Aus dem Institut für Chirurgische Forschung der
Universität München
ehemaliger Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Meßmer
jetziger Vorstand: Prof. Dr. A. Baethmann

Einfluß der Konservierungszeit auf die Konzentration mehrfach ungesättigter Fettsäuren in Erythrozytenkonzentraten: Implikationen für die Entwicklung des endotoxin-induzierten akuten Lungenschadens *in vivo*

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

vorgelegt von
Martin E. Eichhorn
aus München
2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr.med. Dr. h.c. mult. K. Meßmer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. P.C. Weber
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Dr. h.c. W. Schramm
	PD Dr. S. Fischer
Mitbetreuung durch die	
Promovierten Mitarbeiter:	PD Dr.med. A.E. Goetz
	Dr. med. L. Ney
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	16.01.2003

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

I.	**Einleitung**	**1**
1.	Vorbemerkung	1
2.	Pathophysiologie des akuten Lungenschadens	2
3.	Konzept des „Primings“	3
4.	Primingeffekt durch mehrfach ungesättigte freie Fettsäuren	6
5.	Fragestellung und Zielsetzung	10
II.	**Methodik**	**11**
1.	Studie I: Untersuchung der Erythrozytenkonzentrate	11
1.1	Gewinnung und Aufarbeitung der Erythrozytenkonzentrate	11
1.2	Gaschromatographische Analyse der freien Fettsäuren	11
1.3	Sauerstoffradikalproduktion durch Granulozyten	14
2.	Studien II-IV: Tierexperimentelle Untersuchungen	15
2.1	Versuchstiere	15
2.2	Anästhesie und Beatmung	15
2.3	Messung makrohämodynamischer Parameter	16
2.4	Thoraxfenster	18
2.5	Fluoreszenzmarkierung autologer Blutzellen	19
2.5.1	Ex-Vivo Markierung von Erythrozyten mit FITC	19
2.5.2	In vivo Markierung der Leukozyten mit Rhodamin 6G	20
2.5.3	Ex vivo Fluoreszenzmarkierung autologer Thrombozyten	20
2.6	Video-Fluoreszenzmikroskopie	22
2.6.1	Experimenteller Aufbau	22
2.6.2	Differenzierung der fluoreszenzmarkierten Zellen	25
2.6.3	Atemzyklus und Mikroskopierareal	26
2.7	Lipopolysacharid	26
2.8	Arachidonsäure	27
2.9	Bestimmung von Triglyceriden und Arachidonsäure im Plasma	28
2.10	Bestimmung der Thromboxan B_2 Konzentration im Plasma	28
2.10.1	Aufarbeitung der Plasmaproben	28

2.10.2	Enzym Immunoassay	30
2.11	Myeloperoxidase-Assay	30
2.11.1	Isolierung der Myeloperoxidase	31
2.11.2	Messung der MPO-Aktivität	31
2.12	Lichtmikroskopische Untersuchung	32
2.13	Quantifizierte Parameter	33
2.13.1	Makrohämodynamik und pulmonalvaskulärer Widerstand	33
2.13.2	Blutgasanalyse und peripheres Blutbild:	34
2.13.3	Intravitalmikroskopische Parameter	35
2.13.3.1	Off-line Analyse am Monitor	35
2.13.3.2	Gefäßdurchmesser	36
2.13.3.3	Mittlere Erythrozytenfließgeschwindigkeit	36
2.13.3.4	Blutvolumenfluß und Wandscherrate	37
2.13.3.5	Anzahl Endothel-adhärenter Leukozyten	38
2.13.3.6	Thrombozytenfließgeschwindigkeit in Arteriolen und Venolen	38
2.13.3.7	Fläche des Alveolarareals, Länge der perfundierten Kapillarstrecke	39
2.13.3.8	Kapillarer Perfusions-Index (CPI)	39
2.13.3.9	Erythrozytenfließgeschwindigkeit in Kapillaren	40
2.13.3.10	Anzahl in Alveolarkapillaren permanent retinierter Leukozyten	40
2.13.3.11	Thrombozytenfließgeschwindigkeit- und Retention in Alveolarkapillaren	40
2.13.3.12	Alveolarseptenbreite	41
2.14	Einschlußkriterien	41
2.15	Vorversuche	42
2.15.1	Dosisfindung der Endotoxinkonzentration	42
2.15.2	Infusion der Arachidonsäure	42
2.16	Experimentelle Protokolle	44
2.16.1	Studie II	44
2.16.2	Studie III	45
2.16.3	Studie IV	47
2.17	Datenverarbeitung und Statistik	48

III.	**Ergebnisse**	**49**
1.	Studie I: Untersuchung der Erythrozytenkonzentrate	49
1.1	Fettsäuregehalt in Erythrozytenkonzentraten	49
1.2	Wirkung der Arachidonsäurekonzentration auf Burstaktivität	52
2.	Studie II	54
2.1	Makrohämodynamik, Blutgase, Blutbild	54
2.2	Gefäßdurchmesser und Mikrohämodynamik in Arteriolen und Venolen	55
2.3	Leukozytenadhärenz in pulmonalen Arteriolen und Venolen	55
2.4	Mikrohämodynamik und Leukozytenretention in Alveolarkapillaren	57
2.5	Myeloperoxidaseaktivität im Lungengewebe	57
2.6	Histologie	59
3.	Studie III	60
3.1	Makrohämodynamische Parameter	60
3.2	Arterielle Blugasanalyse	62
3.3	Blutbild	64
3.4	Blutchemische Parameter	65
3.4.1	Triglyceridkonzentration	65
3.4.2	Konzentration an freien Fettsäuren	65
3.4.3	Thromboxane B_2- Konzentration	66
3.5	Mikrohämodynamik und Leukozytenadhärenz in Arteriolen und Venolen	67
3.5.1	Gefäßdurchmesser	67
3.5.2	Erythrozytenfließgeschwindigkeit, Blutvolumenfluß, Wandscherrate	67
3.5.3	Leukozytenadhärenz in Arteriolen und Venolen	70
3.6	Mikrohämodynamik und Leukouzytenretention in Alveolarkapillaren	71
3.6.1	Mittlere Erythrozytenfließgeschwindigkeit in Alveolarkapillaren	71
3.6.2	Kapillarmorphologie, funktionelle Kapillarperfusion	73
3.6.3	Leukozytenretention in Alveolarkapillaren	74
3.6.4	Alveolarseptenbreite	74
3.7	Myeloperoxidaseaktivität im Lungengewebe	75
3.8	Histologie	77
4.	Studie IV: Thrombozytenkinetik in der pulmonalen Mikrozirkulation	78
4.1	Kinetik unstimulierter Thrombozyten in der pulmonalen Mikrozirkulation	78

