL-10                             | 652<br>(185)  | 744<br>(58)     | 606<br>(131)    | 510<br>(172)    | 475<br>(121)    | 434<br>(140)    | 371<br>(174)    |
| <b>WBC [<math>10^6</math>/ml]</b> |               |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
| Kontrolle                         | 8.8<br>(2.6)  | 8.3<br>(2.8)    | 11.3<br>(3.4)   | 8.4<br>(2.3)    | 6.8<br>(2.2)    | 7.6<br>(1.9)    | 7.5<br>(2.1)    |
| LPS                               | 7.0<br>(2.5)  | 4.2<br>(1.3) †# | 3.7<br>(3.3) †# | 3.3<br>(1.8) †# | 2.9<br>(1.4) †# | 4.9<br>(2.4) †  | 5.7<br>(3.0)    |
| IL-10                             | 8.4<br>(3.6)  | 4.2<br>(2.4) †* | 3.6<br>(1.8) †* | 2.8<br>(3.2) †* | 3.9<br>(4.3) †* | 4.2<br>(5.3) †  | 5.1<br>(5.2) †  |

$p < 0.05$ , † vs. Mea 1, # LPS vs. Kontrolle, \* IL-10 vs. Kontrolle.

In Tabelle 5 ist das Differentialblutbild des am Ende des Versuchs entnommenen Blutes abgebildet. Bis auf eine signifikante Erhöhung des Monozytenanteils an der Gesamtzahl der Leukozyten in den endotoxämischen Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe zeigten sich sowohl bei der absoluten Zellzahl als auch bei der relativen Zellverteilung keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

**Tabelle 5** Peripheres Differentialblutbild am Versuchsende. (Median (IQR)).

|  |   | <b>Kontrolle</b> | <b>LPS</b>              | <b>IL-10</b>           |
|--|---|------------------|-------------------------|------------------------|
| Leukozytenzahl, gesamt [ $\times 10^6/\text{ml}$ ]   |   | 6.3 (2.0)        | 4.4 (2.5)               | 4.9 (6.1)              |
| Neutrophile Granulozyten [ $\times 10^6/\text{ml}$ ] | n | 4.9 (1.9)        | 3.1 (2.5)               | 3.4 (5.4)              |
|  | % | 75.0 (11.8)      | 66.5 (16.5)             | 73.5 (7.0)             |
| Lymphozyten [ $\times 10^6/\text{ml}$ ]              | n | 1.2 (0.4)        | 0.6 (0.4)               | 0.8 (0.7)              |
|  | % | 20.5 (11.0)      | 18.5 (12.0)             | 18.0 (10.8)            |
| Monozyten [ $\times 10^6/\text{ml}$ ]                | n | 0.3 (0.1)        | 0.4 (0.2)               | 0.5 (0.5)              |
|  | % | 5.0 (1.8)        | 13.5 (6.3) <sup>#</sup> | 8.5 (2.3) <sup>*</sup> |

$p < 0.05$ , <sup>#</sup> LPS vs. Kontrolle, <sup>\*</sup> IL-10 vs. Kontrolle.

### 3.2.5 Charakteristik der BAL

Die Recovery, d.h. die Menge der bei der bronchoalveolären Lavage aus der Lunge zurückgewonnenen Flüssigkeit (BAL), war im Vergleich zur Kontrollgruppe (95 (2) ml) bei der LPS- (89 (7) ml) und IL-10-Gruppe (92 (3) ml) signifikant geringer. Tabelle 6 zeigt eine Übersicht über die Zellbefunde in der BAL. Die Gesamtzellzahl war bei der LPS-Gruppe signifikant geringer im Vergleich zur Kontrollgruppe und IL-10-Gruppe. Auch die Viability der Zellen schien bei der LPS-Gruppe geringer zu sein, es wurde aber kein Signifikanzniveau erreicht. Vergleicht man im Differentialzellbild jedoch die absoluten Zellzahlen, zeigte sich in der LPS-Gruppe eine signifikant geringere Zahl an Alveolarmakrophagen. Zudem war die Granulozytenzahl leicht erhöht, ein signifikanter Unterschied zu den anderen Gruppen zeigte sich jedoch nicht. Der Anteil der Alveolarmakrophagen an der Gesamtzellzahl lag bei allen Gruppen um 90 %. Die zweitgrößte Zellpopulation stellten die Neutrophilen Granulozyten. Andere Zelltypen, wie Eosinophile Granulozyten und Lymphozyten, machten nur einen äußerst geringen Anteil an den Zellen in der BAL aus.

**Tabelle 6** Übersicht über die Zellbefunde in der BAL. (Median (IQR)).

|                          |                          | Kontrolle   | LPS                    | IL-10                  |
|--------------------------|--------------------------|-------------|------------------------|------------------------|
| Zellzahl, gesamt         | [x10 <sup>6</sup> /ml]   | 9.2 (3.2)   | 4.4 (0.8) <sup>#</sup> | 5.2 (1.7) <sup>§</sup> |
| Viability                | [%]                      | 79.0 (14.5) | 57.0 (30.3)            | 81.5 (23.3)            |
| Alveolarmakrophagen      | n [x10 <sup>6</sup> /ml] | 8.1 (4.0)   | 3.8 (0.6) <sup>#</sup> | 4.9 (1.4) <sup>§</sup> |
|                          | %                        | 91.5 (8.3)  | 88.0 (6.8)             | 92.5 (5.8)             |
| Neutrophile Granulozyten | n [x10 <sup>6</sup> /ml] | 0.5 (0.7)   | 0.5 (0.3)              | 0.4 (0.2)              |
|                          | %                        | 4.5 (7.5)   | 11.0 (5.8)             | 6.0 (5.8)              |
| Andere                   | n [x10 <sup>6</sup> /ml] | 0.14 (0.03) | 0.05 (0.08)            | 0.02 (0.06)            |
|                          | %                        | 1.5 (1.0)   | 1.0 (2.3)              | 0.5 (1.3)              |

p < 0.05, <sup>#</sup> LPS vs. Kontrolle, <sup>§</sup> IL-10 vs. LPS.

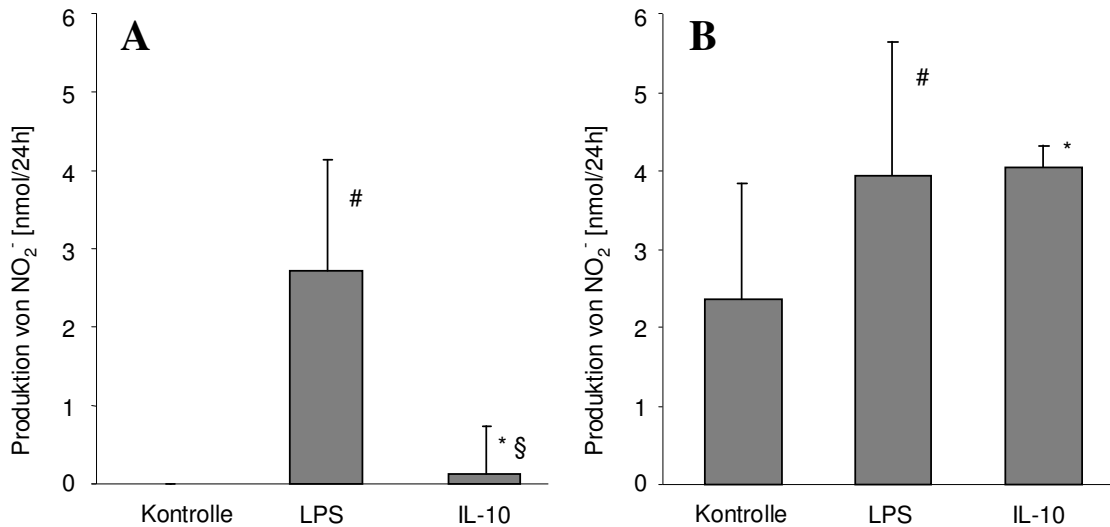
Die Bestimmung der Proteinkonzentration in der BALF zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Tendenziell enthielt die BALF der Kontrollgruppe aber etwas weniger Protein (Kontrollgruppe: 146.1 (52.0) µg/ml, LPS-Gruppe: 209.0 (69.8) µg/ml, IL-10-Gruppe: 201.2 (48.0) µg/ml).

### 3.2.6 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-Freisetzung aus Alveolarmakrophagen

Die spontane Freisetzung von Nitrit aus kultivierten Alveolarmakrophagen innerhalb von 24 h ist in Abbildung 15 A dargestellt. Die Makrophagen aus den Kontrolltieren setzten kein Nitrit frei. Die Makrophagen aus der LPS-Gruppe setzten vermehrt NO<sub>2</sub><sup>-</sup> frei, in der Therapiegruppe sank diese NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-Freisetzung signifikant (2.71 (2.42) nmol/24h vs. 0.11 (0.62) nmol/24h).

Abbildung 15 B zeigt die Akkumulation von Nitrit im Überstand von Makrophagen, die zusätzlich in vitro mit LPS (1 µg/ml) stimuliert wurden. Nach Stimulation setzten auch die Makrophagen der Kontrollgruppe Nitrit frei (2.35 (1.47) nmol/24h). Die Nitritkonzentration im Überstand stimulierter Makrophagen aus endotoxämischen Ratten wird durch die Verabreichung von IL-10 nicht signifikant gesenkt (LPS-Gruppe: 3.94 (1.71) nmol/24h, IL-10-Gruppe: 4.04 (0.27) nmol/24h).





**Abb. 15** Nitritfreisetzung aus Alveolarmakrophagen. Die Makrophagen wurden für 24 h kultiviert, entweder ohne Zugabe eines Stimulus (**A**) oder nach Zugabe von LPS (1 µg/ml) (**B**). (Median (IQR));  $p < 0.05$ , # LPS vs. Kontrolle, \* IL-10 vs. Kontrolle, § IL-10 vs. LPS.

### 3.2.7 O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Freisetzung aus Alveolarmakrophagen

In Tabelle 7 ist die Freisetzung von Superoxidanionen aus Alveolarmakrophagen nach ein und zwei Stunden Inkubation dargestellt. Es zeigte sich weder zwischen den unstimulierten noch zwischen den PMA-stimulierten Makrophagen aller drei Versuchsgruppen ein signifikanter Unterschied. Es fällt auf, dass nach PMA-Stimulation die Kontrollgruppe die höchste O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Freisetzung zeigte. Diese lag höher als im unstimulierten Zustand. Bei der IL-10-Gruppe wurde nach Stimulation eher etwas weniger O<sub>2</sub><sup>-</sup> als spontan freigesetzt. In der LPS-Gruppe war dieser Effekt noch ausgeprägter festzustellen.

**Tabelle 7** Superoxidanionenfreisetzung aus Alveolarmakrophagen. Die Makrophagen wurden für 24 h inkubiert, entweder ohne Zugabe eines Stimulus oder nach Zugabe von PMA (1 µg/ml); Median (IQR).

| Versuchsgruppe   | Stimulation; Länge der Inkubation; nmol O <sub>2</sub> <sup>-</sup> / 0.2 x 10 <sup>6</sup> Makrophagen |             |                |             |
|------------------|---|-------------|----------------|-------------|
|                  | unstimuliert  |             | PMA-stimuliert |             |
|                  | 1 h   | 2 h         | 1 h            | 2 h         |
| <b>Kontrolle</b> | 0.51 (0.53)   | 0.55 (0.61) | 0.87 (0.70)    | 1.06 (0.76) |
| <b>LPS</b>       | 0.51 (0.62)   | 0.64 (0.58) | 0.03 (0.87)    | 0.07 (1.10) |
| <b>IL-10</b>     | 0.47 (0.81)   | 0.54 (0.88) | 0.31 (0.63)    | 0.43 (0.70) |

### 3.2.8 Zytokinbestimmungen in der BAL

Die Auswirkung der LPS-Injektion und der therapeutischen IL-10-Inhalation auf die Konzentrationen pro- und antiinflammatorischer Zytokine in der Lunge war eine der Hauptzielgrößen der vorliegenden Studie. Die nachfolgenden Abbildungen (Abbildung 16 A - E) zeigen eine Zusammenschau der dazu in der BALF durchgeführten ELISA-Bestimmungen. Die Induktion einer Endotoxämie durch LPS bewirkte ein signifikantes Ansteigen der Konzentrationen aller bestimmten proinflammatorischen Zytokine (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , RANTES, IL-1, IL-6) in der BALF. Die vorherige Vernebelung von IL-10 vor LPS-Gabe verringerte die Freisetzung dieser Mediatoren signifikant. Die Bestimmung der IL-10-Konzentration ist nicht abgebildet, da nur in Proben von jeweils einem Tier der LPS- und IL-10-Gruppe IL-10 überhaupt nachgewiesen werden konnte (IL-10-Konzentration: 4.28 bzw. 3.68 pg/ml). In allen anderen Proben lagen die IL-10-Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten ELISAs.

Bei genauerer Betrachtung der einzelnen Zytokinkonzentrationen zeigte sich, dass bei der Kontrollgruppe nur bei zwei Tieren geringe Mengen TNF- $\alpha$  in der BALF nachgewiesen werden konnten. Die LPS-Injektion führte zu einem signifikanten

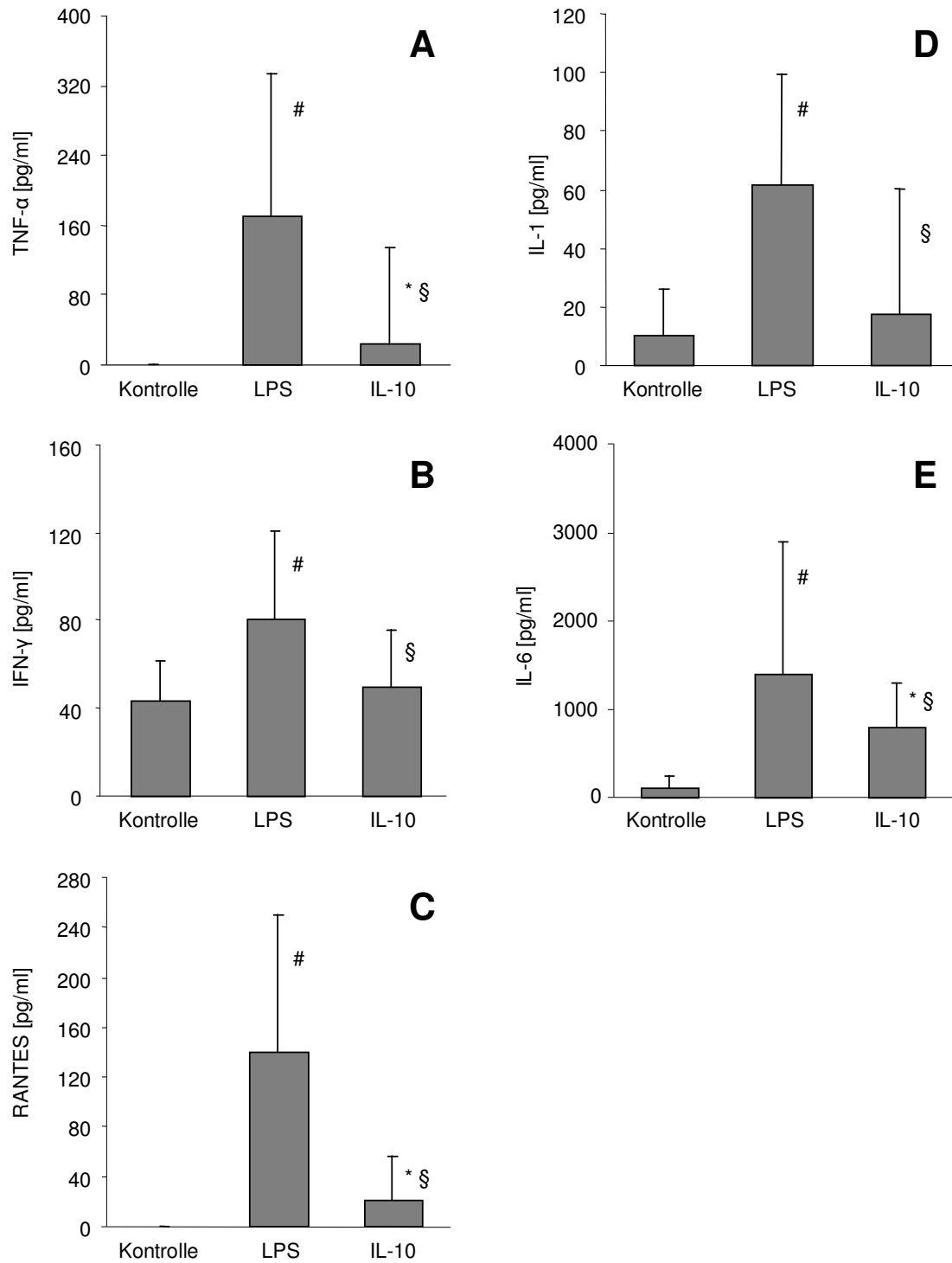
Anstieg der TNF- $\alpha$ -Konzentration, die Gabe von IL-10-Aerosols senkte diesen Anstieg um 86 % (169.6 (165.2) pg/ml vs. 22.9 (111.3) pg/ml).

IFN- $\gamma$  ließ sich bei den Kontrolltieren in einer Konzentration von 43.9 (17.5) pg/ml in der BALF nachweisen. Bei den LPS-Tieren lag die Konzentration signifikant höher (80.7 (40.7) pg/ml). Die Therapie mit IL-10 senkte die IFN- $\gamma$ -Konzentration soweit, dass kein signifikanter Unterschied mehr zu den Kontrolltieren bestand (50.1 (25.9) pg/ml).

RANTES ließ sich mittels des verwendeten ELISA-Kits in keinem der Tiere der Kontrollgruppe nachweisen. Die LPS-Injektion führte zu einer signifikanten Erhöhung der RANTES-Konzentration. Vernebeltes IL-10 senkte diesen Anstieg um 85 % (140.5 (109.6) pg/ml vs. 21.7 (35.3) pg/ml).