4.2	Konstanz der Parameter	82
4.3	Einfluss der Thrombozytenaktivierung auf die Thrombozytenkinetik	83
IV.	**Diskussion**	**88**
1.	Mehrfach ungesättigte Fettsäuren in Erythrozytenkonzentraten	88
1.1	Einfluss des Konservierungsverfahrens	88
1.2	Wirkung mehrfach ungesättigter freier Fettsäuren	92
1.3	Arachidonsäure als proinflammatorischer Mediator	93
2.	Untersuchung der Arachidonsäurewirkung in vivo	96
2.1	Experimentelles Modell	96
2.1.1	Intravitalmikroskopie der Lungenmikrozirkulation	96
2.1.2	Einfluss von Anästhesie und Analgesie	100
2.1.3	Doppelmarkierung autologer Blutzellen mit Fluorochromen	100
2.1.4	Phototoxizität	102
2.1.5	Quantifizierung der Mikrohämodynamik	102
2.1.6	Quantifizierung der Leukozytenkinetik	103
2.1.7	Intravenöse Infusion freier Arachidonsäure	104
2.1.8	Endotoxin als proinflammatorischer Stimulus	105
2.1.9	Konstanz der Rahmenbedingungen	106
2.2	Diskussion der Ergebnisse	107
2.2.1	Makrohämodynamik	107
2.2.2	Gasaustausch	109
2.2.3	Pulmonale Mikrohämodynamik und Leukozyten-Edothelinteraktion	112
2.2.3.1	Gefäßmorphologie und Mikrohämodynamik	112
2.2.3.2	Leukozyten-Endothel Interaktion	116
2.2.4	Pathophyiologische Mechanismen der Schadensaggravierung	119
3.	Thrombozytenkinetik in der pulmonalen Mikrozirkulation	121
3.1.1.1	Kinetik unstimulierter Thrombozyten	122
3.1.1.2	Kinetik thrombin-aktivierter Thrombozyten	123
4.	Konsequenzen der Untersuchungsergebnisse	127
V.	**Zusammenfassung**	**129**
VI.	**Literatur**	**132**
VII.	**Bislang veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit**	**132**

VIII. Abschließende Bemerkung 156

IX. Lebenslauf 158

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
A_{ALV}	Fläche des Kapillarareals
Ad	Anzahl Endothel-adhärenter Leukozyten
Ad_{PLT}	Anzahl Endothel-adhärenter Thrombozyten
AP_m	mittlerer arterieller Blutdruck
ARDS	adult respiratory distress syndrome
AWP	Atemwegsdruck
BP	Bandpassfilter
γ	Wandscherrate
CD	Cluster of differentiation
CO	Herzzeitvolumen
COX	Zyklooxigenase
CPI	Kapillarer Perfusionsindex
$CV_{(x)}$	Variationskoeffizient von x
CVP	Zentralvenöser Blutdruck
D	Gefäßdurchmesser
EK	Erythrozytenkonzentrat
Etox	Endotoxin
FACS	fluorescence activated cell sorter
FiO_2	inspiratorische Sauerstofffraktion
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GMP 140	granule membrane protein 140 (P-Selektin)
H_D	Abflußhämatokrit
H_T	dynamischer Mikrohämatokrit
Hb	Hämoglobingehalt
HCO_3^-	Bikarbonatkonzentration
Hk	systemischer Hämatokrit
HR	Herzfrequenz
HZV	Herzzeitvolumen
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
L_{ALV}	Länge der perfundierten Kapillarstrecke

LAM-1	leukocyte adhesion molecule-1 (L-Selektin)
LP	Langpassfilter
MCP	medium chain triglycerides
MCV	Mittleres korpuskuläres Volumen
Mean	Mittelwert
n	Anzahl
P_d	diastolischer Blutdruck
P_S	systolischer Blutdruck
PaO_2	arterieller Sauerstoffpartialdruck
$PaCO_2$	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PADGEM	platelet activation-dependent granule external membrane protein (P-Selektin)
PAP_m	mittlerer pulmonalarterieller Blutdruck
PECAM-1	platelet/endothelial cell adhesion molecule 1
PKC	Proteinkinase C
PLT	Platelet
PMN	polymorphnuclear neutrophil (neutrophiler Granulozyt)
PVR-Index	Index des pulmonalvaskulären Gefäßwiderstandes
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand 1
PUFAs	polyunsaturated free fatty acids
Q	Blutvolumenfluss
RBC	red blood cell (Erythrozyt)
Ret_{per} /ALV	Anzahl permanent retinierter Leukozyten / Alveolarfläche
Ret_{plt}	Anzahl permanent retinierter Thrombozyten / Alveolarfläche
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SVR	Systemisch vaskulärer Widerstand
t_{ALV}	mittlere alveoläre Transitzeit der Thrombozyten
TNF_α	Tumornekrosefaktor α
TRALI	transfusions-assoziiertes akutes Lungenversagen
TxA_2	Thromboxan A_2
v_{RBC}	mittlere Erythrozytenfließgeschwindigkeit
v_{PLT}	mittlere Thrombozytenfließgeschwindigkeit

I. Einleitung

1. Vorbemerkung

Seit der Entdeckung der Blutgruppen durch Landsteiner 1901 (95) und den damit verbundenen ersten erfolgreichen Blutübertragungen, hat sich die Transfusionsmedizin zu einem hochdifferenzierten Fachgebiet entwickelt. Die prophylaktische und therapeutische Anwendung von menschlichen Blutzell- und Plasmapräparaten veränderte sich mit zunehmendem Erkenntnisgewinn von einer überwiegend notfallorientierten Blutsubstitution zur gezielten Hämotherapie.

Zahlreiche Behandlungsverfahren in der modernen Medizin sind heute auf die ständige Verfügbarkeit von Blutprodukten angewiesen. Vorraussetzung hierfür war die Verbesserung alter und die Entwicklung neuer Herstellungsverfahren.

Jährlich werden in Deutschland ca. 3 Mio. Erythrozytenkonzentrate zur Behandlung einer chronischen oder akuten Anämie transfundiert (2). Insbesondere im Rahmen der intensivmedizinischen Therapie kritisch kranker Patienten nach Trauma, Schock oder Sepsis bestehen nach wie vor jedoch kontroverse Diskussionen hinsichtlich der bestmöglichen Transfusionsstrategie sowie potentieller Komplikationen.

Neben anderen prädisponierenden Faktoren, identifizierten Moore *et al*. (114) 1997 die Transfusion von Blut als unabhängigen Risikofaktor für die Entwicklung eines Multiorganversagens nach schwerem Trauma. Neueste klinische Studien konnten des weiteren zeigen, dass insbesondere das Alter des transfundierten Blutes mit signifikant gesteigerter Mortalität bei septischen Patienten (131) sowie mit der Entwicklung eines posttraumatischen Multiorganversagens (184) assoziiert ist. Im Vordergrund der klinischen Problematik steht in diesem Zusammenhang oftmals die Entwicklung eines akuten Lungenschadens im Sinne eines ARDS (Acute repiratory distress Syndrome). Aufgrund mangelnder Kenntnis der pathophysiologischen Mechanismen können die Zusammenhänge zwischen dem Alter der transfundierten Erythrozytenkonzentrate und der Entwicklung möglicher Organkomplikationen, insbesondere dem akuten Lungenversagen, bei Patienten mit systemischer Inflammation bislang nicht erklärt werden. Ein fundiertes Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen ist jedoch obligate Voraussetzung, um im Rahmen der intensivmedizinischen Behandlung auch durch optimierte

Transfusionsstrategien sowohl Morbidität als auch Mortalität kritisch kranker Patienten auf ein niedrigst mögliches Niveau zu senken.

2. Pathophysiologie des akuten Lungenschadens

Der Begriff des akuten Lungenversagens im Sinne des „Acute respiratory distress syndroms“ (ARDS) wurde durch David Ashbaugh, Professor für Chirurgie der Universität von Colorado im Jahr 1967 in die medizinische Terminologie (4) eingeführt. „Acute respiratory distress syndrom“ definiert gemäß der „American-European Consensus Conference on ARDS“ einen Symtomenkomplex, der durch akut einsetzenden Beginn, einen Oxygenierungsindex von weniger als 200mmHg, bilaterale radiologisch nachweisbare Lungeninfiltrate sowie einen pulmonalarteriellen Wedge Druck von weniger als 18mmHg gekennzeichnet ist (18).