Die BALF-Konzentration von IL-1 verhielt sich ähnlich wie die Konzentration von IFN- $\gamma$ . Durch die Therapie mit IL-10 konnte der signifikante Anstieg der IL-1-Konzentration in der LPS-Gruppe (61.6 (37.9) pg/ml) so weit gesenkt werden, dass kein signifikanter Unterschied mehr zur Kontrollgruppe bestand (IL-10-Gruppe: 17.2 (43.4) pg/ml; Kontrollgruppe: 10.1 (16.2) pg/ml).

Die Konzentration von IL-6 war in der LPS-Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe (1396 (1490) pg/ml vs. 96.8 (140.2) pg/ml). Die Inhalation von IL-10 bewirkte im Vergleich zur LPS-Gruppe eine Verminderung der IL-6-Konzentration um 43 % (1396 (1490) pg/ml vs. 789.3 (503.5) pg/ml).



**Abb. 16** Übersicht der Zytokinkonzentrationen in der BALF. **A:** Tumornekrosefaktor-α (TNF-α); **B:** Interferon-γ (IFN-γ); **C:** RANTES; **D:** Interleukin-1 (IL-1); **E:** Interleukin-6 (IL-6); Median (IQR);  $p < 0.05$ , # LPS vs. Kontrolle, \* IL-10 vs. Kontrolle, § IL-10 vs. LPS.

### 3.2.9 Zytokinbestimmungen im Plasma

Zur Abschätzung der Auswirkungen der LPS-Injektion und des IL-10-Aerosols auf die systemische Entzündungsreaktion erfolgte die Bestimmung der in der BAL untersuchten Zytokine ebenfalls im Plasma. Die Abbildungen 17 A - F zeigen die Ergebnisse dieser Analysen.

Die intravenöse Gabe von LPS führte zu einem signifikanten Anstieg aller bestimmten proinflammatorischen Zytokine (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , RANTES, IL-1, IL-6) im Plasma. Mit Ausnahme von TNF- $\alpha$  senkte die Inhalation von IL-10 alle Zytokinkonzentrationen signifikant. Die Konzentration von IL-10 stieg ebenfalls nach LPS-Applikation signifikant an. Die Inhalation von IL-10 führte zu keiner Veränderung des IL-10-Plasmaspiegels.

Geringe Mengen TNF- $\alpha$  waren auch bei den Kontrolltieren im Plasma detektierbar (52.9 (42.1) pg/ml). Die endotoxämischen Tiere wiesen im Vergleich dazu signifikant höhere Konzentrationen von TNF- $\alpha$  auf (LPS-Gruppe: 329.1 (99.5) pg/ml, IL-10-Gruppe: 389.7 (175.2) pg/ml).

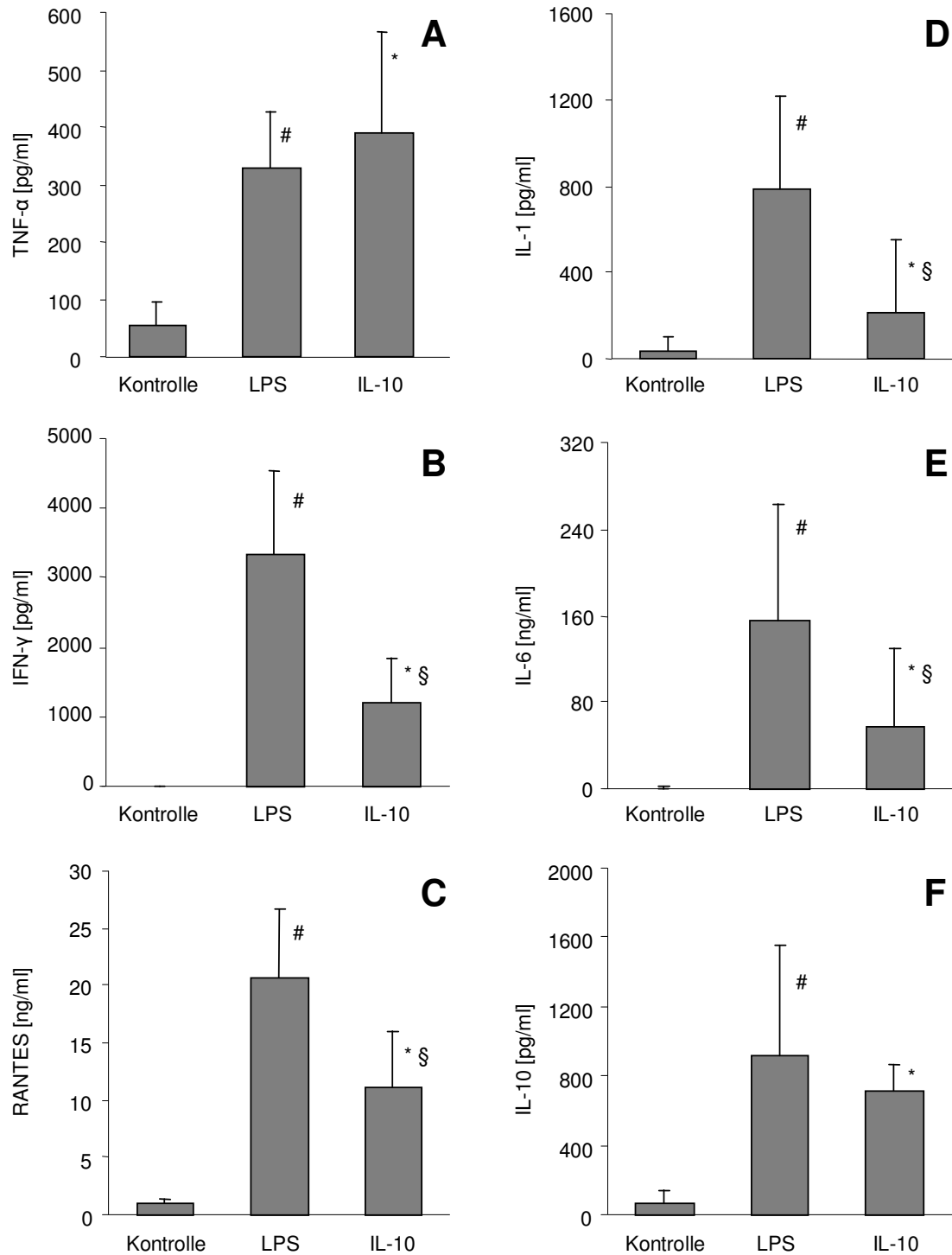
IFN- $\gamma$  war nur bei drei Kontrolltieren im Plasma überhaupt detektierbar. Bei LPS-Gabe stieg die Konzentration signifikant an, IL-10 hemmte diesen Anstieg um 64 % (3330 (1204) pg/ml vs. 1209 (642.5) pg/ml).

Die Plasmakonzentration von RANTES stieg nach Injektion von LPS im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant an (1.04 (0.37) ng/ml vs. 20.6 (6.02) ng/ml). IL-10-Aerosol senkte diesen Anstieg um 45 % (20.6 (6.02) ng/ml vs. 11.2 (4.72) ng/ml).

Im Plasma aller Kontrolltiere war IL-1 $\beta$  in einer Konzentration von 35.6 (70.3) pg/ml nachweisbar, bei den LPS-Tieren war die Konzentration signifikant erhöht (782.5 (437.5) pg/ml). Im Vergleich zu unbehandelten, endotoxämischen Tieren senkte die IL-10-Inhalation die IL-1 $\beta$ -Konzentration um 73 % (782.5 (437.5) vs. 214.8 (333.7) pg/ml).

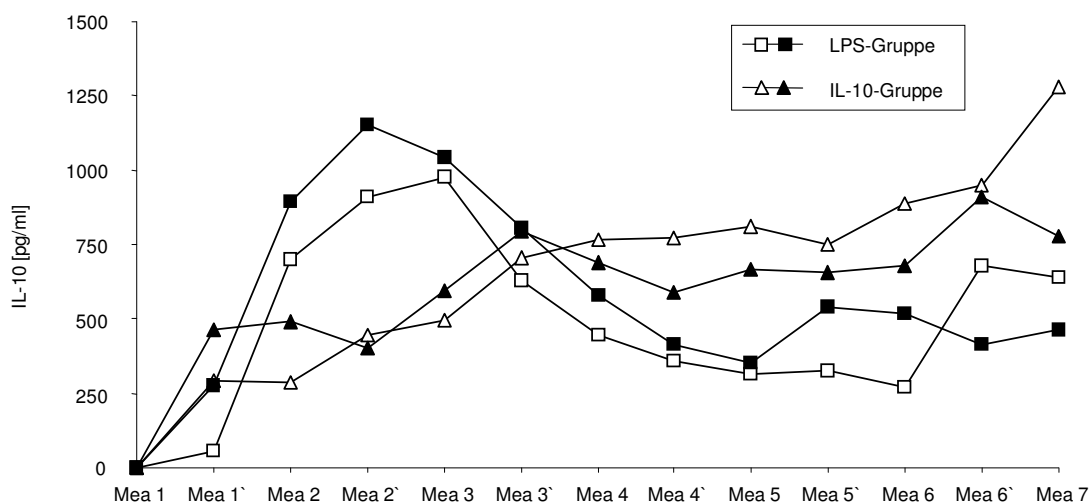
Die experimentelle Endotoxinämie bewirkte ein verhältnismäßig hohes Ansteigen der IL-6-Konzentration im Plasma (0.55 (0.84) ng/ml vs. 156.0 (107.9) ng/ml). IL-10-Aerosol senkte diesen Anstieg um 63 % (156.0 (107.9) ng/ml vs. 57.1 (73.3) ng/ml).

Verglichen mit der Kontrollgruppe stiegen die IL-10-Konzentrationen sowohl in der LPS-Gruppe (67.4 (68.2) pg/ml vs. 917.8 (634.2) pg/ml) als auch in der IL-10-Gruppe (67.4 (68.2) pg/ml vs. 707.9 (156.2) pg/ml) signifikant an.



**Abb. 17** Übersicht der Zytokinkonzentrationen im Plasma. **A:** Tumornekrosefaktor-α (TNF-α); **B:** Interferon-γ (IFN-γ); **C:** RANTES; **D:** Interleukin-1 (IL-1); **E:** Interleukin-6 (IL-6); **F:** Interleukin-10 (IL-10); Median (IQR);  $p < 0.05$ , # LPS vs. Kontrolle, \* IL-10 vs. Kontrolle, § IL-10 vs. LPS.

Abbildung 18 zeigt die IL-10-Plasmakonzentrationen bei 4 Versuchstieren im zeitlichen Verlauf (Mea 1, Mea 1` 30 Minuten nach LPS-Gabe, etc. bis Mea 7). Aufgrund der geringen Fallzahl (je n = 2) wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet. Bei Versuchsbeginn war in allen 4 Tieren kein IL-10 im Plasma nachweisbar. Eine Stunde nach LPS-Injektion kam es in der unbehandelten LPS-Gruppe zu einem deutlichen Anstieg der IL-10-Konzentration, dieser IL-10-Peak (maximaler Wert: 974.5 pg/ml bzw. 1152.1 pg/ml) bestand etwa eine Stunde. Im weiteren Verlauf sank die IL-10-Konzentration wieder etwas ab (Mea 7: 639.9 bzw. 463.0 pg/ml). Im Gegensatz dazu stieg die IL-10-Konzentration bei den IL-10-behandelten Tieren im Verlauf kontinuierlich an (Mea 7: 778.7 bzw. 1281,2 pg/ml).



**Abb. 18** IL-10-Plasmakonzentration im zeitlichen Verlauf.

Dargestellt sind je 2 Tiere der LPS- und IL-10-Gruppe. Unmittelbar nach Induktion der Endotoxinämie wurden über einen Untersuchungszeitraum von 6 h halbstündlich Plasmaproben entnommen (Mea 1 Baseline, Mea 1` 30 Minuten nach LPS-Gabe, etc. bis Mea 7).



## **4 DISKUSSION**

### **4.1 Diskussion der Methodik**

#### **4.1.1 Tiermodell**

Untersuchungen zur Inhalation bei Kleintieren werden häufig an wachen [21;150] oder sedierten [152] Tieren unter Spontanatmung durchgeführt. Während Spontanatmung ist das Atemmuster jedoch unregelmäßig. Dies wirkt sich als unkontrollierbarer Faktor auf das Depositionsmuster des Aerosols aus. Außerdem bewirkt die Gabe von Sedativa bzw. Anästhetika Veränderungen der Atemmechanik [33], was ebenfalls das Muster der Aerosolverteilung und -deposition beeinflusst [186].

Nur unter kontrollierter Beatmung ist das Beatmungsmuster bei jedem Tier vergleichbar. Die Aerosolapplikation an anästhesierten Ratten mittels Jetvernebler während kontrollierter Beatmung war bislang nur möglich, indem mehrere Tiere parallel an ein Beatmungsgerät mit Vernebler angeschlossen wurden [105]. Ein Jetverneblersystem, mit dem es möglich ist, ein Aerosol in der einzelnen, kontrolliert beatmeten Ratte zu applizieren, war bislang nicht verfügbar. Demnach musste zur Realisierung einer entsprechenden Untersuchung im Kleintier ein solches System zunächst konstruiert werden.

#### **4.1.2 Aerosolproduktion**

Zur Erzeugung und Applikation eines Aerosols während kontrollierter Beatmung existieren grundsätzlich zwei Methoden: Die Ultraschallvernebelung und die Jetvernebelung. Im Falle eines Ultraschallverneblers versetzt ein Piezokristall die Medikamentenlösung in Schwingung, und über das Zerreißen der Wassermoleküle an der Flüssigkeitsoberfläche bildet sich ein Aerosol. Das Anwendungsgebiet eines solchen Verneblers ist jedoch limitiert. Üblicherweise ist das Partikelspektrum eines von einem Ultraschallverneblers produzierten Aerosols größer als bei Verwendung eines Jetverneblers [154;191]. Je nach Größenverteilung reduziert dies die

Wahrscheinlichkeit einer alveolären Deposition des Aerosols. Außerdem wirkt bei der Ultraschallvernebelung eine beträchtliche Energie, u.a. in Form von Wärme, auf das Pharmakon in der Verneblerkammer ein. Es besteht somit die Gefahr, dass Proteine wie IL-10 durch diese Hitzeentwicklung verändert bzw. inaktiviert werden. Dies wurde bereits für Insulin [207], Interferon [89] und Surfactant [208] beschrieben.

Die Aerosolerzeugung mittels Druckluft (Jetvernebelung) ist eine etablierte und im klinischen Einsatz weit verbreitete Methode [124]. Jetvernebler können mit den meisten gängigen Beatmungsgeräten kombiniert werden und sie sind bei praktisch allen löslichen Substanzen einsetzbar [1]. Das genaue Partikelspektrum eines Jetverneblers ist dabei von vielen Faktoren abhängig. Dazu gehört der verwendete Verneblertyp [25;79], die Durchflussrate durch den Vernebler [25;79], die Temperatur des den Vernebler antreibenden Gases [142], das Füllvolumen der Verneblerkammer [79] sowie die physikochemischen Eigenschaften der vernebelten Substanz [111].

### **4.1.3 Experimentelle Endotoxinämie**

Die intravenöse Injektion von LPS ist ein geeignetes und weit verbreitetes Modell, um Symptome der klinischen Sepsis und ihre Komplikationen im Tierexperiment abzubilden [22;43;126;168]. Die Manifestation von Organkomplikationen, wie dem akuten Lungenversagen (ARDS), im Rahmen des Verlaufs septischer Krankheitsbilder erfolgt in der Regel sekundär. Dies bedeutet, dass mikrobielle Erreger, Endotoxine, aber auch Mediatoren der generalisierten Entzündungsreaktion auf dem Blutweg in die Lunge gelangen. Diesem pathophysiologischen Prinzip folgend, erscheint es daher sinnvoll, einen experimentellen Lungenschaden ebenfalls über die Systemzirkulation, also sekundär, zu induzieren. Demgegenüber stehen andere experimentelle Modelle, in denen eine pulmonale Entzündungsreaktion primär pulmonal induziert wird, beispielsweise durch intratracheale Instillation von LPS [211].

In der vorliegenden Untersuchung wurde zur Induktion des experimentellen Lungenschadens die intravenöse Applikation von LPS gewählt. Die einmalige Injektion von LPS (5 mg/kg KG, i.v.) entspricht dabei einer im Rattenmodell üblichen Dosierung [126].

#### **4.1.4 Interleukin-10**

Wie eingangs bereits erwähnt, weisen die Produktion bzw. Sekretion von proinflammatorischen Mediatoren einerseits und von IL-10 andererseits unterschiedliche Kinetiken auf. Während die Konzentrationen von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 bereits innerhalb der ersten 3-8 Stunden nach in vitro Stimulation humaner Monozyten signifikant ansteigen, finden sich erhöhte IL-10-Messwerte erst nach 7 Stunden [29]. Dabei ist die endogene IL-10-Synthese offenbar autoreguliert. Die exogene Applikation von rekombinantem IL-10 zu stimulierten Monozyten inhibiert deren Synthese von IL-10-messenger-RNA (mRNA) [29]. Daneben erfolgt die Hemmung der Zytokinsynthese über einen beschleunigten Abbau von Zytokin-mRNA [96].

Die physiologische bzw. pathogenetische Bedeutung der Zunahme der endogenen IL-10-Synthese bei Trauma, Sepsis und ARDS wird unterschiedlich interpretiert. So liegen Untersuchungen vor, bei denen eine erhöhte IL-10-Konzentration im Serum mit einer erhöhten Inzidenz von Komplikationen [103;114;167] bzw. dem Tod [130;139] betroffener Patienten korreliert war. Andererseits waren bei Patienten mit ARDS niedrige IL-10- bzw. IL-1Ra-Konzentrationen in der BAL signifikant mit erhöhter Mortalität korreliert [37]. Bei akutem Lungenversagen ist das intrapulmonale Verhältnis von TNF- $\alpha$  zu IL-10 deutlich zugunsten des TNF- $\alpha$  verschoben [7]. Es wird daher vermutet, dass dies durch eine verminderte pulmonale Syntheseleistung für IL-10 bei ARDS bedingt ist (vgl. [15]). In der angeführten Untersuchung von Donnelly et al. [37] erfolgte die Gewinnung der BAL-Proben jeweils unmittelbar nach Stellung der Diagnose ARDS. Zwischen diesem Zeitpunkt und dem Tode der Patienten lagen im Mittel 12 Tage. Eine frühe IL-10-Applikation

könnte dieses IL-10-Defizit zu Beginn der ARDS-Reaktion unter Umständen beheben und somit einen Therapieerfolg erbringen.