Ätiologisch wird vereinfacht zwischen einer direkten und einer indirekten Schädigung des Lungenparenchyms unterschieden (18). Im Gegensatz zur direkten Schädigung des Lungengewebes z.B. infolge von Aspiration, Lungenkontusion, Pneumonie, Inhalatations- oder Barotrauma, werden die Effekte bei indirekter Lungenschädigung infolge von Schock, Sepsis, Transfusion, nichtthorakalem Trauma oder großflächiger Verbrennung wesentlich durch körpereigene humorale und zelluläre Mediatorsysteme vermittelt.

Zentrale pathophysiologische Bedeutung im Rahmen der zellulären Antwort wird derzeit den neutrophilen Granulozyten (18,169,179) beigemessen, zudem wird die Bedeutung des Makrophagen/Monozyten Systems sowie die Rolle von Lymphozyten und Thrombozyten in Abhängigkeit ätiologischer Faktoren (73) kontrovers diskutiert. Die Freisetzung verschiedener Zytokine, Lipidmediatoren (Prostaglandine, Leukotriene), Oxidantien und Proteasen, sowie die Produktion von Stickstoffmonoxid und Bildung von Wachstumsfaktoren und Neuropeptiden durch entsprechende Zellen ist nach derzeitigem wissenschaftlichen Stand für die Initiierung und Perpetuation des pathophysiologischen Prozesses essentiell. Bestandteile der humoralen Antwort im Rahmen der systemisch inflammatorischen Reaktion stellen die Aktivierung des Komplement- und Kininsystems sowie die Gerinnungs- und Fibrinolyseaktivierung dar.

Im speziellen Fall des Transfusions-assoziierten akuten Lungenversagens (TRALI) werden des weiteren immunologisch mediierte Mechanismen diskutiert. Zahlreiche Untersuchungen konnten HLA- und granulozytenspezifische Antikörper (anti-NA2, -b5, -NB-1, -NB2) sowie Leukoagglutinine in Blutkonserven bzw. dem Spenderplasma nachweisen (41,127). Nach Transfusion können diese Antikörper an ihre

korrespondierenden Liganden auf der Leukozytenoberfläche bzw. dem pulmonalvaskulären Gefäßendothel des Empfängers binden. Hierbei interagieren die granulozytenspezifischen Antikörper NA1 und NA2 mit IgG Fc Rezeptoren (123). Die anschließende Quervernetzung resultiert in einer Aktivierung der Zellen durch den Phosphatidylinositol 3-Kinase Weg (117). Ebenso durch Quervernetzung von HLA-1 Molekülen auf den Endothelzellen erfolgt eine Aktivierung des pulmonalvaskulären Gefäßendothels durch Thyrosinphosphorylierung und Aktivierung der Inositol Phosphat Kaskade (20). Integrin und Selektin sowie mechanisch vermittelte Mechanismen (35) ermöglichen anschließend die Margination und Adhäsion von neutrophilen Granulozyten in der pulmonalen Mikrozirkulation. Das Prinzip, nach dem dann sowohl zelluläre als auch humorale Mediatorsysteme zur Entstehung des Endothelschadens beitragen, ist eine unverhältnissmäßig überschießende Stimulus-Antwort Reaktion, bei relativem Versagen physiologischer Inhibitoren. Gesteigertes Endothelleakage mit der Entwicklung eines zunächst interstitiellen in zunehmendem Verlauf auch intraalveolären Ödems kennzeichnet die entscheidende Initialphase des akuten Lungenschadens.

Die erläuterten immunologischen Mechanismen scheinen jedoch nicht die einzig entscheidenden pathophysiologischen Mechanismen zu sein, die zur Entwicklung eines transfusions-assoziierten akuten Lungenschaden führen. In ca. 15% der Fälle, in denen sich ein TRALI entwickelt, können keine der beschriebenen Antikörper nachgewiesen werden (127) und in ca. 50% der Fälle, bei denen ein Antikörpernachweis erfolgreich ist, findet sich keine Kreuzreaktivität der Antikörper mit den Antigenen des Empfängers (128).

Eine ergänzende Hypothese zu dem oben beschriebenen Pathomechanismus postulierten erstmals Silliman *et al.* 1992 (150). Die Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass Lipidmediatoren, ähnlich dem Plättchen-aktivierendem Faktor, in konservierten Blutprodukten akkumulieren, die als sogenannte „*primende*“ Substanzen humane neutrophile Granulozyten stimulieren können. Mechanismen und Konsequenzen des *„Primings“* humaner Granulozyten sollen daher im nächsten Abschnitt zunächst näher betrachtet werden.

3. Konzept des „Primings“

Als *Priming* bezeichnet man das Phänomen, dass eine niedrige Dosis eines ersten, möglicherweise unbekannten Stimulus, die per se keine Zellantwort auslöst, die Wirkungen sekundärer Aktivatoren (z.B. Endotoxin) wesentlich zu potenzieren vermag

(32). Um eine effektive Wirkung zu entfalten, müssen sich Substanzen mit Primingeffekt eine je nach Agens variable Zeit vor dem Kontakt der Zelle mit dem sekundären Aktivator der entsprechenden Zelle präsentieren.

In der Literatur werden derzeit eine Vielzahl von Substanzen mit primender Aktivität beschrieben. Die bekannten Agentien gehören unterschiedlichsten Stoffklassen an und differieren nicht nur hinsichtlich der benötigten Präinkubationszeiten, sondern ebenso in Bezug auf Qualität und Quantität ihrer Wirkung und der aktivierten Signaltransduktionswege.

Funktionelle Konsequenzen des Primings neutrophiler Granulozyten sind im wesentlichen eine Steigerung der Respiratory Burst Aktivität, Veränderung der Form und Deformabilität, numerische sowie funktionell veränderte Expression bzw. Präsentation von Adhäsionsmolekülen, gesteigerte Degranulation und Freisetzung von Lipidmediatoren und proinflammatorischen Zytokinen (183) sowie Inhibierung der Apoptose (22,31).

Bereits 1985 konnten Guthrie *et al*. (72) nachweisen, dass die Produktion von Superoxidanionen (O_2^-) bei vorheriger Exposition der Granulozyten mit geringen Endotoxinkonzentrationen und anschließender Stimulation mittels fMLP bis auf das 20-fache gesteigert werden kann. Mittlerweile ist bekannt, daß die Aktivität der NADPH-Oxidase abhängig von der Translokation und der Interaktion der zytosolischen Enzymkomponenten ($p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p21^{rac}$) mit dem membrangebundenen Flavohämoprotein Cytochrom b_{558} ist. Vorraussetzung für die Migration der zytosolischen Enzymanteile zur Plasmamembran ist die Phosphorylierung der Untereinheiten $p47^{phox}$ und $p67^{phox}$ durch entprechende Proteinkinasen (z.B. Proteinkinase C) (13). Es wird angenommen, dass Agentien mit primender Wirkung über differentierte Signalkaskaden letztendlich die Phosphorylierung der zytosolischen Enzymkomponenten bewirken.