## **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **4.2.1 Entwicklung des Jetverneblersystems**

#### **4.2.1.1 Charakterisierung des Aerosols**

Aerosole sind feste oder flüssige, schwebende Partikel in Gasen mit einem Durchmesser von 0.01 bis 100  $\mu\text{m}$  [122]. Die Zusammensetzung und Form eines Aerosols ist außerordentlich variabel. Für praktische Zwecke ist es sinnvoll, oberhalb von Durchmessern von ca. 0.5  $\mu\text{m}$  die Beschreibung eines Partikels auf sein Depositionsverhalten zu standardisieren, da dann im Wesentlichen nur die gewichtsabhängige Sedimentation und Impaktion als Abscheidemechanismus in Betracht kommen. Dafür wird dem betreffenden Partikel eine gleich schnell sedimentierende Kugel mit der Dichte von Wasser ( $\rho_0 = 1\text{g/cm}^3$ ) zugeordnet und der Durchmesser dieser Kugel als aerodynamischer Durchmesser ( $d_{ae}$ ) bezeichnet. Partikel mit gleichem  $d_{ae}$  zeigen also gleiches dynamisches Verhalten.

Der aerodynamische Durchmesser von Aerosolpartikeln hängt von ihrer Größe, Dichte, Form und Orientierung ab. Die Nähe von Grenzflächen (z. B. Bronchialwand) kann sich auf die Orientierung auswirken. Für praktische Zwecke und insbesondere für den Größenbereich, der in der Inhalationstherapie relevant ist, sind die Unterschiede bezüglich Form und Grenzflächeneinfluss meist vernachlässigbar, so dass nur Dichte und Größe entscheidend sind [4;16;160]. Üblicherweise hat man es in der Praxis mit einer hetero- oder polydispersen Größenverteilung von Aerosolen zu tun [187]. Handelt es sich dabei um Aerosole gleicher Struktur (z. B. aus einem Vernebler), so kann der mediane aerodynamische Massendurchmesser des Spektrums mit einer Zahl, dem Mass Median Aerodynamic Diameter (MMAD), beschrieben werden. Dabei sind 50 % der Aerosolmasse größer und 50 % kleiner als der MMAD. Die Breite einer symmetrischen Verteilung kann, wenn annähernd

Normalverteilung besteht, gut durch die geometrische Standardabweichung (GSD = Geometric Standard Deviation) charakterisiert werden. In vielen Fällen, so auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit, werden symmetrische Verteilungen durch Logarithmieren des Partikeldurchmessers erreicht. Hier eignet sich die GSD ebenfalls zur Charakterisierung des Partikelspektrums. Die GSD ist dimensionslos und stets größer als 1. Liegt die GSD eines Aerosols – wie im vorliegenden Fall – über 1.22, so gilt es als heterodispers (Definition nach Fuchs und Sutugin [58]).

Ist der Durchmesser der Partikel eines Aerosols bekannt, lassen sich Aussagen über das Depositionsverhalten in den Atemwegen treffen. Im Allgemeinen geht man davon aus, dass Partikel mit einem Durchmesser kleiner als  $5\ \mu\text{m}$  in die Lunge gelangen. Werden die Partikeldurchmesser kleiner als  $1\ \mu\text{m}$ , deponieren immer weniger Partikel in den Atemwegen bzw. Alveolen und die Mehrzahl dieser Partikel wird wieder ausgeatmet. Bei Partikeln größer als  $8\ \mu\text{m}$  steigt der Anteil, der bereits im Oropharynx abgeschieden wird [16;108;173;182]. Basierend auf immer feineren methodischen Verfahren – von der radioaktiven Markierung [50;172;183] bis hin zu postmortalen, mikroanatomischen Untersuchungen [161;176;184;185] – ist heute recht genau bekannt, wo Partikel einer bestimmten Größe deponieren. Ergänzt werden diese Untersuchungen durch mathematische Berechnungsmodelle zur Lungendeposition [65;81;117;141;213]. Nach Heyder [80] erreichen Aerosole mit Partikeldurchmessern zwischen  $0.5$  und  $2.0\ \mu\text{m}$  den Alveolarraum und deponieren dort. Basierend auf diesen Überlegungen war davon auszugehen, dass das von uns entwickelte Verneblersystem ein Aerosol mit einem zur alveolären Deposition geeigneten Partikelspektrum produziert.

#### **4.2.1.2 Einfluss der Vernebelung auf das Versuchstier**

Für die erfolgreiche Entwicklung des Verneblersystems waren der Einbau des Druckminderers zur Senkung des Versorgungsdrucks für den Vernebler sowie der Einbau eines Ventils in das T-Stück von entscheidender Bedeutung. Eigene Voruntersuchungen hatten ergeben, dass von einem Versorgungsdruck über  $1.8\ \text{bar}$

unphysiologisch hohe Flussraten bzw. Drücke im System resultieren. Unter diesen Bedingungen vernebelte Ratten waren Atemwegsdrücken von bis zu 40 mbar ausgesetzt. Die Folgen waren ein ausgeprägtes intraalveoläres Lungenödem und histologische Zeichen eines schweren Volu- bzw. Barotraumas. Webb et al. [204] zeigten, dass Ratten, die für eine Stunde mit einem Druck von 30 cm H<sub>2</sub>O ( $\cong$  29.4 mbar) beatmet worden waren, ein interstitielles Lungenödem entwickelten. Nach nur 2-minütiger Beatmung mit 35 mmHg ( $\cong$  46.7 mbar) zeigte sich bereits eine mikrovaskuläre Permeabilitätssteigerung [39]. Die Begrenzung des Versorgungsdrucks auf 1.5 mbar und damit die Senkung des Spitzendrucks auf 15 mbar schützte die Tiere in der vorliegenden Untersuchung vor makroskopisch oder mikroskopisch erkennbaren Schäden der Lungengewebsstruktur. Diese Befunde decken sich mit Erkenntnissen von Lizio et al. [109] und Osier et al. [138]. Beide Autoren fanden, dass die Atemwegsdrücke der Ratte bei der Inhalation Spitzenwerte bis zu 15 cm H<sub>2</sub>O ( $\cong$  14.7 mbar) erreichen können, ohne die Gewebsstruktur der Lunge zu beeinflussen.

Auch die erhobenen Parameter des Gasaustausches, der Lungenmechanik und der Hämodynamik wurden durch die 40-minütige Vernebelung nicht alteriert.

#### **4.2.1.3 Intrapulmonale Deposition des Aerosols**

Vorhersagen über das Depositionsverhalten eines Aerosols allein basierend auf theoretischen Überlegungen und in vitro Untersuchungen zu treffen, ist schwierig. Zusätzliche Faktoren, wie die Atemwegsgeometrie [150], Feuchtigkeit [49] und Mucussekretion [9] in der Lunge sowie pathologische Veränderungen der Atemwege [68], wirken ebenfalls entscheidend auf die Deposition ein. Dies bewirkt nicht nur, dass die Menge der in der Lunge deponierenden Aerosolpartikel variiert, sondern auch, dass es zu einer unregelmäßigen Verteilung des Aerosols in der Lunge kommt. Daher war zum Nachweis einer reproduzierbaren und homogenen, alveolären Deposition des produzierten Aerosols eine in vivo Untersuchung notwendig. Hierzu bot sich die Verwendung fluoreszierender Mikrosphären (FM) an, da diese

unkompliziert zu vernebeln und leicht mikroskopisch nachzuweisen sind. Der Einsatz eines potentiell gefährlichen, radioaktiven Markers entfiel damit [183]. FM wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen erfolgreich zur Bestimmung der regionalen Partikeldeposition und -retention in der Lunge eingesetzt [101;146;156]. Für die Aussagekraft der Untersuchung war es wichtig, dass die Partikelgröße des Aerosols durch die FM nicht verändert wurde. Dazu musste gewährleistet sein, dass die FM möglichst einzeln suspendiert sind und nicht in großen Konglomeraten vorliegen. Daher wurden Carboxylat-beschichtete Mikrosphären verwendet, die sich aufgrund ihrer Ladung gegenseitig abstoßen. In Kombination mit dem konsequenten Einsatz von Vortex und Ultraschallbad vor Applikation der FM bewirkte dies, dass der Anteil an Einzelpartikeln bei über 90 % lag (fluoreszenzmikroskopische Analyse nach Ausstrich der Lösung auf Objektträger).

Für den qualitativen Nachweis der alveolären Deposition des Aerosols wurden ungefärbte Gefrierschnitte der Lunge angefertigt. Gegenüber formalinfixierten, gefärbten Präparaten hat dieses Verfahren den Vorteil, dass die Fluoreszenzintensität erhalten bleibt. Auch das Risiko des Auswaschens von FM aus der Lunge durch Fixation und Färbung entfällt. Pinkerton et al. [146] berichteten Mikrosphären-Verluste von über 34 % durch Herstellung formalinfixierter Lungenschnitte, 23 % gingen während Schneiden und Waschen des Gewebes, 11 % während der Ethanolfixation verloren.

Zur Quantifizierung der Aerosoldeposition wurde zuerst die vernebelte FM-Fraktion mittels der Gravimetrischen Methode bestimmt. Dazu wurde vor der Vernebelung die gefüllte Verneblerkammer gewogen und die Fluoreszenzintensität der zu vernebelnden Lösung bestimmt. Nach der Vernebelung wurde die Kammer noch einmal gewogen. Über die Massendifferenz konnte auf die vernebelte Fraktion geschlossen werden. Eine Einschränkung dieser Methode ist, dass die Verdunstung der Trägerflüssigkeit nicht berücksichtigt wird. Die Medikamentenlösung in der Verneblerkammer konzentriert über die Zeit, die tatsächlich vernebelte Dosis ist

somit etwas geringer als berechnet [132]. Schließt man von dieser falsch hohen vernebelten FM-Fraktion auf den Anteil an deponierten FM, so ergibt sich ein tendenziell zu niedriger Wert.

Zur Bestimmung der Deposition musste in diesem Zusammenhang zunächst die gesamte Fluoreszenzintensität aller intrapulmonal deponierten FM bestimmt werden. Bei der Lunge ist dies im Gegensatz zu anderen Organen verhältnismäßig einfach durchzuführen, da das Lösungsmittel die Lunge aufgrund ihrer porösen Struktur sehr gut durchdringen kann. Somit ist gewährleistet, dass der Fluoreszenzfarbstoff aus der gesamten Probe gelöst wird und sich gleichmäßig in der Cellosolve®-Lösung verteilt. Bei anderen, dichteren Organen, z. B. Herz oder Niere, muss das Gewebe erst lysiert werden, bevor im nächsten Schritt die FM gewonnen werden können; ein aufwändiger Prozess, bei dem die Gefahr besteht, FM einzubüßen [67].

Die Effektivität einer Aerosoltherapie hängt in hohem Maße von der Menge der intrapulmonalen Deposition ab. Selbst wenn die Partikelgröße für die alveoläre Deposition geeignet ist, deponiert dort nur ein geringer Prozentsatz der vernebelten Ausgangslösung. Studien bei spontanatmenden Probanden haben gezeigt, dass nur 2-10 % der ursprünglichen Verneblerlösung die Lunge erreichen [2;131]. Bei intubiert-beatmeten Patienten liegt der Prozentsatz der intrapulmonalen Deposition sogar bei weniger als 3 % [59;110;193]. Das Beatmungssystem, der Endotrachealtubus und das Beatmungsmuster beeinflussen die Eigenschaften des Aerosols und damit die Deposition [97;133]. MacIntyre et al. [110] bestimmten die Deposition von radioaktiv-markierter Pentacetat Säure. Im Vergleich zu Spontanatmung (11.9 (±2.2) %) deponierten unter maschineller Beatmung nur 2.9 (±0.7) % der vernebelten Lösung in der Lunge. Fuller et al. [59] untersuchten die Deposition von radioaktiv-markiertem Fenoterol an 21 beatmeten Patienten und fanden, dass lediglich 1.2 (±0.35) % der vernebelten Dosis die Lunge erreichten. Bei der Untersuchung von Thomas et al. [193] deponierten bei maschinell-beatmeten, primär



lungengesunden Patienten 2.2 ( $\pm 0.8$ ) % der vernebelten Aerosolpartikel intrapulmonal. Einige wenige Untersuchungen zur Aerosoldeposition bei maschineller Beatmung wurden auch an Kindern bzw. Säuglingen durchgeführt. Interessant ist dabei eine Jetvernebler-Studie, die an Frühgeborenen (Geburtsgewicht um 1093 g) mit bronchopulmonaler Dysplasie durchgeführt wurde [55]. Hier fand sich eine äußerst geringe Deposition von nur 0.22 ( $\pm 0.1$ ) %. Der geringe Durchmesser des Endotrachealtubus und des Beatmungsschlauches und das geringe Tidalvolumen sind die Hauptprobleme bei der technischen Durchführung einer Aerosoltherapie in beatmeten Säuglingen [6;19]. Im Kleintiermodell konnte ein Jetvernebler während kontrollierter Beatmung bislang nur in Hasen angewendet werden. Flavin et al. [54] zeigten hier je nach Verneblertyp eine intrapulmonale Deposition von 0.19 ( $\pm 0.10$ ) % bzw. 1.96 ( $\pm 1.19$ ). Verglichen mit diesen vorgestellten Ergebnissen produziert das in der hier vorliegenden Untersuchung evaluierte, neu entwickelte Jetverneblersystem ein Aerosol, das in höherem Umfang (3.8 (1.3) %) intrapulmonal deponiert.

## **4.2.2 Vernebelung von IL-10**

### **4.2.2.1 Lokale Wirkung auf die Lunge**

#### **4.2.2.1.1 Lungenmechanik und Gasaustausch**

In der Anfangsphase des ARDS bewirkt die Akkumulation von interstitiellem und sekundär intraalveolärem Ödem eine Abnahme der Lungenvolumina, eine verminderte Compliance [118] und eine Zunahme der Resistance. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden weder zwischen den Gruppen noch im zeitlichen Verlauf Änderungen der Lungenmechanik beobachtet. Möglicherweise waren die pathologischen Veränderungen der Lunge nicht ausgeprägt genug, um die Lungencompliance und/oder -resistance zu beeinflussen. Andererseits wurden die Tiere invasiv beatmet, so dass diskrete Veränderungen der Lungenmechanik der Analyse unter Umständen entgingen.

Auch die Ergebnisse der arteriellen Blutgasanalyse wurden von dem verwendeten Beatmungsregime wesentlich beeinflusst. Die Beatmung mit einem  $\text{FiO}_2$  von 0.5 lag über dem  $\text{FiO}_2$  der Umgebungsluft ( $\text{FiO}_2 = 0.21$ ). Der verwendete PEEP von 4 mbar sollte sicherstellen, dass sich die Gasaustauschfläche vergrößert, sich atelektatische Lungenbezirke wieder öffnen, der intrapulmonale Rechts-Links-Shunt vermindert und der endexpiratorische Alveolarkollaps vermieden wird und schließlich das Ventilations-Perfusionsverhältnis verbessert wird. Insgesamt wurden die Tiere eher hyperventiliert, eine Verschlechterung des Gasaustausches im Sinne einer Hypoxie konnte in keiner der Gruppen beobachtet werden, auch wenn der  $\text{paO}_2$  in der LPS-Gruppe ab Mea 1 signifikant absank.

#### **4.2.2.1.2 Charakteristik der BAL**

Die akute Phase des ARDS ist charakterisiert durch den Einstrom proteinreicher Ödemflüssigkeit in den Alveolarraum, bedingt durch die erhöhte Durchlässigkeit der kapillar-endothelialen und alveolo-epithelialen Schranke [149]. Grundsätzlich ist dabei auch der umgekehrte Weg möglich, d.h. Flüssigkeit kann aus den

Lungenalveolen in die -kapillaren abgepresst werden. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die geringere Recovery von Lavageflüssigkeit bei den endotoxämischen Tieren. Gegen eine ausgeprägte Permeabilitätserhöhung spricht allerdings, dass der Proteingehalt in der BALF bei den endotoxämischen Tieren nur geringfügig höher als bei den Kontrolltieren war. Bei Simons et al. [170] dauerte es bei einem ARDS-Modell unter kontinuierlicher Infusion von LPS über 24 h bis zu einem signifikanten Anstieg des Proteingehaltes in der BALF der Ratten. Beim Menschen können schon im Anfangsstadium des ARDS in der BALF signifikant höhere Proteinkonzentrationen als bei Lungengesunden nachgewiesen werden [99;119].

Des Weiteren konnten Simons et al. [170] einen Abfall der Zahl lavagierbarer Zellen nach LPS-Injektion über die Zeit feststellen. Zwölf Stunden nach LPS-Gabe waren im Vergleich zu Kontrolltieren nur noch 50 % der Zellen lavagierbar. In der vorliegenden Untersuchung fiel die Zellkonzentration in der LPS-Gruppe auf 48 % im Vergleich zur Kontrollgruppe. Chang et al. [22] konnten einen signifikanten Abfall der Leukozyten in der BAL bereits 2 h nach einer einmaligen, intravenösen Injektion von LPS beobachten. Bis 12 h nach Sepsisinduktion fielen die Zellzahlen weiter ab, auch hier auf 50 % verglichen mit der Kontrollgruppe. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungsergebnisse fanden sich zudem Hinweise, dass Endotoxin die Integrität und Funktion alveolarer Zellen beeinträchtigt. In der LPS-Gruppe fanden sich vergleichsweise weniger intakte Zellen. Vermutlich aufgrund der erheblichen Unterschiede in der Vitalität der Zellen bei den LPS-Tieren wurde keine Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe und der IL-10-Gruppe erreicht.

Der Anteil der Alveolarmakrophagen an der Gesamtzahl an Leukozyten in der BAL liegt in allen Gruppen bei etwa 90 %, d.h. der Abfall der lavagierten Gesamtzellzahl war durch einen Abfall der Makrophagenzahl bedingt. Der zugrunde liegende Mechanismus ist dabei unklar. Eine Möglichkeit wäre, dass Endotoxin oder eine als Reaktion auf Endotoxin in vivo gebildete, biologisch aktive Substanz, durch

Aktivierung der Makrophagen deren Adhärenz am Alveolarepithel erhöht [22;170]. Diese Hypothese unterstützend konnte gezeigt werden, dass die Alveolarmakrophagenzahl in der Lunge dabei nicht vermindert, sondern eher erhöht ist [170]. Auch bei ARDS-Patienten konnte gezeigt werden, dass in der der BAL im Vergleich zu lungengesunden Kontrollen der Anteil der Alveolarmakrophagen an der Gesamtzellzahl signifikant geringer ist (56 % vs. 90 %) [99].

Die erwartete Zunahme an Neutrophilen Granulozyten an der Zellfraktion in der BAL bei Endotoxinämie war in unserem Modell nur gering ausgeprägt. Unter Umständen war die Zeitspanne der Endotoxinämie (6 h) zu kurz, um einen Neutrophileninflux in der BAL zu beobachten. Chang et al. konnten erst nach 24-stündiger Endotoxinämie einen signifikanten Anstieg der Neutrophilenzahl in der BAL nachweisen. Dagegen war im Lungengewebe bereits nach 2 h der maximale Anstieg der Neutrophilenzahl nachweisbar. Dies deckt sich mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, nach denen bereits innerhalb einiger Minuten nach intravenöser oder intraperitonealer Injektion von Endotoxin Neutrophile Granulozyten in den Lungenkapillaren akkumulieren [24;71;145].

#### **4.2.2.1.3 Freisetzung reaktiver Stickstoff- und Sauerstoffmetabolite aus Alveolarmakrophagen**

Makrophagen setzen sowohl nach in vitro [35;202] als auch in vivo [106;202] Stimulation mit LPS vermehrt reaktive Stickstoffmetabolite ( $\text{NO}_2^-$ , NO,  $\text{NO}_2$ ) frei. Dieser Effekt ist einerseits direkt über LPS vermittelt, andererseits indirekt über die vermehrte Freisetzung von  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IFN-}\gamma$ , und  $\text{IL-1}\beta$  [35;177]. Nitrit ist das stabile Oxidationsprodukt von Stickstoffmonoxid (NO). Von zentraler Bedeutung für die Bildung von NO ist die induzierbare NO-Synthetase (iNOS). Die iNOS wird in vielen Zellen (Makrophagen, Neutrophile Granulozyten, Endothelzellen, Epithelzellen, u. a.) nach Stimulation mit LPS oder proinflammatorischen Zytokinen, wie  $\text{IFN-}\gamma$ ,  $\text{IL-1}\beta$  und  $\text{TNF-}\alpha$ , induziert [210]. Stickstoffradikale tragen durch Lipidperoxidation, DNA-Oxidation und Inaktivierung von Enzymen und Proteinen zu Schädigungen

von Gewebe bei. Diese zytotoxischen Effekte resultieren entweder aus einer direkten Toxizität auf Moleküle oder aber aus einer synergistischen Schädigung mit anderen Oxidantien wie reaktiven Sauerstoffmetaboliten [107]. Die Reaktion von NO mit Superoxidanionen führt zur Produktion von Stickstoffmetaboliten, die zum Teil ein größeres zytotoxisches Potential haben als NO oder  $O_2^-$  alleine [157;196]. Ein Beispiel hierfür ist das potente Zytotoxin Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ). Auf der anderen Seite übernimmt NO neben seiner zytotoxischen Wirkung auch wichtige Funktionen bei der Zellprotektion und Signaltransduktion [107].

Bei Patienten mit ARDS in Folge Sepsis fanden Kobayashi et al. [99] in der BALF signifikant höhere  $NO_2^-$ -Konzentrationen als bei Lungengesunden oder langzeitbeatmeten Sepsispatienten ohne ARDS. Des Weiteren konnten sie nur in der ARDS-Gruppe eine iNOS-Expression in Alveolarmakrophagen nachweisen. Warner et al. [202] beobachteten nach in vitro Stimulation von Alveolarmakrophagen mit  $IFN-\gamma$ ,  $TNF-\alpha$  oder LPS eine zeit- und dosisabhängige Produktion von  $NO_2^-$ . In einer tierexperimentellen Untersuchung applizierten sie LPS intrapulmonal. In der anschließend gewonnenen BALF war der Gehalt an  $NO_2^-$  signifikant höher als bei unbehandelten Kontrolltieren. Die Alveolarmakrophagen aus den LPS-Tieren produzierten zudem spontan  $NO_2^-$ .

Auch in der hier vorliegenden Studie kam es sowohl durch die in vivo als auch durch die in vitro LPS-Applikation zur Induktion der  $NO_2^-$ -Freisetzung. Grundsätzlich kann IL-10 die Synthese von  $NO_2^-$  in Makrophagen in unterschiedlichen Systemen inhibieren und damit ihre zytotoxische Aktivität senken [28;61;62]. Die hier vorgelegten Ergebnisse belegen, dass die Applikation von IL-10-Aerosol bei experimenteller Endotoxinämie die Freisetzung von  $NO_2^-$  aus ex vivo kultivierten Alveolarmakrophagen hemmt. Im Gegensatz dazu konnte bei der Maus durch IL-10 Injektion 20 Minuten vor LPS-Injektion die  $NO_2^-$ -Produktion von Peritonealmakrophagen nicht reduziert werden [140]. Bei Maus-Makrophagen der

Zelllinie J774.2 zeigte sich dagegen *in vitro* eine signifikante Hemmung der  $\text{NO}_2^-$ -Freisetzung durch IL-10 [158]. Wurden in unserem Versuchsaufbau die Zellen *in vitro* noch einmal mit LPS stimuliert, setzten die Makrophagen der LPS- und IL-10-Tiere in etwa gleich viel  $\text{NO}_2^-$  frei. Das *in vivo* verabreichte IL-10 scheint demnach keine Wirkung auf die nachträglich *in vitro* stimulierten Alveolarmakrophagen zu besitzen. Ein Grund hierfür könnte die kurze biologische Halbwertszeit des IL-10 sein. Nach einmaliger, intravenöser Applikation von IL-10 liegt sie beim Menschen dosisabhängig zwischen 2.3 und 3.7 Stunden [86].

Alveolarmakrophagen spielen in der frühen Phase der Immunabwehr gegen inhalierte Pathogene eine besondere Rolle. Neben Stickstoffmetaboliten gehören Sauerstoffradikale, wie  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder  $\text{OH}$ , zu den Abwehrmechanismen phagozytischer Zellen (Neutrophile Granulozyten, Eosinophile Granulozyten, Makrophagen). Primärer Produzent dieser Oxidantien ist die NADPH-Oxidase, ein komplexes Enzymsystem, das normalerweise ruht und erst aktiviert wird, wenn die Phagozyten einen fremden Organismus erkennen. Werden überschießend Sauerstoffradikale frei, führt dies zu Schädigungen des umliegenden Gewebes. Sauerstoffradikale können Proteine denaturieren und dadurch Enzyme deaktivieren. Außerdem führen sie über die Peroxidation von Lipiden zu Membranstabilitäten [45;98]. Um diese potentiell gefährlichen Oxidantien in Schach zu halten, gibt es in der Lunge eine Reihe antioxidativer Mechanismen. Versagen diese Radikalfänger, kann dies zu den unterschiedlichsten Lungenerkrankungen führen: ARDS [8;56;205], strahleninduzierte Pneumonitis [75], Lungenemphysem als Folge des Zigarettenrauchens [20], toxische Lungenerkrankungen [18;27;127] und experimenteller Lungenschaden [92;165].

In der vorliegenden Untersuchung produzierten die Alveolarmakrophagen aus allen drei Gruppen spontan geringe Mengen an  $\text{O}_2^-$ . Durch den sehr potenten *in vitro* Stimulus PMA konnte in keiner Gruppe ein signifikanter Anstieg der  $\text{O}_2^-$ -Freisetzung

induziert werden. Zudem führte die in vivo Endotoxingabe weder bei unstimulierten noch bei PMA-stimulierten Zellen zu einem Anstieg der  $O_2^-$ -Produktion.

In vielen anderen Systemen ist der Nachweis von  $O_2^-$  untersucht. Die von uns verwendete Methode wurde bereits bei Monozyten [72;174;206], Peritonealmakrophagen [179;206], Neutrophilen [46;72;197] und Eosinophilen [148] Granulozyten angewandt. Es wird zumeist angenommen, dass bei Schädigung der Lunge Sauerstoffradikale vor allem durch Neutrophile Granulozyten produziert werden [82;190;203], zu Alveolarmakrophagen liegen nur wenige Untersuchungen vor. McGuire et al. [120] untersuchten die  $O_2^-$ -Freisetzung aus Alveolarmakrophagen der Ratte nach hepatischer Ischämie und Reperfusion und gleichzeitiger LPS-Injektion. Es zeigte sich weder spontan noch nach PMA-Stimulation ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu zeigte sich unter den gleichen Bedingungen bei Neutrophilen Granulozyten, gewonnen aus dem Gefäßbett der Lunge, durch Ischämie und Endotoxin ein Anstieg sowohl der spontanen als auch der stimulierten  $O_2^-$ -Produktion.

Holman et al. [82] wiesen nach 72-stündiger Endotoxinämie eine höhere spontane Freisetzung von  $O_2^-$  aus Neutrophilen Granulozyten aus der BAL verglichen mit zirkulierenden Neutrophilen aus Kontrolltieren nach. Wurden die Zellen in vitro mit PMA stimuliert, produzierten die Neutrophilen aus der BAL der LPS-behandelten Ratten signifikant weniger  $O_2^-$  als die Neutrophilen aus dem Blut der Kontrolltiere.

Wizeman et al. [209] verglichen die Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite zwischen Alveolarmakrophagen und Makrophagen aus dem Interstitium von Rattenlungen. Dabei zeigte sich, dass nach vorheriger i.v.-Injektion von LPS nur die interstitiellen Makrophagen vermehrt Sauerstoffradikale produzierten.

Auch Dörger et al. [38] fanden Hinweise darauf, dass in Alveolarmakrophagen die Produktion von Sauerstoffradikalen der Bedeutung der Produktion von

Stickstoffmetaboliten quantitativ unterlegen ist. Folglich könnte der in der vorliegenden Untersuchung fehlende Anstieg der  $O_2^-$ -Produktion nach in vivo und in vitro Stimulation eine spezifische Charakteristik der Alveolarmakrophagen sein.

Aber auch methodische Probleme bei der  $O_2^-$ -Messung mittels Cytochrom-C-Methode könnten eine Rolle bei der scheinbar geringen und schlecht induzierbaren Produktion von  $O_2^-$  spielen. Das durch  $O_2^-$  reduzierte Cytochrom-C kann sowohl enzymatisch als auch nicht-enzymatisch oxidiert werden, was zu einer Verminderung, bis hin zur völligen Beseitigung, des nachweisbaren Reaktionsproduktes führen kann. Während der Superoxidationen-Reaktion anwesende Hydroxylradikale [164] und Peroxynitrit [195] können so zur nicht-enzymatischen Oxidation des reduzierten Häm-Eisens des Cytochrom-C beitragen. Ein weiteres Problem ist, dass  $O_2^-$  von der Zellmembran teilweise in Phagosomen abgegeben wird und sich dann der Reaktion mit Cytochrom-C entzieht [40]. Auch kann Cytochrom-C in Anwesenheit von  $H_2O_2$  das zu untersuchende System oxidativ schädigen und damit die Sauerstoffradikalbildung beeinflussen [151].

#### **4.2.2.1.4 Zytokinfreisetzung in der Lunge**

Ein komplexes Netzwerk an Zytokinen initiiert, verstärkt und unterhält bei akutem Lungenschaden das inflammatorische Geschehen in der Lunge (Übersicht bei: [201]). Makrophagen, aber auch Epithelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten produzieren Zytokine und können gleichzeitig als Effektorzellen durch weitere Mediatoren stimuliert werden.

Im in dieser Untersuchung vorliegenden Modell des experimentellen Lungenschadens waren nach Endotoxingabe in der BALF die Konzentrationen aller bestimmten proinflammatorischen Zytokine im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant erhöht. Durch Applikation von IL-10-Aerosol konnte dieser Anstieg der Konzentration proinflammatorischer Zytokine gesenkt und zum Teil vollständig inhibiert werden.



TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  stehen am Anfang der inflammatorischen Kaskade und werden daher oft „early response cytokines“ genannt [63]. TNF- $\alpha$  und IL-1 werden in erster Linie von LPS-aktivierten mononukleären Phagozyten produziert. TNF- $\alpha$  ist der hauptsächliche Mediator der Wirtsabwehr gegen gramnegative Bakterien; es löst eine Vielzahl von immunologischen Reaktionen aus und unterhält das Entzündungsgeschehen. TNF- $\alpha$  aktiviert Leukozyten, vor allem Neutrophile Granulozyten, und führt über eine vermehrte Expression von Adhärenzmolekülen auf Endothelzellen zu deren Akkumulation am Entzündungsherd. Außerdem stößt TNF- $\alpha$  die Zytokin- und Chemokinproduktion verschiedener Zellen an und aktiviert zudem das Gerinnungssystem. Ähnlich wichtig für die Vermittlung einer Entzündungsreaktion bei der natürlichen Immunität ist IL-1. Wie auch TNF- $\alpha$ , verursacht IL-1 Fieber, induziert die Synthese von Akutphasen-Plasmaproteinen in der Leber und bringt einen metabolischen Zerfall (Kachexie) in Gang. TNF- $\alpha$  und auch IL-1 $\beta$  sind sowohl in der BALF von bereits an ARDS erkrankten Patienten als auch in der BALF von Patienten mit erhöhtem Risiko an ARDS zu erkranken nachweisbar [169;181]. Beobachtungen, wonach bei ARDS Patienten die Konzentrationen von TNF- $\alpha$  und IL-1 in der BAL gegenüber den in manchen Fällen erhöhten Plasmawerten gesteigert vorkamen, sprechen für den pulmonalen Ursprung der Zytokine [87;181].

Die endobronchiale Applikation von IL-10 konnte in verschiedenen tierexperimentellen Modellen der pulmonalen Inflammation die TNF- $\alpha$ -Konzentration in der BALF senken. In einem Modell der Immunkomplex-induzierten Alveolitis instillierten Mulligan et al. [125] eine IL-10-Lösung intratracheal und fanden eine 92%ige Reduktion der TNF- $\alpha$ -Konzentration verglichen mit den unbehandelten Tieren. Escofier et al. [44] untersuchten die Wirkung der intranasalen Applikation von IL-10 in einem Modell, bei dem der Lungenschaden der Ratte durch die Inhalation von LPS-Aerosol ausgelöst wurde. Hier konnte die durch das LPS-Aerosol erhöhte TNF- $\alpha$ -Konzentration in der BALF durch IL-10 vollständig supprimiert werden.

IFN- $\gamma$  verstärkt die biologische Wirkung von TNF- $\alpha$  und ist ein potenter Aktivator der mononukleären Phagozyten. IFN- $\gamma$  aktiviert aber auch Neutrophile Granulozyten, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und vaskuläre Endothelzellen. IFN- $\gamma$  induziert direkt die Synthese von Enzymen, die zur Produktion reaktiver Stickstoff- und Sauerstoffmetaboliten führen („respiratory burst“). Die IFN- $\gamma$ -Bildung erfolgt hauptsächlich von T-Lymphozyten und NK-Zellen. In einem Mausmodell des Endotoxin-induzierten Lungenschadens konnte gezeigt werden, dass in der Lunge IFN- $\gamma$  neben IL-1 und IL-6 signifikant erhöht ist [94]. IL-10 kann die LPS-induzierte IFN- $\gamma$ -Produktion sowohl in vitro als auch in vivo inhibieren [113].

IL-6 ist weiter distal in der Zytokinkaskade lokalisiert und wird von aktivierten Makrophagen, Gefäßendothelzellen und anderen Zellen gebildet. Es veranlasst die Hepatozyten, verschiedene Plasmaproteine – wie Fibrinogen, das an der Akutephasen-Antwort beteiligt ist – zu synthetisieren. Bei ARDS-Risikopatienten ist die IL-6-Konzentration in der BALF sehr hoch und bleibt nach Erkrankung im weiteren Verlauf des ARDS erhöht [116]. Thomassen et al. [194] zeigten nach in vitro Stimulation humaner Alveolarmakrophagen mit LPS eine signifikante Steigerung der Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6. Durch die gleichzeitige Gabe von rekombinantem, humanem IL-10 (rhIL-10) konnten die Konzentrationen der genannten Mediatoren im Zellüberstand signifikant gesenkt werden.

RANTES gehört der Gruppe der C-C Chemokine an. Die Chemokine umfassen eine Gruppe von Zytokinen, die alle die Fähigkeit haben, die Motilität (Chemokinese) und die zielgerichtete Wanderung (Chemotaxis) von Leukozyten zu stimulieren. Die Bezeichnung „Chemokine“ ist eine Abkürzung für „**chemotaktische Zytokine**“. Ausgehend von ihrer Primärstruktur werden die Zytokine in verschiedene Subgruppen (C, C-C, C-X-C und C-X<sub>3</sub>-C) unterteilt. Heute sind mehr als 50 Chemokine bekannt. RANTES wird von aktivierten T-Lymphozyten produziert.