Als Konsequenz einer Modifikation des zytoskeletalen Aktins sind geprimte Neutrophile weniger verformbar (32). Eine mechanisch bedingte Sequestration der Zellen aufgrund der Diskrepanz von Zellgröße und Kapillardurchmesser bei erhöhter Zellrigidität wird hierdurch vor allem im pulmonalen Kapillarbett begünstigt. Neben Veränderungen mechanischer Zelleigenschaften erfolgt in Abhängigkeit des primenden Agens ausserdem ebenso eine Modulation der adhäsiven Zelleigenschaften. Condliffe *et al*. konnten nachweisen, dass sowohl in Abhängigkeit von der Art des Agens (LPS, TNF, PAF) als auch seiner Konzentration leukozytäre Integrine und Selektine sowohl in ihrer Expression als auch Funktion beeinflusst werden (31). Entscheidend für das veränderte Interaktionsverhalten der neutrophilen Granulozyten mit dem mikrovaskulären Endothel

scheint eine gesteigerte Expression des β_2-Integrins CD11b/CD18 (Mac 1) sowie ein Shedding des Selektins CD62-L (L-Selektin) zu sein. Möglicherweise von noch größerer Bedeutung ist die infolge des Primings gesteigerte funktionelle Aktivität des CD11b/CD18 Rezeptors, d.h. die höhere Affinität des Rezeptors zu seinem endothelialen Liganden (ICAM-1) als Konsequenz einer phophorylierungsabhängig veränderten Proteinkonformation (31).

Der Effekt des Primings auf die Degranulation der neutrophilen Granulozyten wird – im Gengensatz zur massiven Steigerung des Respiratory Burst- als nur als nur moderat eingeschätzt. Ein potenzierender Effekt durch Priming konnte bisher *in vitro* für die Freisetzung von Elastase und Myeloperoxidase durch Fittchen *et al*. nachgewiesen werden, für zahlreiche andere Enzyme konnte dagegen nur ein additiver Effekt gezeigt werden.

Neben der gesteigerten Antwort der Neutrophilen konnte außerdem für LPS und granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) als primende Agentien eine Prolongation der funktionellen Lebenszeit der Granulozyten aufgrund Inhibierung bzw. Verzögerung der Apoptose nachgewiesen werden. Der Einfluß auf den programmierten Zelltod scheint jedoch in Abhängigkeit des entsprechenden Agens stark zu differieren. So konnte für TNF-α ein zeitabhängiger, bimodaler Effekt nachgewiesen werden, wohingegen Platelet-Activating Factor in primender Konzentration *in vitro* keinerlei Änderungen der Apoptoserate induziert.

Die Relevanz der dargelegten Mechanismen konnte bisher nur teilweise unter experimentellen Bedingungen *in vivo* sowie in Untersuchungen der Aktivierung der Neutrophilen Granulozyten von Patienten mit ARDS, Gram-positiver oder -negativer Sepis, Trauma sowie Pilzinfektionen nachgewiesen werden. Nach wie vor wird kontrovers diskutiert, welche Substanzen im einzelnen und ab welcher Konzentration signifikanten Einfluß auf die funktionelle Aktivität der Granulozyten *in vivo* besitzen.

Silliman konnte im Anschluß an die bereits unter 1.2 erwähnte Arbeit (150) als mögliche primende Substanz der Neutrophilen NADPH-Oxidase, Lyso-Phosphatidylcholine (Lyso-PCs) (C_{16}Lyso-PAF; Palmitoyl-Lyso-PCs) identifizieren (147). Diese Substanzen akkumulieren in Abhängigkeit der Konservierungzeit in Erythrozytenkonzentraten und bewirken einen 2,5– 3,7-fachen Anstieg der fMLP-induzierten Superoxid-Anionen Produktion durch neutrophile Granulozyten (147). Lyso-PCs aggravieren im Modell der isoliert perfundierten Lunge nach Vorstimulation mit Endotoxin den Organschaden

aggravieren (151). Lyso-Pcs wiederum mit primender Aktivität konnten aus dem Posttransfusionsserum von Patienten mit TRALI isoliert werden (149).

Neben Lyso-Pcs könnten jedoch ***mehrfach ungesättigte freien Fettsäuren (PUFAs: polyunsaturatted fatty acids)*** hierunter insbesondere ***Arachidonsäure*** eine weitere - bislang nur unzureichend untersuchte- Gruppe der Lipidmediatoren mit primender Aktivität und damit erheblicher Bedeutung in Zusammenhang mit dem transfusions-assoziierten akuten Lungenschadens darstellen. Im folgenden Abschnitt wird erläutert welche derzeit nachgewiesenen Mechanismen für diese Hypothese sprechen.

4. Primingeffekt durch mehrfach ungesättigte freie Fettsäuren

Arachidonsäure gehört mit einer Kette von 20 Kohlenstoffatomen, einer Carboxylgruppe sowie 4 Doppelbindungen strukturell zur Gruppe der ϖ6 mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Pufas). Arachidonsäure ist ein ubiquitär vorkommender Bestandteil der Membranlipide, außerdem ist sie in veresterter Form in Plasmatriglyceriden und Phospholipiden enthalten sowie in streng geregelter Konzentration in der Fraktion der freien Plasmafettsäuren.

Neben der Funktion als metabolischem Substrat und entscheidendem proximalen Precursor des Eicosanoidstoffwechsels (78), konnte gezeigt werden, daß Arachidonsäure selbst direkt intrazellulär Signaltranduktionswege zu aktivieren vermag und damit in der Lage ist, eine Stimulus-Antwort Reaktion zu modulieren (3,23,81,142,143). Vorraussetzung hierfür ist das Vorliegen der unveresterten freien Fettsäure im Zytosol der Zielzellen. Für die Steigerung der intrazellulären Konzentration stehen prinzipiel zwei unterschiedliche

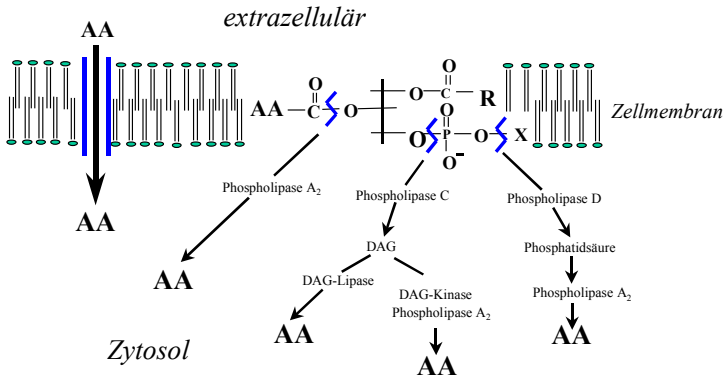

Abb. 1: Schematische Übersicht der Mechanismen zur intrazellulären Akkumulation freier Arachidonsäure. Neben der Abspaltung der Arachidonsäure aus den Membranlipiden, kann Arachidonsäure auch direkt Carier-vermittelt von extrazellulär in das Zytosol transportiert werden. DAG-Lipase: Diacylglycerin-Lipase, AA: Arachidonsäure.

Mechanismen zur Verfügung. Zum einen ermöglichen, wie seit langem bekannt, verschiedene Enzyme (Phospholiopase A_2, Phospholipase C, Phospholipase D) die Abspaltung freier Arachidonsäure aus den Membranlipiden (78), zum anderen konnte gezeigt werden, daß freie Fettsäuren auch direkt Carier-vermittelt vom Extrazellulärraum nach intrazelluär transportiert werden können (58,81,161). Die zelluläre Aufnahme folgt in Abhängigkeit der extrazellulären Fettsäure- aber auch Albuminkonzentrationen einer Sättigungskinetik, die ein wesentliches Charakteristikum eines Carrier-vermittelten transmembranären Stofftransportes darstellt (155,171). Im hydrophilen cytoplasmatischen Milieu werden die hydrophoben freien Fettsäuren mit Hilfe sogenannter FABPs (fatty acid binding Proteins) (58,81), die ubquitär abundant exprimiert sind, zu den entsprechenden Zielmolekülen transportiert, die dann direkt oder indirekt über Aktivierung diverser Signalkaskaden Einfluss auf verschiedene zelluläre Prozesse nehmen.

Als funktionell entscheidendes Zielmolekül, das direkt durch Arachidonsäure aktiviert werden kann, wurde bislang die Serin/Threonin-Phosphorylase Proteinkinase C identifiziert (23,81,142).

Eine Vielzahl von intrazellulären Mechanismen werden im Rahmen einer Stimulus-Antwort Reaktion durch Proteinkinase C moduliert: Es ist bekannt, dass die Transkription der Messenger-RNA der inflamatorischen Zytokine IL-1 und TNF-α unter anderem durch

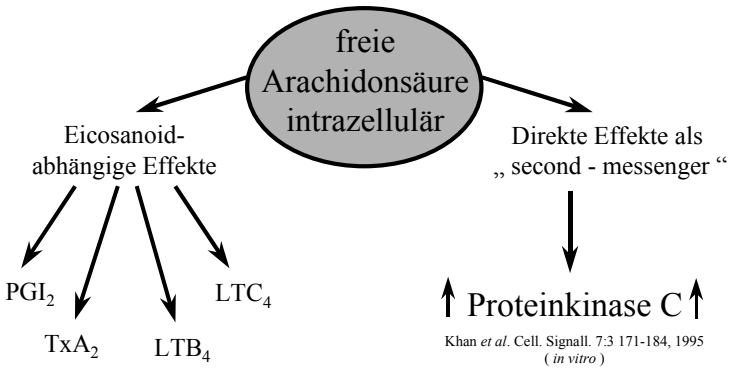

Abb. 2: Übersicht potentieller Wirkmechanismen freier Arachidonsäure.

Proteinkinase C reguliert wird (83,141). Mit Hilfe selektiver Proteinkinase C Inhibitoren konnten Huwiler *et al*. zeigen, daß die Prostaglandin- und Leukotrienproduktion in Zymosan-stimulierten Makrophagen von der Aktivität der Proteinkinase C abhängig ist (80). Durch Phosphorylierung der Untereinheiten $p47^{phox}$ und $p67^{phox}$ der NADPH-Oxidase

bewirkt Proteinkinase C die Translokation der cytosolischen Enzymuntereinheiten zur Zellmembran und initiiert damit die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen durch die aktivierte NADPH-Oxidase (13,143). Sellmayer *et al*. konnten darüber hinaus nachweisen, daß auch Arachachidonsäure per se, unabhängig von der Proteinkinase C, bis zu einem gewissen Grad die Aktivität der NADPH-Oxidase zu steigern vermag (143).

Direkte Wirkungen der Proteinkinase C auf die Funktion von Adhäsionsmolekülen können des weiteren die adhäsiven Zelleigenschaften modulieren. Während die α-Kette der β_2-Integrine konstitutiv phosphoryliert ist, kann die β_2-Kette fakultativ durch Proteinkinase C phosphoryliert werden (55). Die damit verbundene Konformationsänderung erhöht die Affinität des CD 18 Rezeptors zu seinen Liganden und kann damit zu gesteigerter Adhäsion der neutrophilen Granulozyten am mikrovaskulären Gefäßendothel führen.

Die Relevanz der dargelegten Mechanismen konnte bislang durch Untersuchungen *in vitro* bestätigt werden. *Bates et al.* konnten nachweisen, dass die Adhärenz humaner neutrophiler Granulozyten in mit autologem Plasma beschichteten Mikrotiterplaten nach Inkubation mit Arachidonsäure konzentrationsabhängig signifikant ansteigt (10). Als Ursache wird ein rund 2,5-facher Anstieg der Expression des CD11b/CD18 Rezeptors diskutiert. Mit ^{51}Chrom-markierten HUVEC-Zellen konnte gezeigt werden, dass der Granulozyten-mediierte Endothelzellschaden nach Vorinkubation der Granulozyten mit

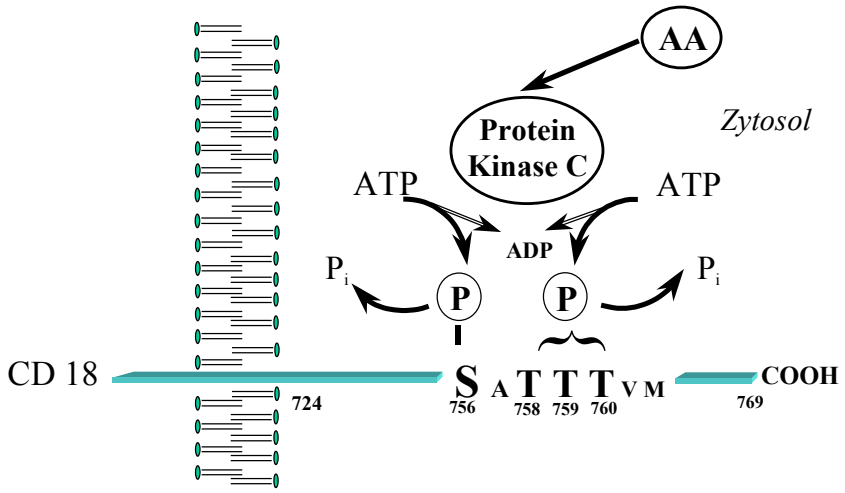

Abb. 3: Schematische Darstellung der Modulation des CD11b/CD18 Rezeptors durch Arachidonsäure. Gekennzeichnet sind jeweils die Aminosäuren, die durch Proteinkinase C nach deren Aktivierung durch Arachidonsäure phosphoryliert werden. Als Konsequenz resultiert eine Konformationsänderung des CD18 Rezeptors.

Arachidonsäure erheblich aggraviert wird (11).

Arachidonsäure selbst, aber insbesondere auch die Metaboliten des Zyklooxigenasestoffwechselweges, wie Thromboxan A_2 stellen außerdem potente Stimulantien der Blutplättchen dar. Die genaue Definierung der Rolle der Thrombozyten im Rahmen eines mikrovaskulären Endothelschadens auch in Zusammenhang mit der Initalphase des akuten Lugenschadens ist derzeit Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Untersuchungen (47,73,102,185).

In wie weit mehrfach ungesättigte Fettsäuren, insbesondere freie Arachidonsäure, ebenfalls in Bezug auf die Entwicklung eines akuten Lungenschadens als Lipidmediatoren pathophysiologische Bedeutung besitzen, wurde bislang *in vivo* nur unzureichend untersucht. Es gilt außerdem zu klären, ob mehrfach ungesättigte Fettsäuren durch eine mögliche Akkumulation in Erythrozytenkonzentraten eine weitere wesentliche Quelle primender Lipidmediatoren darstellen, die nach Transfusion zur Entwicklung eines akuten Lungenschadens prädestinieren.

5. Fragestellung und Zielsetzung

Ausgehend von der klinischen Situation des transfusions-assoziierten akuten Lungenschadens und den in diesem Zusammenhang vornehmlich aus in *vitro*-Untersuchungen stammenden pathophysiologischen Befunden einerseits und den Erkenntnissen zum Prinzip des Primings andererseits, stellten sich für die vorliegende Arbeit nachstehend zusammengefasste Fragen:

1. Welche Fettsäuren – und insbesondere welche biologisch hochpotenten mehrfach ungesättigten langkettigen Fettsäuren – liegen in welchen Konzentrationen in Erythrozytenkonzentraten für die klinische Verwendung vor? Ändert sich das Fettsäureprofil in Erythrozytenkonzentraten in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer?