Daneben konnte mittlerweile auch in anderen Zellpopulationen, wie Monozyten, Bronchialepithelzellen und Astrozyten eine RANTES-Expression nachgewiesen werden. RANTES wirkt u.a. chemotaktisch auf Monozyten, auf eine Subpopulation von T-Lymphozyten, NK-Zellen, basophile und eosinophile Granulozyten und dendritische Zellen. In einem Mausmodell bewirkte die intraperitonealer Injektion von LPS in der Lunge eine Hochregulation der RANTES-Produktion. Außerdem hängt die Expression von RANTES offenbar von der endogenen TNF- $\alpha$ -Produktion ab [198]. In humanen Monozyten antagonisiert IL-10 die Stimulation der RANTES-Produktion durch TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  [115]. Auch in Astrozyten der Ratte konnte gezeigt werden, dass eine TNF- $\alpha$ - bzw. IFN- $\gamma$ -induzierte mRNA-Expression durch IL-10 inhibiert wird [77].

Der Nachweis von IL-10 in der BALF gelang in der präsentierten Arbeit nur bei einem Tier der LPS- und einem Tier der IL-10-Gruppe. Die Konzentrationen lagen mit 4.28 und 3.68 pg/ml knapp über der, mit dem von uns verwendeten ELISA detektierbaren, minimalen Konzentration. Wir führten die bronchoalveoläre Lavage mit 100 ml PBS durch, was eine Verdünnung aller Zytokinkonzentration zur Folge hat. Unter Umständen wurden die geringen in der Lunge vorhandenen IL-10-Konzentrationen so weit verdünnt, dass sie mit dem ELISA nicht mehr detektiert werden konnten.

In der Lunge kann IL-10 von Alveolarmakrophagen [194], Bronchialepithelzellen [15] und von T-Zellen [212] gebildet werden. Die Aktivierung von Alveolarmakrophagen durch LPS konnte in dieser Untersuchung anhand einer vermehrten NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion nachgewiesen werden. Daraus könnte man schließen, dass die Alveolarmakrophagen durch die LPS-Stimulation auch vermehrt IL-10 produzieren. Studien an menschlichen Alveolarmakrophagen konnten dies auch bestätigen [91;112]. Es gibt aber ebenfalls Studien, die keine IL-10-Produktion nach LPS-Stimulation zeigten [12;194]. In unserem Modell konnten wir am Versuchsende weder nach LPS-Stimulation noch nach intrapulmonaler Applikation von IL-10

erhöhte IL-10-Konzentrationen in der BALF nachweisen. Dass exogen zugeführte IL-10 könnte aufgrund der bereits erwähnten kurzen Halbwertszeit (2.3 bis 3.7 h [86]) nach 6 h bereits nicht mehr in der Lunge nachweisbar gewesen sein. Inwieweit sich die IL-10-Halbwertszeit bei der Spezies Ratte bzw. im Kompartiment Lunge unterscheidet ist überdies unbekannt. Welche Rolle die Alveolarmakrophagen für die Produktion von IL-10 bei ARDS spielen, und durch welche Zellen bei ARDS die Produktion von IL-10 reguliert wird, bleibt unklar.

#### **4.2.2.2 Systemische Wirkung**

Nach Injektion von LPS können die systemische und lokale Inflammation schwerlich voneinander getrennt betrachtet werden; sie stehen im gegenseitigen Austausch. Die lokale antiinflammatorische Wirkung von IL-10-Aerosol in der Lunge könnte sekundär auch das systemische entzündliche Geschehen günstig beeinflussen. Zum einen könnte über eine Veränderung der Freisetzungen von Mediatoren und Zytokinen in der Lunge die systemische Entzündungskaskade beeinflusst werden. Zum anderen könnten in der Lunge aktivierte Zellen, z. B. Makrophagen in den systemischen Kreislauf übertreten. Diese Zellen könnten dann sekundär über die Freisetzung antiinflammatorischer Mediatoren die systemische Entzündungsreaktion supprimieren. Inwieweit IL-10 auch über die alveolokapilläre Membran direkt in den systemischen Kreislauf gelangt, lässt sich zudem anhand der IL-10-Kinetik im Plasma abschätzen. Der kontinuierliche Anstieg der IL-10-Konzentration bei den mit IL-10 vernebelten Tieren könnte auf eine stetige Abgabe von IL-10 aus der Lunge hinweisen. Begünstigend auf einen Übertritt von Entzündungszellen und IL-10-Protein in die Blutbahn wirkt zudem die invasive Beatmung mit PEEP.

##### **4.2.2.2.1 Hämodynamik**

Veränderungen der Hämodynamik und Störungen des Säure-Basen-Haushaltes waren keine primären Zielparameter, da therapeutisch korrigierend eingegriffen wurde. Durch Volumensubstitution und Katecholamingabe sollte eine

Organminderdurchblutung, insbesondere der Lunge verhindert werden. Eine eingeschränkte pulmonale Mikrozirkulation und eine hieraus resultierende Gewebshypoxie hätten möglicherweise fatale Auswirkungen auf die intrapulmonalen Zellpopulationen gehabt. Alveolarmakrophagen reagieren empfindlich auf Hypoxie und Entgleisungen des pH-Wertes [214].

Typischerweise kommt es unmittelbar nach LPS-Gabe zu einem signifikanten Abfall des Blutdrucks, mit einem Tiefpunkt nach 15 Minuten [76]. Neben dieser frühen, akuten Phase gibt es eine späte, chronische Phase, die ungefähr 70 Minuten nach Endotoxingabe beginnt und unbehandelt einige Stunden später zum Tode führt [136]. Auch in der vorliegenden Untersuchung konnte dieser phasenhafte Verlauf nachvollzogen werden.

#### **4.2.2.2 Blutbild**

Der Abfall der Hämoglobinkonzentration und des Hämatokrits über die Zeit ist durch geringe Blutverluste während der Präparation, die stündlichen Blutabnahmen sowie die kontinuierliche Flüssigkeitsinfusion erklärbar. Auch bei der Thrombozyten- und Leukozytenkonzentration muss dieser Verdünnungseffekt beachtet werden.

Die Thrombozytenkonzentrationen aller drei Gruppen fallen tendenziell ab. Aufgrund großer interindividueller Konzentrationsunterschiede erreicht der Abfall jedoch keine Signifikanz. Dies könnte an der Messmethode der PLT mittels Coulters liegen. Mehrfachbestimmungen aus einer Blutprobe führten häufig zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Mögliche Gründe sind die inhomogene Aktivierung der Gerinnung innerhalb der Probe oder gerätebedingte Messfehler. Dennoch lässt sich bei der LPS- und IL-10-Gruppe eine tendenziell geringere Plättchenkonzentration beobachten, verglichen mit der Kontrollgruppe. Beim Menschen wird eine isolierte Thrombozytopenie häufig gerade zu Beginn einer Septikämie beobachtet und ist ein wichtiger Hinweis auf eine systemische

Ausbreitung einer zuvor lokalen Infektion [137]. Es werden vor allem vermehrt Thrombozyten verbraucht [129], aber auch immunologische Zerstörung [41] und verminderte Freisetzung [153] spielen eine Rolle. Bei Patienten mit akutem Lungeschaden konnte außerdem eine Sequestration von Thrombozyten in der Lunge gezeigt werden [162]. Meduri [121] beobachtete bei Patienten mit ARDS im Verlauf der Erkrankung eine Verminderung der Thrombozytenkonzentration um mindestens 50 % des Ausgangswertes. Sheu et al. [168] konnten bei der Ratte 4 h nach LPS-Injektion einen signifikanten Abfall der Thrombozytenkonzentration im Blut nachweisen.

Die periphere Leukozytenkonzentration fiel in der durchgeführten Untersuchung nach LPS-Infusion initial ab. Innerhalb des Beobachtungszeitraumes näherte sich die WBC wieder Baseline-Werten an. Chang et al. [22] zeigten ebenfalls, dass direkt nach intravenöser Injektion von LPS in Ratten die Leukozytenkonzentration absinkt, um sich nach 6 h wieder dem Ausgangsniveau zu nähern. Vor allem Neutrophile Granulozyten migrieren aus den Kapillaren ins Gewebe. Über das pulmonale Gefäßbett kommt es in der Lunge daraufhin zu einer neutrophilen Alveolitis, typischer Vorbote eines akuten Lungenversagens [155;201].

Bei den Differentialzellzahlen – bestimmt aus dem am Versuchsende abgenommenen Blut – fällt zunächst auf, dass die Leukozytenzahlen deutlich geringer als beim letzten Messzeitpunkt (Mea 7) sind. Dies ist vereinbar mit einem Verdünnungseffekt durch die Überdosis Pentobarbital am Versuchsende. Die signifikante Erhöhung der Monozytenfraktion bei LPS- und IL-10-Gruppe im Gegensatz zur Kontrollgruppe ist am ehesten Folge des geringeren Anteils an Neutrophilen Granulozyten, auch wenn diese sich zwischen den Gruppen nicht signifikant voneinander unterscheiden. Rinaldo et al. [155] zeigten, dass 6 h nach Endotoxingabe der noch nach 1 h vorhandene Abfall der Neutrophilen-Konzentration nicht mehr vorhanden ist. Im Gegensatz dazu beobachteten Chang et al. [22] einen Anstieg der Neutrophilen Granulozyten ab 2 bis 24 Stunden nach Sepsisinduktion.

#### 4.2.2.2.3 Systemische Zytokinfreisetzung

Über die Bestimmung systemischer Zytokinkonzentrationen wurde immer wieder versucht, die Entwicklung und die Schwere des Verlaufs des ARDS vorauszusagen. Vorteilhaft ist die einfache Gewinnung von Blutproben im Vergleich zur Gewinnung einer BAL. In einzelnen Studien wurde gezeigt, dass Patienten mit erhöhten Konzentrationen von TNF- $\alpha$  [11], IL-1 [5], IL-6 [99;189] und IL-8 [99;189] mit einer höheren Wahrscheinlichkeit an ARDS erkranken. In der Zusammenschau entsprechender Befunde ließ sich jedoch kein Zytokin identifizieren, das konsistent eine Vorhersage über das Auftreten und den Verlauf des ARDS erlaubt. Wichtiger als die Konzentrationen einzelner Mediatoren, scheint das Interaktionsmuster aller pro- und antiinflammatorischen Mediatoren zu sein.

In unserem Modell kommt es durch das intravenös verabreichte LPS zu einem Anstieg aller bestimmten proinflammatorischen Zytokine im Plasma. Durch die Vernebelung von IL-10 wurden die Konzentration von IFN- $\gamma$ , RANTES, IL-1 und IL-6, nicht aber diejenige von TNF- $\alpha$  im Plasma gesenkt.

Möglicherweise waren die durch die Vernebelung systemisch erreichten IL-10-Konzentrationen nicht ausreichend, um die TNF- $\alpha$ -Produktion zu senken. Dann müsste aber zur Hemmung der TNF- $\alpha$ -Produktion mehr IL-10 benötigt werden als zur Hemmung der anderen proinflammatorischen Zytokine. Dagegen spricht die Untersuchung von Chernoff et al. [23], hier konnte kein Unterschied in der Dosis-Wirkungsbeziehung von IL-10 zwischen TNF- $\alpha$  und IL-1 festgestellt werden. Gesunden Probanden wurden IL-10-Dosen von 1, 10 und 25  $\mu\text{g}/\text{kgKG}$  bzw. Placebo injiziert, zum Zeitpunkt 0 h, 3 h, 6 h, 24 und 48 h wurden Blutproben entnommen und in vitro mit LPS stimuliert. Die Hemmung der TNF- $\alpha$ - und IL-1-Produktion verhielt sich streng dosisabhängig, bei der geringsten Dosis IL-10 konnte bereits nach 6 h keine Hemmung mehr beobachtet werden. Außerdem steht TNF- $\alpha$  mit IL-1 am Anfang der inflammatorischen Zytokinkaskade, über die Hemmung von TNF- $\alpha$  und IL-1 werden weiter distale Zytokine in ihrer Produktion gehemmt.

Eine andere Erklärung wäre, dass die TNF- $\alpha$ -Konzentration nach einer vorübergehenden Hemmung durch IL-10 zu einem späteren Zeitpunkt noch einmal ansteigt. Solch ein zweiter, späterer Peak in der TNF- $\alpha$ -Produktion nach einmaliger LPS-Injektion ist jedoch nicht beschrieben. Sechs Stunden nach LPS-Injektion lassen sich oft keine erhöhten TNF- $\alpha$ -Konzentrationen mehr feststellen [83;88;113]. Möglicherweise ist die pulmonal selektive Wirkung von IL-10 auf TNF- $\alpha$  auch eine Besonderheit der pulmonal-topischen Applikation als Aerosol. Wie IL-10 seine systemische antiinflammatorische Wirkung überhaupt erreicht und welche Rolle die in der Lunge ansässigen immunkompetenten Zellen dabei spielen, bedarf weiterer Untersuchung.

Die Plasmakonzentrationen von IL-10 waren am Ende des Versuchszeitraumes sowohl in der LPS- als auch in IL-10-Gruppe signifikant höher als bei der Kontrollgruppe; zwischen den Gruppen bestand jedoch kein signifikanter Unterschied. Die Plasmakonzentrationen von IL-10 am Versuchsende lassen demnach keinen Schluss auf eine eventuelle systemische Resorption von pulmonal deponiertem IL-10 zu.

In der erhobenen IL-10-Kinetik zeigte sich nach Vernebelung bis zu einem gewissen Niveau ein langsamer Anstieg der IL-10-Plasmakonzentrationen über die Zeit. Dies könnte darauf hinweisen, dass eine gewisse Menge IL-10 kontinuierlich in den systemischen Kreislauf gelangt. Debs et al. [31] postulieren, dass die systemische Aufnahme eines Zytokin-Aerosol limitiert ist und dass dieser Prozess allmählich über die Zeit geschieht. Sie zeigten in einem Rattenmodell, dass 30 Minuten nach Applikation von TNF- $\alpha$ -Aerosol bzw. intravenöser TNF- $\alpha$ -Injektion vergleichbar hohe TNF- $\alpha$ -Spiegel in der Lunge erreicht werden. Im Gegensatz dazu ließ sich im Blut nach i.v.-Injektion ein 3000fach höherer TNF- $\alpha$ -Spiegel nachweisen als nach Aerosolapplikation [31].

Bei den LPS-Tieren zeigte sich im zeitlichen Verlauf ein zu erwartender Peak der IL-10-Plasmakonzentration 1 - 2 Stunden nach LPS-Injektion (vgl. [88;113]). Dass



dieser Peak in der IL-10-Gruppe ausblieb, lag möglicherweise an der bereits erwähnten Autoregulation der endogenen IL-10-Produktion. Das exogen zugeführte IL-10 könnte zu einer negativen Feedback-Regulation der endogenen IL-10-Synthese geführt haben. Inoue et al. [88] zeigten in einem Mausmodell, dass – verglichen mit der IL-10-Kinetik nach alleiniger LPS-Injektion – nach gleichzeitiger i.v.-Injektion von IL-10 und LPS die IL-10-Plasmakonzentrationen tendenziell langsamer und geringer anstiegen.

### 4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden die technischen Voraussetzungen zur Jetvernebelung im Kleintiermodell der Ratte geschaffen. Die Inhalation von IL-10-Aerosol vor Injektion von LPS führte sowohl pulmonal als auch systemisch zu einer Reduktion der Konzentrationen proinflammatorischer Mediatoren. IL-10-Aerosol greift demnach direkt in die immunologischen Prozesse der Entzündungsreaktion ein und bietet damit eine Option zur antiinflammatorischen Therapie bei Sepsis und ARDS.

Zwischenzeitlich wurde IL-10 bereits in einer ersten klinischen Untersuchung zur antientzündlichen Therapie des akuten Lungenversagens eingesetzt [13]. Diese placebokontrollierte, randomisierte Studie wurde an 60 Patienten durchgeführt. Die Therapiegruppe erhielt sechsmal am Tag 8 bzw. 20 µg/kg KG IL-10 intravenös. Die TNF- $\alpha$ - und IL-6-Plasmakonzentrationen und die TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in der BAL fielen daraufhin im weiteren Krankheitsverlauf ab, während sie bei der Placebogruppe noch weiter anstiegen.

Plasmaspiegel einzelner Zytokine lassen jedoch keine Rückschlüsse auf die Effektivität einer Therapie in Bezug auf die Verringerung der Mortalität kritisch kranker Patienten zu. Auch welchen Einfluss IL-10 auf die typischen klinischen Veränderungen bei Sepsis bzw. Endotoxämie hat, wurde bislang noch nicht erschöpfend untersucht. In einem Endotoxämie-Modell an gesunden Probanden unterdrückte die vorherige Injektion von IL-10 zwar die Entzündungsreaktion nach Endotoxingabe, IL-10 hatte jedoch keinen Einfluss auf die hämodynamische oder kardiovaskuläre Antwort auf LPS [102]. Die enttäuschenden Ergebnisse bereits eingangs erwähnter Studien [3;26;52;53] zur antiinflammatorischen Therapie bei Sepsis bzw. ARDS durch Blockade einzelner proinflammatorischer Zytokine zeigen, dass die komplexen, pathophysiologischen Vorgänge bei diesen Krankheitsbildern noch lange nicht erschöpfend untersucht sind. Um eine wirksame immunmodulierende Therapie und eine Senkung der immer noch hohen

Sterblichkeit septischer Erkrankungen zu erreichen, sind folglich noch viele weiterführende Untersuchungen notwendig. In diesem Zusammenhang eignen sich experimentelle Studien dazu, unter definierten, überschaubaren Bedingungen einzelne Zusammenhänge näher zu beleuchten.

Am in dieser Arbeit vorgestellten Tiermodell zur experimentellen Endotoxinämie könnten folgende Gesichtspunkte der Therapie mit IL-10-Aerosol näher untersucht werden:

- Die Beschreibung der Dosis-Wirkungsbeziehung von IL-10-Aerosol auf pulmonaler und systemischer Ebene.
- Die Abhängigkeit der antiinflammatorischen Wirkung vom Applikationszeitpunkt von IL-10 im Verhältnis zur LPS-Injektion.
- Der Einfluss von IL-10-Aerosol auf Ebene der Gentranskription und -translation.
- Die längerfristigen Auswirkungen von IL-10 auf das Immunsystem.
- Die Evaluation eventueller toxischer Effekte und Nebenwirkungen einer Behandlung mit IL-10-Aerosol.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Das „Acute Respiratory Distress Syndrome“ (ARDS) ist eine akut auftretende, überwiegend Sepsis-induzierte, inflammatorische Erkrankung der Lunge mit hoher Letalität [85;201]. Ein komplexes Netzwerk aus proinflammatorischen Zytokinen und Mediatoren initiiert und perpetuiert dabei die pulmonale Entzündungsreaktion [180;201].

Vor diesem Hintergrund steht das Konzept der therapeutischen Suppression dieser Substanzen. Dem Zytokin Interleukin-10 (IL-10) könnte in diesem Zusammenhang aufgrund seines ausgeprägten antiinflammatorischen Wirkspektrums eine Bedeutung zukommen; IL-10 hemmt physiologisch die Synthese und Freisetzung von Entzündungsmediatoren [69]. In tierexperimentellen Untersuchungen bei Sepsis bzw. experimenteller Endotoxämie konnte die protektive Wirkung von systemisch appliziertem IL-10 auf das Überleben der Versuchstiere sowie die Verminderung der Konzentrationen zirkulierender, proinflammatorischer Mediatoren gezeigt werden [64;83].

Mit der vorliegenden Studie wurde erstmals untersucht, welche Auswirkungen eine Behandlung mit inhaliertem IL-10 im Hinblick auf die pulmonale und systemische Entzündungsreaktion hat. Da die Tierversuche in der intubierten und kontrolliert beatmeten Ratte durchgeführt werden sollten, musste zunächst ein hierfür geeignetes Verneblersystem entwickelt werden.

Die *in vitro* Evaluation des neu entwickelten Verneblersystems ergab, dass das entwickelte Jetverneblersystem eine für eine alveoläre Deposition geeignete Partikelgröße liefert ( $\varnothing$  2  $\mu$ m). *In vivo* zeigten die produzierten Aerosolpartikel eine gleichmässige Deposition über die gesamte Lunge. Insgesamt deponierten rund 3.8 % (1.3) (Median (IQR)) der vernebelten Ausgangslösung in alveolären Bereichen. Der Vernebelungsprozess beeinflusste weder die Herzfrequenz, den mittleren arteriellen Blutdruck, den arteriellen Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruck noch die Integrität des Lungenparenchyms und kann daher als sicher angesehen werden.

An 24 narkotisierten, kontrolliert beatmeten Ratten wurde die antiinflammatorische Wirkung von IL-10-Aerosol untersucht. Die Induktion des experimentellen Lungenschadens erfolgte durch intravenöse Injektion von Endotoxin (LPS).

Die Tiere wurden zufällig einer von drei Versuchsgruppen zugeordnet: Die LPS-Gruppe erhielt eine LPS-Injektion (5 mg/kg/KG) ohne therapeutische Intervention. Bei der IL-10-Gruppe erfolgte unmittelbar vor LPS-Injektion eine Behandlung mit IL-10-Aerosol (vernebelte Dosis: ~ 5 µg / Tier; deponierte Dosis: ~ 0.19 µg / Tier). In einer Kontrollgruppe wurde die Auswirkung von Narkose, chirurgischer Präparation, Beatmung und Aerosolapplikation (Inhalation von PBS als die IL-10-Trägerlösung) evaluiert. Während einer Beobachtungszeit von 6 h nach LPS-Injektion wurden kontinuierlich die Hämodynamik und Lungenmechanik sowie stündlich die arteriellen Blutgase und das Butbild bestimmt. Am Ende der Versuche erfolgten eine Bronchoalveoläre Lavage (BAL) sowie die Entnahme von Blut- bzw. Plasmaproben. Wichtigste Zielparameter waren hierbei die pulmonale und systemische Entzündungsreaktion.

Durch die Injektion von LPS konnte sowohl systemisch als auch pulmonal eine akute Entzündungsreaktion ausgelöst werden. Zwar führte die experimentelle Endotoxinämie nur zu geringen Verschlechterungen der klinischen Parameter, jedoch zeigte sich sowohl in der BAL als auch im Plasma ein Anstieg der bestimmten proinflammatorischen Mediatoren (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , RANTES, IL-1, IL-6). Desweiteren führte LPS zu einer Freisetzung reaktiver Stickstoffradikale aus durch die BAL gewonnenen und ex vivo kultivierten Alveolarmakrophagen.

Die Applikation von IL-10-Aerosol senkte die erhöhten Konzentrationen von IFN- $\gamma$ , RANTES, IL-1 und IL-6 sowohl in der BAL als auch im Plasma. Eine Reduktion der TNF- $\alpha$ -Konzentration war nur in der BAL nachweisbar. Auch die Freisetzung von reaktiven Stickstoffradikalen aus Alveolarmakrophagen wurde durch IL-10-Inhalation suffizient supprimiert.

Die Vernebelung von IL-10 vor Induktion einer experimentellen Endotoxinämie zeigte sowohl pulmonal als auch systemisch antiinflammatorische Wirkungen. Basierend auf den hier vorgestellten Befunden können nun weitere Untersuchungen zur Beschreibung der Dosis-Wirkungsbeziehung und zur Bestimmung des Zeitfensters für eine therapeutische Applikation von IL-10-Aerosol nach LPS-Stimulation folgen.

## 6 VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

|                     |  |
|---------------------|--|
| AF                  | Atemfrequenz [ $\text{min}^{-1}$ ]   |
| AMV                 | Atemminutenvolumen [ $\text{l}/\text{min}$ ]                               |
| ARDS                | Acute Respiratory Distress Syndrome; akutes Lungenversagen                 |
| BAL                 | Bronchoalveolar lavage; Bronchoalveoläre Lavage, gesamte Lavageflüssigkeit |
| BALF                | Bronchoalveolar lavage fluid; zellfreie Lavageflüssigkeit                  |
| BE                  | Baseexcess; Basenüberschuss  |
| C                   | Compliance der Lunge [ $\text{ml}/\text{mbar}$ ]                           |
| ELISA               | Enzyme-linked immunosorbent assay  |
| $\text{FiO}_2$      | Inspiratorische Sauerstoffkonzentration                                    |
| FM                  | Fluoreszierende Mikrosphären   |
| GSD                 | Geometric standard deviation; geometrische Standardabweichung              |
| Hb                  | Hämoglobingehalt [ $\text{g}/\text{dl}$ ]                                  |
| $\text{HCO}_3^-$    | Plasmabicarbonatkonzentration  |
| HF                  | Herzfrequenz [ $\text{min}^{-1}$ ]   |
| Hkt                 | Hämatokrit [%]   |
| $\text{IFN-}\gamma$ | Interferon- $\gamma$   |
| IL-1                | Interleukin-1  |
| IL-10               | Interleukin-10   |
| IL-1Ra              | IL-1-Rezeptorantagonist  |
| IL-6                | Interleukin-6  |
| IL-8                | Interleukin-8  |

|                   |   |
|-------------------|---|
| IQR               | Interquartilsabstand; Differenz zwischen 75. und 25. Perzentil bzw. 3. und 1. Quartil       |
| KG                | Körpergewicht [g]   |
| LPS               | Lipopolysaccharid   |
| MAP               | Mittlerer arterieller Blutdruck   |
| Mea               | Measurement; Messzeitpunkt  |
| MMAD              | Mass Median Aerodynamic Diameter  |
| mRNA              | Messenger-RNA; Boten-RNA  |
| paCO <sub>2</sub> | Arterieller Kohlendioxidpartialdruck  |
| paO <sub>2</sub>  | Arterieller Sauerstoffpartialdruck  |
| PBS               | Phosphate buffered saline; 0.81 prozentige, pyrogenfreie, phosphatgepufferte Kochsalzlösung |
| PCV               | Pressure-controlled ventilation; druckkontrollierte Beatmung                                |
| PEEP              | Positive endexpiratory pressure; positiver endexpiratorischer Atemwegsdruck                 |
| pH                | Negativer dekadischer Logarithmus der molaren H <sup>+</sup> -Ionen-Konzentration           |
| PLT               | Platelets; Thrombozytenkonzentration [10 <sup>6</sup> /ml]                                  |
| p <sub>max</sub>  | Maximaler Atemwegsdruck [mbar]  |
| R                 | Resistance der Lunge [mbar/l/s]   |
| RANTES            | Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted                               |
| TNFsRp            | löslicher TNF- $\alpha$ -Rezeptor   |
| TNF- $\alpha$     | Tumornekrosefaktor- $\alpha$  |
| V <sub>T</sub>    | Tidalvolumen [ml]   |
| WBC               | White blood cells; Konzentration der zirkulierenden Leukozyten [10 <sup>6</sup> /ml]        |



## 7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Aerosol consensus statement--1991. American Association for Respiratory Care. *Respir Care* 1991; 36:916-921.
2. Aerosol consensus statement. Consensus Conference on Aerosol Delivery. *Chest* 1991; 100:1106-1109.
3. Abraham E, Anzueto A, Gutierrez G, Tessler S, San Pedro G, Wunderink R *et al.* Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock. NORASEPT II Study Group. *Lancet* 1998; 351:929-933.
4. Agnew JE. Bronchiolar aerosol deposition and clearance. *Eur Respir J* 1996; 9:1118-1122.
5. Agouridakis P, Kyriakou D, Alexandrakis MG, Prekates A, Perisinakis K, Karkavitsas N *et al.* The predictive role of serum and bronchoalveolar lavage cytokines and adhesion molecules for acute respiratory distress syndrome development and outcome. *Respir Res* 2002; 3:25.
6. Ahrens RC, Ries RA, Popendorf W, Wiese JA. The delivery of therapeutic aerosols through endotracheal tubes. *Pediatr Pulmonol* 1986; 2:19-26.
7. Armstrong L, Millar AB. Relative production of tumour necrosis factor alpha and interleukin 10 in adult respiratory distress syndrome. *Thorax* 1997; 52:442-446.
8. Baldwin SR, Simon RH, Grum CM, Ketai LH, Boxer LA, Devall LJ. Oxidant activity in expired breath of patients with adult respiratory distress syndrome. *Lancet* 1986; 1:11-14.
9. Baran D, Dachy A, Klastersky J. Concentration of gentamicin in bronchial secretions of children with cystic fibrosis of tracheostomy. (Comparison between the intramuscular route, the endotracheal instillation and aerosolization). *Int J Clin Pharmacol Biopharm* 1975; 12:336-341.
10. Barsig J, Kusters S, Vogt K, Volk HD, Tiegs G, Wendel A. Lipopolysaccharide-induced interleukin-10 in mice: role of endogenous tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Immunol* 1995; 25:2888-2893.
11. Bauer TT, Monton C, Torres A, Cabello H, Fillela X, Maldonado A *et al.* Comparison of systemic cytokine levels in patients with acute respiratory distress syndrome, severe pneumonia, and controls. *Thorax* 2000; 55:46-52.

12. Berkman N, John M, Roesems G, Jose PJ, Barnes PJ, Chung KF. Inhibition of macrophage inflammatory protein-1 alpha expression by IL-10. Differential sensitivities in human blood monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol* 1995; 155:4412-4418.
13. Bernard, G. R., Wheeler, A. P., Naum, C. C., Morris, P. E., Nelson, L., Schein, R., Wright, P., Brigham, K. L., Russell, J., Paz, H., Baughman, R., Strond, M., Dupont, W., Higgins, S., and Jiang, K. A placebo controlled, randomized trial of IL-10 in acute lung injury (ALI). *Chest* 116[1 Suppl], 260S. 1999.

Ref Type: Abstract

14. Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med* 1991; 174:1549-1555.
15. Bonfield TL, Konstan MW, Burfeind P, Panuska JR, Hilliard JB, Berger M. Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 13:257-261.
16. Brain JD, Valberg PA. Deposition of aerosol in the respiratory tract. *Am Rev Respir Dis* 1979; 120:1325-1373.
17. Brower RG, Ware LB, Berthiaume Y, Matthay MA. Treatment of ARDS. *Chest* 2001; 120:1347-1367.
18. Buettner GR, Oberley LW. The production of hydroxyl radical by tallysomylin and copper(II). *FEBS Lett* 1979; 101:333-335.
19. Cameron D, Clay M, Silverman M. Evaluation of nebulizers for use in neonatal ventilator circuits. *Crit Care Med* 1990; 18:866-870.
20. Carp H, Miller F, Hoidal JR, Janoff A. Potential mechanism of emphysema: alpha 1-proteinase inhibitor recovered from lungs of cigarette smokers contains oxidized methionine and has decreased elastase inhibitory capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79:2041-2045.
21. Ceyhan BB, Sungur M, Celikel CA, Celikel T. Effect of inhaled cyclosporin on the rat airway: histologic and bronchoalveolar lavage assessment. *Respiration* 1998; 65:71-78.
22. Chang JC, Lesser M. Quantitation of leukocytes in bronchoalveolar lavage samples from rats after intravascular injection of endotoxin. *Am Rev Respir Dis* 1984; 129:72-75.
23. Chernoff AE, Granowitz EV, Shapiro L, Vannier E, Lonnemann G, Angel JB *et al.* A randomized, controlled trial of IL-10 in humans. Inhibition of

- inflammatory cytokine production and immune responses. *J Immunol* 1995; 154:5492-5499.
24. Coalson JJ, Hinshaw LB, Guenter CA. The pulmonary ultrastructure in septic shock. *Exp Mol Pathol* 1970; 12:84-103.
  25. Coates AL, MacNeish CF, Meisner D, Kelemen S, Thibert R, MacDonald J *et al.* The choice of jet nebulizer, nebulizing flow, and addition of albuterol affects the output of tobramycin aerosols. *Chest* 1997; 111:1206-1212.
  26. Cohen J, Carlet J. INTERSEPT: an international, multicenter, placebo-controlled trial of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor-alpha in patients with sepsis. International Sepsis Trial Study Group. *Crit Care Med* 1996; 24:1431-1440.
  27. Cooper JA, Jr., White DA, Matthay RA. Drug-induced pulmonary disease. Part 1: Cytotoxic drugs. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133:321-340.
  28. Cunha FQ, Moncada S, Liew FY. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 182:1155-1159.
  29. de Waal MR, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991; 174:1209-1220.
  30. de Waal MR, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te VA, Figdor C *et al.* Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 1991; 174:915-924.
  31. Debs RJ, Fuchs HJ, Philip R, Montgomery AB, Brunette EN, Liggitt D *et al.* Lung-specific delivery of cytokines induces sustained pulmonary and systemic immunomodulation in rats. *J Immunol* 1988; 140:3482-3488.
  32. Derkx B, Marchant A, Goldman M, Bijlmer R, van Deventer S. High levels of interleukin-10 during the initial phase of fulminant meningococcal septic shock. *J Infect Dis* 1995; 171:229-232.
  33. Diamond L, O'Donnell M. Pulmonary mechanics in normal rats. *J Appl Physiol : Respirat Environ Exercise Physiol* 1977; 43:942-948.
  34. Dickensheets HL, Freeman SL, Smith MF, Donnelly RP. Interleukin-10 upregulates tumor necrosis factor receptor type-II (p75) gene expression in endotoxin-stimulated human monocytes. *Blood* 1997; 90:4162-4171.

35. Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 1988; 141:2407-2412.
36. Donnelly SC, Strieter RM, Kunkel SL, Walz A, Robertson CR, Carter DC *et al.* Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at-risk patient groups. *Lancet* 1993; 341:643-647.
37. Donnelly SC, Strieter RM, Reid PT, Kunkel SL, Burdick MD, Armstrong I *et al.* The association between mortality rates and decreased concentrations of interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonist in the lung fluids of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Ann Intern Med* 1996; 125:191-196.
38. Dorger M, Allmeling AM, Neuber A, Behr J, Rambeck W, Krombach F. Interspecies comparison of rat and hamster alveolar macrophage antioxidative and oxidative capacity. *Environ Health Perspect* 1997; 105 Suppl 5:1309-1312.
39. Dreyfuss D, Soler P, Saumon G. Spontaneous resolution of pulmonary edema caused by short periods of cyclic overinflation. *J Appl Physiol* 1992; 72:2081-2089.
40. Drost E, Lannan S, Bridgeman MM, Brown D, Selby C, Donaldson K *et al.* Lack of effect of N-acetylcysteine on the release of oxygen radicals from neutrophils and alveolar macrophages. *Eur Respir J* 1991; 4:723-729.
41. Duedari N, George C, Cacitti AM, Sabatier C, Mannoni P, Rapin M. Platelet-associated IgG in septicemia. *N Engl J Med* 1979; 301:271-272.
42. Eaton S, Martin G. Clinical developments for treating ARDS. *Expert Opin Investig Drugs* 2002; 11:37-48.
43. Esbenshade AM, Newman JH, Lams PM, Jolles H, Brigham KL. Respiratory failure after endotoxin infusion in sheep: lung mechanics and lung fluid balance. *J Appl Physiol* 1982; 53:967-976.
44. Escofier N, Boichot E, Germain N, Silva PM, Martins MA, Lagente V. Effects of interleukin-10 and modulators of cyclic AMP formation on endotoxin-induced inflammation in rat lung. *Fundam Clin Pharmacol* 1999; 13:96-101.
45. Fantone JC, Ward PA. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol* 1982; 107:395-418.
46. Fennell KO, Creamer HR, Gabler WL, Brown AC, Bullock WW. Activated rat neutrophils. A sequential quantitative assay for aggregation and NBT

- reduction. *Inflammation* 1984; 8:287-300.
47. Ferron GA, Bierhuizen HW. The measurement of polydisperse aerosols with a spiral centrifuge. *J Aerosol Sci* 1976; 7:5-11.
  48. Ferron GA, Kreyling W, Haider B. Some physical properties of cobalt oxide aerosols used for lung retention studies. In Stoeber W, Jaenicke R (editors): *Aerosols in Science, Medicine and Technology (Proceedings of the 7th Annual Conference 1979 of the Association of Aerosol Research)*. Gesellschaft für Aerosol Forschung e.V., Mainz. 1979. pp. 163-168.
  49. Ferron GA, Kreyling WG, Haider B. Inhalation of salt aerosol particles - II. Growth and deposition in the human respiratory tract. *J Aerosol Sci* 1988;611-631.
  50. Finlay WH, Stapleton KW, Chan HK, Zuberbuhler P, Gonda I. Regional deposition of inhaled hygroscopic aerosols: in vivo SPECT compared with mathematical modeling. *J Appl Physiol* 1996; 81:374-383.
  51. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991; 147:3815-3822.
  52. Fisher CJ, Jr., Agosti JM, Opal SM, Lowry SF, Balk RA, Sadoff JC *et al.* Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *N Engl J Med* 1996; 334:1697-1702.
  53. Fisher CJ, Jr., Dhainaut JF, Opal SM, Pribble JP, Balk RA, Slotman GJ *et al.* Recombinant human interleukin 1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome. Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Phase III rhIL-1ra Sepsis Syndrome Study Group. *JAMA* 1994; 271:1836-1843.
  54. Flavin M, MacDonald M, Dolovich M, Coates G, O'Brodovich H. Aerosol delivery to the rabbit lung with an infant ventilator. *Pediatr Pulmonol* 1986; 2:35-39.
  55. Fok TF, Monkman S, Dolovich M, Gray S, Coates G, Paes B *et al.* Efficiency of aerosol medication delivery from a metered dose inhaler versus jet nebulizer in infants with bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulmonol* 1996; 21:301-309.
  56. Fowler AA, Hyers TM, Fisher BJ, Bechard DE, Centor RM, Webster RO. The adult respiratory distress syndrome. Cell populations and soluble mediators in the air spaces of patients at high risk. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136:1225-1231.