Auf den Ergebnissen dieser ersten Studie basieren die Untersuchungsgegenstände der beiden anschließenden tierexperimentellen Studien:

2. Welchen Einfluß hat eine kurzfristige, parenterale Zufuhr von Arachidonsäure auf die pulmonale Mikrohämodynamik und Leukozyten/Endothel-Interaktion *in vivo*?
3. Wie beeinflusst eine zusätzliche inflammatorische Stimulation in Form einer akuten Endotoxinämie die pulmonale Mikrohämodynamik und Leukozyten/Endothel-Interaktion nach kurzfristiger, parenteraler Arachidonsäureapplikation?

Ausgehend von den Ergebnissen dieser beiden Untersuchungen trat eine potentielle Beteiligung von Thrombozyten bei der Initiation des akuten Lungenschadens in den Vordergrund des Interesses.

4. Daher war es Ziel der abschließenden Versuchsserie, ein Modell zur Quantifizierung der Thrombozytendynamik und Thrombozyten/Endothel-Interaktion in allen Segmenten der pulmonalen Mikrozirkulation zu entwickeln.

II. Methodik

1. Studie I: Untersuchung der Erythrozytenkonzentrate

1.1 Gewinnung und Aufarbeitung der Erythrozytenkonzentrate

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden insgesamt 42 Erythrozytenkonzentrate (EK) hinsichtlich ihres Gehaltes und der Zusammensetzung an freien Fettsäuren in Abhängigkeit ihrer Konservierungszeit mittels gaschromatographischem Analyseverfahren untersucht. Die Erythrozytenkonzentrate wurden von der Abteilung für Transfusionsmedizin, Klinikum Großhadern, LMU-München zur Verfügung gestellt und aus dem Vollblut von gesunden, erwachsenen Routineblutspendern nach einem Standardverfahren wie folgt gewonnen:

Zu 450 ml Vollblut wurden 67 ml gerinnungsinhibierende Konservierungslösung (CPD-Lösung; **C**itrat 18mM, Trisodiumcitrat 104mM, **D**extrose 142mM, 2,22g Natriumdihydrogen**p**hosphat / l H_2O) zugegeben. Der pH-Wert der CPD-Lösung lag bei 5,6-5,8. Nach Zugabe der Lösung zum Vollblut lag der pH-Wert des Vollblutes zwischen 7,1 und 7,2. Mittels Zentrifugation wurden aus dem Vollblut die Erythrozyten separiert und das Erythrozytenkonzentrat mit 75-100 ml einer Konservierungslösung (SAGM: **S**aline NaCl 150mM, **A**denin 2mM, **G**lucose 45mM, **M**annitol 29mM) auf einen Hämatokrit von 60-70% verdünnt. Die Erythrozytenkonzentrate wurden gemäß den deutschen Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten (1) bei 4^{o}C bis zur weiteren Analyse gelagert.

1.2 Gaschromatographische Analyse der freien Fettsäuren

Nach entsprechender Lagerungszeit wurden jeweils Proben von 20 ml steril aus den Erythrozytenkonzentraten entnommen. Um sämtliche zellulären Bestandteile sowie Zelldetritus zu entfernen, wurden die Proben zunächst bei 4000g für 8 Minuten zentrifugiert, gefolgt von einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 10000g über 8 Minuten. Der Überstand wurde bis zur weiteren Aufarbeitung bei –70^{o}C eingefroren.

Die Konzentration der verschiedenen freien Fettsäuren der Probe wurde gemäß der Methodik von Dole und Meinertz analysiert (40). Jeder Probe wurden zunächst die freien Fettsäuren Heptadecansäure (17:0) und Nonadecansäure (19:0) in einer Konzentration von 50µg/ml als interne Extraktionsstandards zugesetzt. Anschließend wurden alle Lipide nach

der von Folch *et al.* (54) beschrieben Methode extrahiert: 1ml der Probe wurde mit 3ml eines Chloroform-Ethanol Gemisches (2:1) versetzt. Die in der lipophilen Chloroformphase extrahierten Lipide wurden durch Evaporation unter Vakuum konzentriert.

Mittels Dünnschichtchromatographie wurden die Lipide anschließend in Phospholipide, Triglyceride und freie Fettsäuren aufgetrennt. Hierzu wurden 25µm Silica-Gel Platten mit Skelly F (Petroleum-Ether-CH_3OCH_3-Acetic acid, 80:20:1) als Flußmittel verwendet. Die Platten wurden mit 2,7-Dichloroflurescein besprüht und unter kurzwelligem UV-Licht die Banden der Lipidfraktionen identifiziert. Die Bande der freien Fettsäuren wurde von der Platte isoliert und die freien Fettsäuren durch Zugabe von HCL-CH_3OH bei 100^o C unter Stickstoff über 60 Minuten verestert. Die so entstandenen Fettsäuremetylester (FSME) wurden mit Heptan extrahiert und zur endgültigen Analyse auf einer 30m * 0,5 mm (innerer Durchmesser) Free FA Phase open tubular Kapillarsäule (Fa. Supelco, München, Deutschland) aufgetrennt. Als Träger wurde Helium mit 20 ml/min verwendet.

Die Analyse wurde temperatur-programmiert von 145 bis 200^o C bei einem Temperaturanstieg von 1,75^o C/min durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte mittels eines Flammen-Ionisationsdetektor, dessen Signal von einem gaschromatographischen Integrator (Hewlett-Packard 5840 A Avondale, Pennsylvania, USA) erfasst wurde. Die zu quantifizierenden freien Fettsäuren wurden durch Vergleich der relativen Retentionszeiten mit bekannten Standards (NuChek Prep, Elysian, MN, USA) identifiziert. Die Konzentrationen aller in Tabelle 1 zusammengefassten freien Fettsäuren wurden gemessen.

gesättigte Fettsäuren		**einfach-ungesättigte Fettsäuren**		**mehrfach ungesättigte Fettsäuren**	
Palmitinsäure	16:0	Ölsäure	18:1 n9	Linolsäure	18:2 n6
Stearinsäure	18:0	Erucinsäure	22:1 n9	γ-Linolensäure	18:3 n6
				α-Linolensäure	18:3 n3
				Stearidonsäure	18:4 n3
				Arachidonsäure	20:4 n6
				Eicosapentaensäure	20:5 n3
				Docosahexaensäure	22:6 n3

Tab. 1: Übersicht der gaschromatographisch quantifizierten Fettsäuren im zellfreien Überstand der Erythrozytenkonzentrate.