57. Fuchs AC, Granowitz EV, Shapiro L, Vannier E, Lonnemann G, Angel JB *et al.* Clinical, hematologic, and immunologic effects of interleukin-10 in humans. *J Clin Immunol* 1996; 16:291-303.
58. Fuchs NA, Sutugin AG. Generation and use of monodisperse aerosols. In C.N.Davies (editor): *Aerosol Science*. Academic Press, New York; 1966. pp. 1-30.
59. Fuller HD, Dolovich MB, Posmituck G, Pack WW, Newhouse MT. Pressurized aerosol versus jet aerosol delivery to mechanically ventilated patients. Comparison of dose to the lungs. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141:440-444.
60. Garber BG, Hebert PC, Yelle JD, Hodder RV, McGowan J. Adult respiratory distress syndrome: a systemic overview of incidence and risk factors. *Crit Care Med* 1996; 24:687-695.
61. Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol* 1992; 22:2501-2506.
62. Gazzinelli RT, Oswald IP, James SL, Sher A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *J Immunol* 1992; 148:1792-1796.
63. Geiser T. [Inflammatory cytokines and chemokines in acute inflammatory disease]. *Schweiz Med Wochenschr* 1999; 129:540-546.
64. Gerard C, Bruyins C, Marchant A, Abramowicz D, Vandenabeele P, Delvaux A *et al.* Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. *J Exp Med* 1993; 177:547-550.
65. Gerrity TR, Garrard CS, Yeates DB. Theoretic analysis of sites of aerosol deposition in the human lung. *Chest* 1981; 80:898-901.
66. Glenny, R. W. Manual for Using Fluorescent Microspheres to Measure Regional Organ Perfusion. Fluorescent Microsphere Resource Center, University of Washington Division of Pulmonary and Critical Care Medicine. <http://fmrc.pulmcc.washington.edu/> . 1999.

Ref Type: Electronic Citation

67. Glenny RW, Bernard S, Brinkley M. Validation of fluorescent-labeled microspheres for measurement of regional organ perfusion. *J Appl Physiol* 1993; 74:2585-2597.
68. Goldberg IS, Lourenco RV. Deposition of aerosols in pulmonary disease. *Arch*

- Intern Med* 1973; 131:88-91.
69. Goldman M, Velu T. Interleukin-10 and its implications for immunopathology. *Adv Nephrol Necker Hosp* 1995; 24:79-90.
  70. Gomez-Jimenez J, Martin MC, Sauri R, Segura RM, Esteban F, Ruiz JC *et al.* Interleukin-10 and the monocyte/macrophage-induced inflammatory response in septic shock. *J Infect Dis* 1995; 171:472-475.
  71. Goodman ML, Way BA, Irwin JW. The inflammatory response to endotoxin. *J Pathol* 1979; 128:7-14.
  72. Goodwin BJ, Weinberg JB. Receptor-mediated modulation of human monocyte, neutrophil, lymphocyte, and platelet function by phorbol diesters. *J Clin Invest* 1982; 70:699-706.
  73. Graham R, Skoog C, Oppenheimer L, Rabson J, Goldberg HS. Critical Closure in the Canine Pulmonary Vasculature. *Circulation Research* 1982;566-572.
  74. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126:131-138.
  75. Gross NJ. Pulmonary effects of radiation therapy. *Ann Intern Med* 1977; 86:81-92.
  76. Gryglewski RJ, Wolkow PP, Uracz W, Janowska E, Bartus JB, Balbatun O *et al.* Protective role of pulmonary nitric oxide in the acute phase of endotoxemia in rats. *Circ Res* 1998; 82:819-827.
  77. Guo H, Jin YX, Ishikawa M, Huang YM, van der Meide PH, Link H *et al.* Regulation of beta-chemokine mRNA expression in adult rat astrocytes by lipopolysaccharide, proinflammatory and immunoregulatory cytokines. *Scand J Immunol* 1998; 48:502-508.
  78. Hart PH, Hunt EK, Bonder CS, Watson CJ, Finlay-Jones JJ. Regulation of surface and soluble TNF receptor expression on human monocytes and synovial fluid macrophages by IL-4 and IL-10. *J Immunol* 1996; 157:3672-3680.
  79. Hess D, Fisher D, Williams P, Pooler S, Kacmarek RM. Medication nebulizer performance. Effects of diluent volume, nebulizer flow, and nebulizer brand. *Chest* 1996; 110:498-505.
  80. Heyder J. Mechanisms of aerosol particle deposition. *Chest* 1981; 80:820-823.
  81. Hofmann W. Modeling techniques for inhaled particle deposition: the state of the art. *J Aerosol Med* 1996; 9:369-388.

82. Holman RG, Maier RV. Superoxide production by neutrophils in a model of adult respiratory distress syndrome. *Arch Surg* 1988; 123:1491-1495.
83. Howard M, Muchamuel T, Andrade S, Menon S. Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. *J Exp Med* 1993; 177:1205-1208.
84. Hudson LD, Milberg JA, Anardi D, Maunder RJ. Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151:293-301.
85. Hudson LD, Steinberg KP. Epidemiology of acute lung injury and ARDS. *Chest* 1999; 116:74S-82S.
86. Huhn RD, Radwanski E, O'Connell SM, Sturgill MG, Clarke L, Cody RP *et al.* Pharmacokinetics and immunomodulatory properties of intravenously administered recombinant human interleukin-10 in healthy volunteers. *Blood* 1996; 87:699-705.
87. Hyers TM, Tricomi SM, Dettenmeier PA, Fowler AA. Tumor necrosis factor levels in serum and bronchoalveolar lavage fluid of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144:268-271.
88. Inoue G. Effect of interleukin-10 (IL-10) on experimental LPS-induced acute lung injury. *J Infect Chemother* 2000; 6:51-60.
89. Ip AY, Arakawa T, Silvers H, Ransone CM, Niven RW. Stability of recombinant consensus interferon to air-jet and ultrasonic nebulization. *J Pharm Sci* 1995; 84:1210-1214.
90. Jenkins JK, Malyak M, Arend WP. The effects of interleukin-10 on interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta production in human monocytes and neutrophils. *Lymphokine Cytokine Res* 1994; 13:47-54.
91. John M, Lim S, Seybold J, Jose P, Robichaud A, O'Connor B *et al.* Inhaled corticosteroids increase interleukin-10 but reduce macrophage inflammatory protein-1alpha, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interferon-gamma release from alveolar macrophages in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:256-262.
92. Johnson KJ, Ward PA. Acute and progressive lung injury after contact with phorbol myristate acetate. *Am J Pathol* 1982; 107:29-35.
93. Joyce DA, Gibbons DP, Green P, Steer JH, Feldmann M, Brennan FM. Two inhibitors of pro-inflammatory cytokine release, interleukin-10 and interleukin-4, have contrasting effects on release of soluble p75 tumor necrosis factor receptor by cultured monocytes. *Eur J Immunol* 1994; 24:2699-2705.



94. Kabir K, Gelinas JP, Chen M, Chen D, Zhang D, Luo X *et al.* Characterization of a murine model of endotoxin-induced acute lung injury. *Shock* 2002; 17:300-303.
95. Kasai T, Inada K, Takakuwa T, Yamada Y, Inoue Y, Shimamura T *et al.* Anti-inflammatory cytokine levels in patients with septic shock. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1997; 98:34-42.
96. Kasama T, Strieter RM, Lukacs NW, Burdick MD, Kunkel SL. Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10. *J Immunol* 1994; 152:3559-3569.
97. Kemming GI, Kreyling W, Habler O, Merkel M, Kleen M, Welte M *et al.* Aerosol production and aerosol droplet size distribution during mechanical ventilation (IPPV) with a new ultrasonic nebulizer. *Eur J Med Res* 1996; 1:321-327.
98. Klebanoff SJ. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann Intern Med* 1980; 93:480-489.
99. Kobayashi A, Hashimoto S, Kooguchi K, Kitamura Y, Onodera H, Urata Y *et al.* Expression of inducible nitric oxide synthase and inflammatory cytokines in alveolar macrophages of ARDS following sepsis. *Chest* 1998; 113:1632-1639.
100. Komara JJ, Jr., Perez-Trepichio P, Wiedemann HP. Systemic pharmacologic therapy of ARDS. *Respir Care Clin N Am* 1998; 4:739-750.
101. Kreyling WG, Blanchard JD, Godleski JJ, Haeussermann S, Heyder J, Hutzler P *et al.* Anatomic localization of 24- and 96-h particle retention in canine airways. *J Appl Physiol* 1999; 87:269-284.
102. Kumar A, Zanotti S, Bunnell G, Habet K, Anel R, Neumann A *et al.* Interleukin-10 blunts the human inflammatory response to lipopolysaccharide without affecting the cardiovascular response. *Crit Care Med* 2005; 33:331-340.
103. Lehmann AK, Halstensen A, Sornes S, Rokke O, Waage A. High levels of interleukin 10 in serum are associated with fatality in meningococcal disease. *Infect Immun* 1995; 63:2109-2112.
104. Lewandowski K. Epidemiologie und Pathophysiologie des akuten Lungenversagens. *Intensivmed* 2001; 38:426-436.
105. Li WZ, Chen WM, Kobayashi T. Aerosolized surfactant reverses respiratory failure in lung-lavaged rats. *Acta Anaesthesiol Scand* 1994; 38:82-88.
106. Li XY, Donaldson K, MacNee W. Lipopolysaccharide-induced alveolar epithelial permeability: the role of nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;

- 157:1027-1033.
107. Liaudet L, Soriano FG, Szabo C. Biology of nitric oxide signaling. *Crit Care Med* 2000; 28:N37-N52.
  108. Lippmann M, Albert RE, Peterson HT, Jr. The regional deposition of inhaled aerosols in man. *Inhaled Part* 1970; 1:105-122.
  109. Lizio R, Marx D, Nolte T, Lehr CM, Sarlikiotis AW, Borchard G *et al.* Development of a new aerosol delivery system for systemic pulmonary delivery in anaesthetized and orotracheal intubated rats. *Lab Anim* 2001; 35:261-270.
  110. MacIntyre NR, Silver RM, Miller CW, Schuler F, Coleman RE. Aerosol delivery in intubated, mechanically ventilated patients. *Crit Care Med* 1985; 13:81-84.
  111. MacNeish CF, Meisner D, Thibert R, Kelemen S, Vadas EB, Coates AL. A comparison of pulmonary availability between Ventolin (albuterol) nebulas and Ventolin (albuterol) Respirator Solution. *Chest* 1997; 111:204-208.
  112. Magnan A, van Pee D, Bongrand P, Vervloet D. Alveolar macrophage interleukin (IL)-10 and IL-12 production in atopic asthma. *Allergy* 1998; 53:1092-1095.
  113. Marchant A, Bruyns C, Vandenabeele P, Ducarme M, Gerard C, Delvaux A *et al.* Interleukin-10 controls interferon-gamma and tumor necrosis factor production during experimental endotoxemia. *Eur J Immunol* 1994; 24:1167-1171.
  114. Marchant A, Deviere J, Byl B, De Groote D, Vincent JL, Goldman M. Interleukin-10 production during septicaemia. *Lancet* 1994; 343:707-708.
  115. Marfaing-Koka A, Maravic M, Humbert M, Galanaud P, Emilie D. Contrasting effects of IL-4, IL-10 and corticosteroids on RANTES production by human monocytes. *Int Immunol* 1996; 8:1587-1594.
  116. Martin TR. Lung cytokines and ARDS: Roger S. Mitchell Lecture. *Chest* 1999; 116:2S-8S.
  117. Martonen TB, Graham RC, Hofmann W. Human subject age and activity level: factors addressed in a biomathematical deposition program for extrapolation modeling. *Health Phys* 1989; 57 Suppl 1:49-59.
  118. Matamis D, Lemaire F, Harf A, Brun-Buisson C, Ansquer JC, Atlan G. Total respiratory pressure-volume curves in the adult respiratory distress syndrome. *Chest* 1984; 86:58-66.

119. Matute-Bello G, Liles WC, Radella F, Steinberg KP, Ruzinski JT, Jonas M *et al.* Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:1969-1977.
120. McGuire GM, Liu P, Jaeschke H. Neutrophil-induced lung damage after hepatic ischemia and endotoxemia. *Free Radic Biol Med* 1996; 20:189-197.
121. Meduri GU. The role of the host defence response in the progression and outcome of ARDS: pathophysiological correlations and response to glucocorticoid treatment. *Eur Respir J* 1996; 9:2650-2670.
122. Morrow PE. An evaluation of the physical properties of monodisperse and heterodisperse aerosols used in the assessment of bronchial function. *Chest* 1981; 80:809-813.
123. Mosmann TR. Properties and functions of interleukin-10. *Adv Immunol* 1994; 56:1-26.
124. Muers MF. Overview of nebuliser treatment. *Thorax* 1997; 52 Suppl 2:S25-S30.
125. Mulligan MS, Warner RL, Foreback JL, Shanley TP, Ward PA. Protective effects of IL-4, IL-10, IL-12, and IL-13 in IgG immune complex-induced lung injury: role of endogenous IL-12. *J Immunol* 1997; 159:3483-3489.
126. Murakami K, Okajima K, Uchiba M. The prevention of lipopolysaccharide-induced pulmonary vascular injury by pretreatment with cepharanthine in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:57-63.
127. Mustafa MG, Tierney DF. Biochemical and metabolic changes in the lung with oxygen, ozone, and nitrogen dioxide toxicity. *Am Rev Respir Dis* 1978; 118:1061-1090.
128. Naeije R, Lejeune P, Leemann M, Melot C, Deloof T. Pulmonary arterial pressure-flow plots in dogs: effects of isoflurane and nitroprusside. *Journal of Applied Physiology* 1987; 63:969-977.
129. Neame PB, Kelton JG, Walker IR, Stewart IO, Nossel HL, Hirsh J. Thrombocytopenia in septicemia: the role of disseminated intravascular coagulation. *Blood* 1980; 56:88-92.
130. Neidhardt R, Keel M, Steckholzer U, Safret A, Ungethuem U, Trentz O *et al.* Relationship of interleukin-10 plasma levels to severity of injury and clinical outcome in injured patients. *J Trauma* 1997; 42:863-870.
131. Newman SP. Aerosol deposition considerations in inhalation therapy. *Chest* 1985; 88:152S-160S.