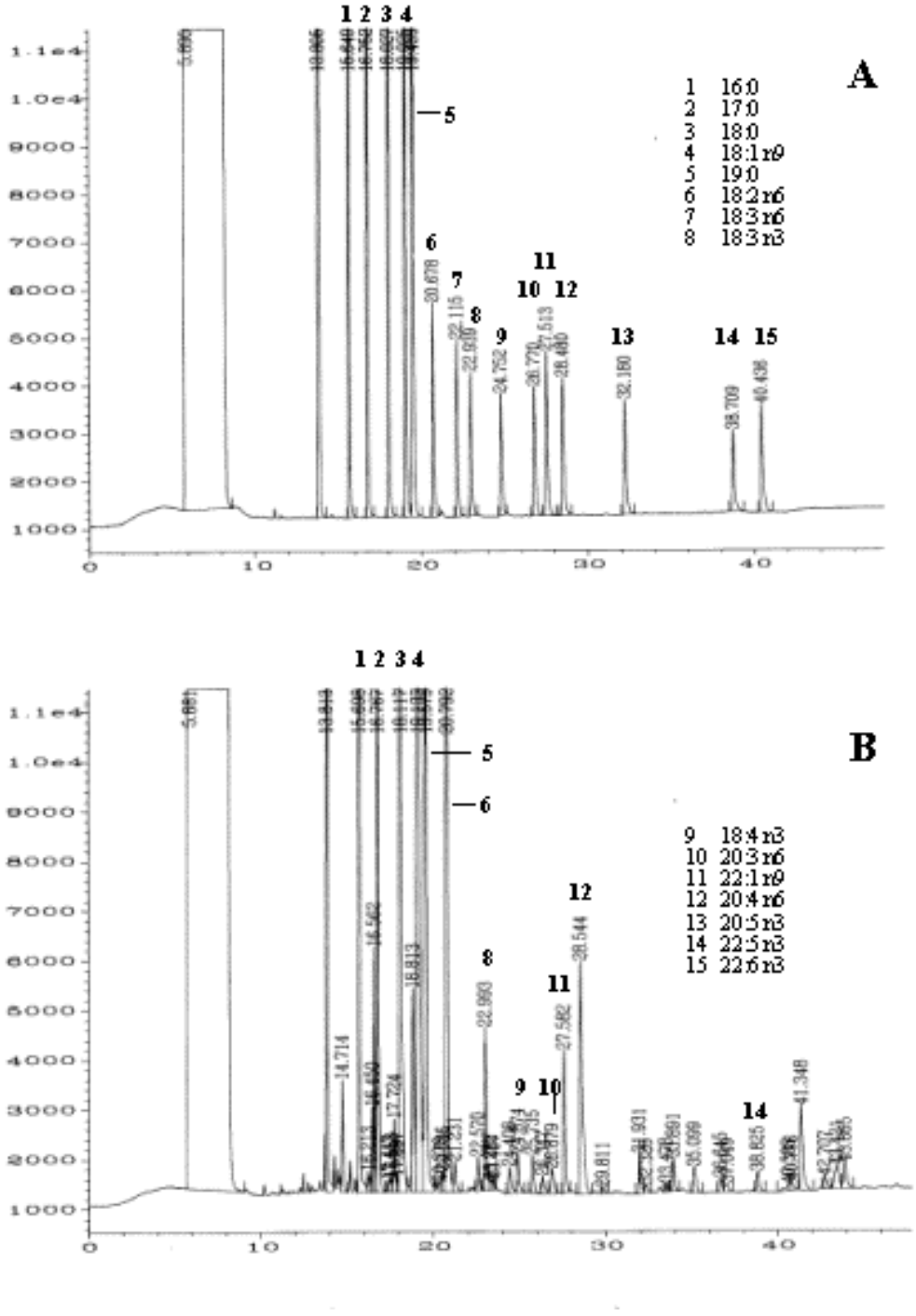

Abb.4 : Orginal Analyseausdruck der Gaschromatographischen Quantifizierung freier Plasmafettsäuren. A: Analyse der verwendeten Fettsäurestandards; B: Analyse einer Plasmaprobe. Die zu quantifizierenden Fettsäuren in den Plasmaproben werden anhand der typischen Retentionszeiten (Ordinate) der eingesetzten Standards identifiziert.

1.3 Sauerstoffradikalproduktion durch Granulozyten

Die „Burst“ Aktivität der Granulozyten, d.h. die Produktion von Hydrogen Peroxid, wurde in *vitro* nach dem Prinzip der intrazellulären Oxidation von nicht-fluoreszierendem Dihydrorhodamin (1,23 DHR) zu fluorezierendem Rhodamin durch granulozytäre Peroxidasen gemessen. Die Bildung des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin ist hierbei direkt proportional zur Peroxidaseaktivität der neutrophilen Granulozyten.

Humanes Vollblut wurde von gesunden, erwachsenen Probanden (n=5) durch venöse Punktion aus der Ellenbeugenvene gewonnen und aus dem Vollblut die Leukozyten wie folgt separiert: 3ml heparinisiertes Blut (10IE / ml) wurde vorsichtig über 3ml Histopaque 1077 Lösung (Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, Deutschland) pipettiert. Infolge von Aggregation an der Grenzschicht der beiden Flüssigkeiten, sedimentieren die Erythrozyten und es verbleibt nach ca. 40 Minuten leukozytenreiches Plasma im Überstand. 20µl des leukozytenreichen Plasmas wurden dann in 12x75 mm Polypropylentubes zuammen mit 1ml HBSS (Hank´s balanced salt solution) (Sulpeco, München) pipettiert, mit 10µl Dihydrorhodaminlösung ($1{,}1 \times 10^{-6}$ M, Dihydrorhodamin; Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) versetzt und 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde entweder eine BSA-Lösung (Bovines Serum Albumin, 0,1% in HBSS; Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) oder Arachidonsäure (3µg/ml bzw. 30µg/ml) gelöst in BSA-Lösung zugegeben. Nach 15 bzw. 30 Minuten wurde die Reaktion durch Kühlen der Proben auf 4^{o}C gestoppt. Die Proben wurden bis zur anschließenden durchflußzytometrischen Untersuchung auf Eis gekühlt.

Die Granulozyten wurden durchflußzytometrisch anhand ihres charakteristischen Forward- und right angle-scatterlichtes identifiziert und die Fluoreszenzintensität der Zellen bei 530nm gemessen. Das verwendete Durchflußzytometer war hierfür mit einem 15mW Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 488nm ausgestattet. Aus der Fluoreszenzintensität von 5000 einzelnen Granulozyten wurde schließlich die mittlere Fluoreszenzintensität mittels FACScan Software (FACScan, FACScan Research Software; Becton Dickinson, Heidelberg) berechnet.

2. Studien II-IV: Tierexperimentelle Untersuchungen

2.1 Versuchstiere

Die Tierexperimente der vorliegenden Arbeit wurden am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München im Zeitraum zwischen Mai 1997 und April 1999 durchgeführt. Für die Versuche wurden insgesamt 41 männliche weiße Neuseeländer Kaninchen (Charles River, Kissleg) verwendet. Das mittlere Körpergewicht der Tiere lag bei 2,8 ± 0,1 kg. Vor dem Versuch wurden die Tiere nicht länger als 10 Tage in Einzelkäfigen, entsprechend den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes, im Tierstall des Instituts für Chirurgische Forschung bei künstlichem 12-stündigem Tag-/Nacht-Rhythmus gehalten. Die Umgebungstemperatur betrug 24°C bei einer Luftfeuchtigkeit von 50%. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Trockenfutter (ssniff Mü Z , Standarddiät für Mümmel, ssniff Versuchsdiäten GmbH, Soest; 39 mg Vitamin E/kg).

Alle Phasen der Präparation und der Versuche durchliefen die Tiere in Vollnarkose durchgeführt. Die Genehmigung des Versuchsvorhabens durch die zuständige Tierschutzkommission der Regierung von Oberbayern lagen vor Beginn der Versuche vor.