132. O'Callaghan C, Barry PW. The science of nebulised drug delivery. *Thorax* 1997; 52 Suppl 2:S31-S44.
133. O'Doherty MJ, Thomas SH, Page CJ, Treacher DF, Nunan TO. Delivery of a nebulized aerosol to a lung model during mechanical ventilation. Effect of ventilator settings and nebulizer type, position, and volume of fill. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146:383-388.
134. O'Garra A, Stapleton G, Dhar V, Pearce M, Schumacher J, Rugo H *et al.* Production of cytokines by mouse B cells: B lymphomas and normal B cells produce interleukin 10. *Int Immunol* 1990; 2:821-832.
135. Obot CJ, Morandi MT, Beebe TP, Hamilton RF, Holian A. Surface components of airborne particulate matter induce macrophage apoptosis through scavenger receptors. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; 184:98-106.
136. Oh-ishi S, Ishida H, Ueno A. Role of synergistic action of PAF and kinin in bacterial endotoxin-induced hypotension in rats. *Adv Exp Med Biol* 1996; 416:235-238.
137. Oppenheimer L, Hryniuk WM, Bishop AJ. Thrombocytopenia in severe bacterial infections. *J Surg Res* 1976; 20:211-214.
138. Osier M, Oberdorster G. Intratracheal inhalation vs intratracheal instillation: differences in particle effects. *Fundam Appl Toxicol* 1997; 40:220-227.
139. Parsons PE, Moss M, Vannice JL, Moore EE, Moore FA, Repine JE. Circulating IL-1ra and IL-10 levels are increased but do not predict the development of acute respiratory distress syndrome in at-risk patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:1469-1473.
140. Perretti M, Szabo C, Thiemermann C. Effect of interleukin-4 and interleukin-10 on leucocyte migration and nitric oxide production in the mouse. *Br J Pharmacol* 1995; 116:2251-2257.
141. Persons DD, Hess GD, Muller WJ, Scherer PW. Airway deposition of hygroscopic heterodispersed aerosols: results of a computer calculation. *J Appl Physiol* 1987; 63:1195-1204.
142. Phipps PR, Gonda I. Droplets produced by medical nebulizers. Some factors affecting their size and solute concentration. *Chest* 1990; 97:1327-1332.
143. Pick E, Keisari Y. Superoxide anion and hydrogen peroxide production by chemically elicited peritoneal macrophages--induction by multiple nonphagocytic stimuli. *Cell Immunol* 1981; 59:301-318.
144. Pick E, Mizel D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and

- hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J Immunol Methods* 1981; 46:211-226.
145. Pietra GG, Szidon JP, Carpenter HA, Fishman AP. Bronchial venular leakage during endotoxin shock. *Am J Pathol* 1974; 77:387-406.
  146. Pinkerton KE, Gallen JT, Mercer RR, Wong VC, Plopper CG, Tarkington BK. Aerosolized fluorescent microspheres detected in the lung using confocal scanning laser microscopy. *Microsc Res Tech* 1993; 26:437-443.
  147. Pradier O, Gerard C, Delvaux A, Lybin M, Abramowicz D, Capel P *et al.* Interleukin-10 inhibits the induction of monocyte procoagulant activity by bacterial lipopolysaccharide. *Eur J Immunol* 1993; 23:2700-2703.
  148. Prin L, Charon J, Capron M, Gosset P, Taelman H, Tonnel AB *et al.* Heterogeneity of human eosinophils. II. Variability of respiratory burst activity related to cell density. *Clin Exp Immunol* 1984; 57:735-742.
  149. Pugin J, Verghese G, Widmer MC, Matthay MA. The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 1999; 27:304-312.
  150. Raab OG, Yeh HC, Newton GJ, Phalen RF, Velasquez DJ. Deposition of inhaled monodisperse aerosols in small rodents. *Inhaled Part* 1975; 4 Pt 1:3-21.
  151. Radi R, Turrens JF, Freeman BA. Cytochrome c-catalyzed membrane lipid peroxidation by hydrogen peroxide. *Arch Biochem Biophys* 1991; 288:118-125.
  152. Raeburn D, Underwood SL, Villamil ME. Techniques for drug delivery to the airways, and the assessment of lung function in animal models. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1992; 27:143-159.
  153. Riedler GF, Straub PW, Frick PG. Thrombocytopenia in septicemia. A clinical study for the evaluation of its incidence and diagnostic value. *Helv Med Acta* 1971; 36:23-38.
  154. Riedler J, Robertson CF. Effect of tidal volume on the output and particle size distribution of hypertonic saline from an ultrasonic nebulizer. *Eur Respir J* 1994; 7:998-1002.
  155. Rinaldo JE, Dauber JH, Christman J, Rogers RM. Neutrophil alveolitis following endotoxemia. Enhancement by previous exposure to hyperoxia. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130:1065-1071.
  156. Robertson HT, Glenny RW, Stanford D, McInnes LM, Luchtel DL, Covert D. High-resolution maps of regional ventilation utilizing inhaled fluorescent microspheres. *J Appl Physiol* 1997; 82:943-953.

157. Rubbo H, Darley-USmar V, Freeman BA. Nitric oxide regulation of tissue free radical injury. *Chem Res Toxicol* 1996; 9:809-820.
158. Ruetten H, Thiernemann C. Interleukin-13 is a more potent inhibitor of the expression of inducible nitric oxide synthase in smooth muscle cells than in macrophages: a comparison with interleukin-4 and interleukin-10. *Shock* 1997; 8:409-414.
159. Sagawa K, Mochizuki M, Sugita S, Nagai K, Sudo T, Itoh K. Suppression by IL-10 and IL-4 of cytokine production induced by two-way autologous mixed lymphocyte reaction. *Cytokine* 1996; 8:501-506.
160. Scheuch G, Stahlhofen W. Deposition and dispersion of aerosols in the airways of the human respiratory tract: the effect of particle size. *Exp Lung Res* 1992; 18:343-358.
161. Schlesinger RB. Comparative deposition of inhaled aerosols in experimental animals and humans: a review. *J Toxicol Environ Health* 1985; 15:197-214.
162. Schneider RC, Zapol WM, Carvalho AC. Platelet consumption and sequestration in severe acute respiratory failure. *Am Rev Respir Dis* 1980; 122:445-451.
163. Schuster DP, Kollef MH. Acute respiratory distress syndrome. *Dis Mon* 1996; 42:270-326.
164. Seki H, Imamura M. The oxidation of ferrocyanochrome c by Br<sub>2</sub><sup>-</sup>, (SCN)<sub>2</sub><sup>-</sup>, N<sub>3</sub> and OH radicals studied by pulsed-electron and gamma-ray radiolysis. *Biochim Biophys Acta* 1981; 635:81-89.
165. Shasby DM, Vanbenthuyzen KM, Tate RM, Shasby SS, McMurtry I, Repine JE. Granulocytes mediate acute edematous lung injury in rabbits and in isolated rabbit lungs perfused with phorbol myristate acetate: role of oxygen radicals. *Am Rev Respir Dis* 1982; 125:443-447.
166. Sheng WS, Hu S, Kravitz FH, Peterson PK, Chao CC. Tumor necrosis factor alpha upregulates human microglial cell production of interleukin-10 in vitro. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995; 2:604-608.
167. Sherry RM, Cue JI, Goddard JK, Parramore JB, DiPiro JT. Interleukin-10 is associated with the development of sepsis in trauma patients. *J Trauma* 1996; 40:613-616.
168. Sheu JR, Hung WC, Wu CH, Ma MC, Kan YC, Lin CH *et al.* Reduction in lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia by triflavin in a rat model of septicemia. *Circulation* 1999; 99:3056-3062.

169. Siler TM, Swierkosz JE, Hyers TM, Fowler AA, Webster RO. Immunoreactive interleukin-1 in bronchoalveolar lavage fluid of high-risk patients and patients with the adult respiratory distress syndrome. *Exp Lung Res* 1989; 15:881-894.
170. Simons RK, Maier RV, Chi EY. Pulmonary effects of continuous endotoxin infusion in the rat. *Circ Shock* 1991; 33:233-243.
171. Smith PK, Krohn GT, Hermanson GT, Mallia AK, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150:76-85.
172. Stahlhofen W, Gebhart J, Heyder J. Biological variability of regional deposition of aerosol particles in the human respiratory tract. *Am Ind Hyg Assoc J* 1981; 42:348-352.
173. Stahlhofen W, Gebhart J, Heyder J, Philipson K, Camner P. Intercomparison of regional deposition of aerosol particles in the human respiratory tract and their long-term elimination. *Exp Lung Res* 1981; 2:131-139.
174. Stevenson HC, Bonvini E, Favilla T, Miller P, Akiyama Y, Hoffman T *et al.* Characterization of purified cryopreserved human monocyte function in assays of superoxide production, accessory cell function, chemotaxis, and in fluorescent cell sorter analysis. *J Leukoc Biol* 1984; 36:521-531.
175. Stoeber W, Flachsbarth H. Size-Separating Precipitation of Aerosols in a Spinning Spiral Duct. *Environ Sci Technol* 1969; 3:1280-1296.
176. Strom KA, Johnson JT, Chan TL. Retention and clearance of inhaled submicron carbon black particles. *J Toxicol Environ Health* 1989; 26:183-202.
177. Stuehr DJ, Marletta MA. Synthesis of nitrite and nitrate in murine macrophage cell lines. *Cancer Res* 1987; 47:5590-5594.
178. Suchyta MR, Grissom CK, Morris AH. Epidemiology in ARDS. *Intensive Care Med* 1999; 25:538-539.
179. Sung CP, Mirabelli CK, Badger AM. Effect of gold compounds on phorbol myristic acetate (PMA) activated superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) production by mouse peritoneal macrophages. *J Rheumatol* 1984; 11:153-157.
180. Suter PM, Ricou B. Cytokines and Lung Injury. In Marini JJ, Evans TW (editors): *Acute Lung Injury*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag; 1998. pp. 41-53.
181. Suter PM, Suter S, Girardin E, Roux-Lombard P, Grau GE, Dayer JM. High bronchoalveolar levels of tumor necrosis factor and its inhibitors, interleukin-1, interferon, and elastase, in patients with adult respiratory distress syndrome after trauma, shock, or sepsis. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145:1016-

- 1022.
182. Svartengren M, Falk R, Linnman L, Philipson K, Camner P. Deposition of large particles in human lung. *Exp Lung Res* 1987; 12:75-88.
  183. Svartengren M, Linnman L, Philipson K, Camner P. Regional deposition in human lung of 2.5 microM particles. *Exp Lung Res* 1987; 12:265-279.
  184. Svartengren M, Philipson K, Linnman L, Camner P. Airway resistance and deposition of particles in the lung. *Exp Lung Res* 1984; 7:257-269.
  185. Svartengren M, Skogward P, Nerbrink O, Dahlback M. Regional deposition of inhaled Evans blue dye in mechanically ventilated rabbits with air or helium oxygen mixture. *Exp Lung Res* 1998; 24:159-172.
  186. Sweeney TD, Brain JD, LeMott S. Anesthesia alters the pattern of aerosol retention in hamsters. *J Appl Physiol* 1983; 54:37-44.
  187. Swift DL. Aerosol characterization and generation. In Morén F, Dolovich MB, Newhouse MT, Newman SP (editors): *Aerosols in Medicine. Principles, Diagnosis and Therapy*. Elsevier Science Publishers B.V.; 1993. pp. 61-83.
  188. Szczeklik A, Mastalerz L, Nizankowska E, Cmiel A. Protective and Broncodilator Effects of Prostaglandin E and Salbutamol in Aspirin-induced Asthma. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine* 1996; 153:567-571.
  189. Takala A, Jousela I, Takkunen O, Kautiainen H, Jansson SE, Orpana A *et al*. A prospective study of inflammation markers in patients at risk of indirect acute lung injury. *Shock* 2002; 17:252-257.
  190. Tarnell EB, Oliver BL, Johnson GM, Watts FL, Thrall RS. Superoxide anion production by rat neutrophils at various stages of bleomycin-induced lung injury. *Lung* 1992; 170:41-50.
  191. Terzano C, Guerra S, Allegra L. Effectiveness of beclomethasone dipropionate aerosolized through different nebulizers to asthmatic patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2001; 5:43-51.
  192. Thein E, Raab S, Harris AG, Messmer K. Automation of the use of fluorescent microspheres for the determination of blood flow. *Comp Meth Prog Biomed* 2000; 61:11-21.
  193. Thomas SH, O'Doherty MJ, Fidler HM, Page CJ, Treacher DF, Nunan TO. Pulmonary deposition of a nebulised aerosol during mechanical ventilation. *Thorax* 1993; 48:154-159.
  194. Thomassen MJ, Divis LT, Fisher CJ. Regulation of human alveolar



- macrophage inflammatory cytokine production by interleukin-10. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; 80:321-324.
195. Thomson L, Trujillo M, Telleri R, Radi R. Kinetics of cytochrome c<sup>2+</sup> oxidation by peroxynitrite: implications for superoxide measurements in nitric oxide-producing biological systems. *Arch Biochem Biophys* 1995; 319:491-497.
  196. van der Vliet A, Cross CE. Oxidants, nitrosants, and the lung. *Am J Med* 2000; 109:398-421.
  197. van Epps DE, Chenoweth DE. Analysis of the binding of fluorescent C5a and C3a to human peripheral blood leukocytes. *J Immunol* 1984; 132:2862-2867.
  198. VanOtteren GM, Strieter RM, Kunkel SL, Paine R, III, Greenberger MJ, Danforth JM *et al.* Compartmentalized expression of RANTES in a murine model of endotoxemia. *J Immunol* 1995; 154:1900-1908.
  199. Wang P, Wu P, Anthes JC, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. Interleukin-10 inhibits interleukin-8 production in human neutrophils. *Blood* 1994; 83:2678-2683.
  200. Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. IL-10 inhibits transcription of cytokine genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 1994; 153:811-816.
  201. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000; 342:1334-1349.
  202. Warner RL, Paine R, III, Christensen PJ, Marletta MA, Richards MK, Wilcoxon SE *et al.* Lung sources and cytokine requirements for in vivo expression of inducible nitric oxide synthase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 12:649-661.
  203. Watts FL, Oliver BL, Johnson GM, Thrall RS. Superoxide production by rat neutrophils in the oleic acid model of lung injury. *Free Radic Biol Med* 1990; 9:327-332.
  204. Webb HH, Tierney DF. Experimental pulmonary edema due to intermittent positive pressure ventilation with high inflation pressures. Protection by positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis* 1974; 110:556-565.
  205. Weiland JE, Davis WB, Holter JF, Mohammed JR, Dorinsky PM, Gadek JE. Lung neutrophils in the adult respiratory distress syndrome. Clinical and pathophysiologic significance. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133:218-225.
  206. Weinberg JB, Haney AF. Spontaneous tumor cell killing by human blood monocytes and human peritoneal macrophages: lack of alteration by endotoxin or quenchers of reactive oxygen species. *J Natl Cancer Inst* 1983;

- 70:1005-1010.
207. Wigley FW, Londono JH, Wood SH, Shipp JC, Waldman RH. Insulin across respiratory mucosae by aerosol delivery. *Diabetes* 1971; 20:552-556.
  208. Winsel K, Bergmann KC, Lachmann B. [Ultrasonic atomization of surface-active agents from lung tissue and lecithin dispersions with reference to the artificial spraying of lungs]. *Z Erkr Atmungsorgane* 1974; 140:151-158.
  209. Wizemann TM, Laskin DL. Enhanced phagocytosis, chemotaxis, and production of reactive oxygen intermediates by interstitial lung macrophages following acute endotoxemia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 11:358-365.
  210. Xie Q, Nathan C. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *J Leukoc Biol* 1994; 56:576-582.
  211. Xing Z, Jordana M, Kirpalani H, Driscoll KE, Schall TJ, Gauldie J. Cytokine expression by neutrophils and macrophages in vivo: endotoxin induces tumor necrosis factor-alpha, macrophage inflammatory protein-2, interleukin-1 beta, and interleukin-6 but not RANTES or transforming growth factor-beta 1 mRNA expression in acute lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 10:148-153.
  212. Yssel H, de Waal MR, Roncarolo MG, Abrams JS, Lahesmaa R, Spits H *et al.* IL-10 is produced by subsets of human CD4+ T cell clones and peripheral blood T cells. *J Immunol* 1992; 149:2378-2384.
  213. Yu CP, Diu CK. A comparative study of aerosol deposition in different lung models. *Am Ind Hyg Assoc J* 1982; 43:54-65.
  214. Yun JK, McCormick TS, Villabona C, Judware RR, Espinosa MB, Lapetina EG. Inflammatory mediators are perpetuated in macrophages resistant to apoptosis induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:13903-13908.

## Danksagung

Nach Abschluss der Arbeit gilt mein besonderer Dank:

Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Meßmer für die Aufnahme am Institut für Chirurgische Forschung und seine Unterstützung über die Bearbeitung des Dissertationsthemas hinaus.

Herrn Professor Dr. med. B. Zwißler für die Überlassung des Themas, sein ständiges Interesse an der Arbeit sowie seine persönliche Unterstützung meiner weiteren Ausbildung und Arbeit.

Herrn Dr. med. C. Hofstetter und Herrn Dr. med. M. Flondor für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und ihren hohen persönlichen Einsatz bei der Durchführung der Versuche. Unter ihrer Anleitung erlernte ich die Prinzipien wissenschaftlicher Arbeit. Sie weckten und förderten mein Interesse an der experimentellen Medizin. Besonders wird mir die respektvolle und freundschaftliche Zusammenarbeit in Erinnerung bleiben.

Frau A.-M. Allmeling für ihre engagierte Anleitung bei Laborarbeiten. Ihre aktive Mithilfe und ihre kompetenten fachlichen Ratschläge haben wesentlich zum Erfolg der Arbeit beigetragen.

Herrn Dr. med. G. Kemming, der Arbeitsgruppe experimentelle Anästhesie sowie allen Mitarbeitern des Instituts für Chirurgische Forschung für ihre Kollegialität und Hilfsbereitschaft.

Nicht zuletzt meinen Eltern für den Rückhalt in der Familie und die fortwährende Unterstützung, nicht nur im Rahmen meiner Dissertation.

## Lebenslauf

### Sandra Kristina Högl

|                              |                                |   |
|------------------------------|--------------------------------|---|
| <b>Persönliche Angaben:</b>  | Familienstand:                 | ledig   |
|                              | Staatsangehörigkeit:           | deutsch   |
|                              | Geburtstag:                    | 28.02.1979  |
|                              | Geburtsort:                    | München   |
|                              | Eltern:                        | Dr. Leonhard Högl, Brigitta Kristian-Högl   |
| <b>Schulbildung:</b>         | 1985 - 1989                    | Grundschule an der<br>Knappertsbuschstrasse, München  |
|                              | 1989 - 1998                    | Luitpold-Gymnasium, München   |
| <b>Schulabschluss:</b>       | 1998                           | Allgemeine Hochschulreife   |
| <b>Studium:</b>              | 1998 - 2005                    | Studium der Humanmedizin an der<br>Ludwig-Maximilians-Universität,<br>München                               |
|                              | August 2000                    | Ärztliche Vorprüfung  |
|                              | August 2001                    | Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung   |
|                              | September 2003                 | Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  |
|                              | Oktober 2003 –<br>Februar 2004 | Forschungsaufenthalt an der Klinik für<br>Anästhesiologie der J. W. Goethe<br>Universität, Frankfurt / Main |
| <b>Praktisches Jahr:</b>     | Chirurgie                      | Hospital San Cecilio, Universität von<br>Granada, Spanien   |
|                              | Anästhesiologie                | Klinikum Großhadern, LMU, München<br>University Medical Center, Universität von<br>Arizona, Tucson, USA     |
|                              | Innere Medizin:                | Städtisches Lehrkrankenhaus München-<br>Harlaching  |
| <b>Studienabschluss:</b>     | Mai 2005                       | Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  |
| <b>Berufliche Tätigkeit:</b> | Seit Juli 2005                 | Ärztin an der Klinik für Anästhesiologie<br>der J. W. Goethe Universität,<br>Frankfurt / Main               |