2.2 Anästhesie und Beatmung

Nach Rasur eines Ohres und Kanülierung der marginalen Ohrvene des Kaninchens mit einem 22G-Venenverweilkatheter (Insyte-W, Becton Dickinson, Heidelberg) wurde die Narkose mittels Thiopental (Trapanal, Fa. Byk Gulden, Konstanz) bis zum Erlöschen des Cornealreflexes (ca. 50mg/kg KG) eingeleitet. Die anästhesierten Tiere wurden auf dem Rücken gelagert und ventrale Hals und Brustregion enthaart. Anschließend erfolgte über eine ca. 4 cm lange longitudinale mediale Hautinzision an der Halsvorderseite die stumpfe, zirkuläre Freipräparation der Trachea. Diese wurde infraglottisch mittels Skalpel quer inzidiert und ein auf 7cm gekürzter 4,5 mm Trachealtubus (Blue Line Single Use Tracheal Tube, Portex, Berck sur mer, Frankreich) 2 cm in die Trachea eingeführt. Um eine Dislokation während des Versuchs zu verhindern, wurde der Trachealtubus mit Leinenzwirn fixiert (1-0 Leinenzwirn, Fa. Ethicon, Nordersted).

Die Kontinuität der Narkose über den gesamten Versuchszeitraum wurde durch anschließende 30 minütige intravenöse Kurzinfusion von 50 mg/kg KG α-Chloralose (α-

D(+)-gluco-Chloralose, Fa. Merck, Darmastadt) gewährleistet. Durch intravenöse Bolusinjektion von 2,5 mg/kg KG Piritramid (Dipidolor, Jansen GmbH, Neuss) und 1 mg Pancuronium (Pancuronium, Organon Technica, Oberschleißheim) wurden die Kaninchen analgesiert und relaxiert. Während des weiteren gesamten Versuchverlaufs wurde kontinuierlich 0,6 mg/h Pancuronium zur weiteren Muskelrelaxation, 0,1 mg/h Atropin zur vagalen Blockade und 5 ml/h physiologische Kochsalzlösung zum Ausgleich von Flüssigkeitsverlusten durch Beatmung und Blutentnahmen intravenös infundiert.

Mit Hilfe eines druck- und zeitkontrollierten Beatmungsgerätes (Secrist Infant Ventilator IV-100 Sechrist Industries, Inc., Anaheim, USA) erfolgte eine maschinelle Beatmung der Versuchstiere während der gesamten folgenden Präparations- und Versuchsphasen. Der Beatmungsdruck wurde im Beatmungsgerät gemessen inspiratorisch auf 9 mmHg, exspiratorisch, um Atelektasen zu vermeiden, auf 2 mmHg eingestellt. Das Inspiration-/Exspirationsverhältnis betrug 1:2, die Atemfrequenz ca. 25/min und die inspiratorische Sauerstofffraktion 0,4. Atemfrequenz und Inspiration-/Exspirationsverhältnis wurden während der Präparationsphase derart angepasst, dass der arterielle Kohlendioxidpartialdruck zwischen 35 und 40 mmHg konstant gehalten wurde.

Die Körpertemperatur der Tiere wurde kontinuierlich mit einer rektalen Temperatursonde gemessen (Fa. Effenberger, München) und durch eine rückgekoppelte, den Tieren untergelegte elektrische Heizplatte (Fa. Effenberger, München) konstant auf der Ausgangstemperatur gehalten.

2.3 Messung makrohämodynamischer Parameter

Über die bereits für die Tracheotomie durchgeführte longitudinale Hautinzision an der Halsvorderseite wurden rechte A. carotis communis und V.jugularis interna stumpf über eine Länge von ca. 1,5 cm zirkulär freipräpariert. Nach distaler Ligatur beider Gefäße wurde jeweils ein mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllter Katheter 7cm weit nach proximal in die A. Carotis bzw. V.jugularis vorgeschoben. Um Blutverluste während der Katheterinsertion zu vermeiden wurden beide Gefäße dabei kurzfristig proximal mit Hilfe eines Mikroklips (Fa. Aeskulap, Tuttlingen) abgeklemmt. Die korrekte intravasale Platzierung der Katheter wurde durch Aspiration überprüft, die Katheter im Gefäß fixiert (3-0 Leinenzwirn, Fa. Ethicon, Nordersted) und schließlich die Hautinzision über der ventralen Halsregion durch fortlaufende Naht wieder verschlossen (3-0 Ethibond, Fa. Ethicon, Nordersted).

Nach einer weiteren etwa 2,5 cm langen Hautinzision entlang des zweiten linken Interkostalraums wurde unter sorgfältiger Blutstillung mittels Elektrokauter (Modul System 2000, Fa. Martin, München) und nach Ligatur der A. thoracica interna sinistra das Mediastinum parasternal eröffnet. Das Perikard wurde nach Entfernung von Thymusgewebe und Einsetzen eines Thoraxspreizers kreuzförmig inzidiert. Der Ausflußtrakt des rechten Ventrikels wurde mit einer 20 G Kanüle punktiert und anschließend durch das Punktionsloch ein mit physiologischer NaCl-Lösung gefüllter Katheter (Cavafix MT 134, Braun Melsungen AG, Melsungen) ca. 2cm in distaler Richtung durch die Pulmonalklappe in den Hauptstamm der A. pulmonalis vorgeschoben. Nach Verifizierung der korrekten Lage des Katheters anhand der ortstypischen Druckkurve wurde der Katheter mittels U-Naht (5-0, Prolene, Fa. Ethicon, Nordsted) an der Punktionsstelle fixiert und der Thorax durch Naht (3-0 Ethibond, Fa. Ethicon, Nordersted) wieder luftdicht verschlossen.

Alle 3 Katheter waren über mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllte und heparinisierte Druckschläuche mit Statham-Druck-Transducern (P23XL-1, Fa. Spectramed, Düsseldorf) verbunden. Alle drei Druckkurven wurden kontinuierlich auf einem Mehrkanalschreiber (Oscilloreg, Fa. Siemens, Erlangen) registriert. Über zwischengeschaltete 3-Wege-Hähne konnten zu allen Zeitpunkten Blutproben entnommen und Pharmaka appliziert werden.

Die Messung des Herzzeitvolumens erfolgte nach dem Prinzip der transpulmonalen Thermodilution. Hierzu wurde zunächst die linke Leistenregion enthaart und nach longitudinaler, inquinaler Hautinzision die A. femoralis sinistra stumpf über eine Länge von 2 cm freipräpariert. Nach distaler Ligatur des Gefäßes wurde über die A. femoralis eine 5 F Thermistorsonde (Thermistor, Fa.Arrow, Erding) 20 cm weit nach proximal in die Aorta abdominalis vorgschoben, fixiert (3-0 Leinenzwirn, Fa. Ethicon, Nordersted) und die Hautinzision wieder durch Naht (3-0 Ethibond, Fa. Ethicon, Nordersted) verschlossen.

Zur Messung des Herzzeitvolumens wurde jeweils 1,0 ml eisgekühlte pysiologische Kochsalzlösung als Bolus über den zentralvenösen Katheter injiziert und sowohl die Injektionstemperatur des Bolus durch eine am zentralvenösen Katheter angebrachte Temperatursonde als auch die Temperaturänderung des Blutes in der Aorta abdominalis mittels der platzierten Thermistorsonde von einem HZV-Computer (Ref-1, Fa. Baxter, Unterschleißheim) registriert.

Nach Messung der Injektattemperatur und Bestimmung der Temperaturänderung des Blutes in der Aorta abdominalis unmittelbar nach Injektion des Kältebolus lässt sich gemäß

dem von Stewart entwickelten Prinzip der Indikatordilution das Herzzeitvolumen berechnen.

2.4 Thoraxfenster

Nach Implantation aller Katheter wurden die Tiere auf die linke Seite umgelagert und nach der Methode von Kuhnle *et al*. (93) (90)ein thorakales Fenster in die Brustwand implantiert. Hierzu wurde zunächst ein rundes Hautareal von ca. 4 cm Durchmesser über dem rechten 4-6- Interkostalraum abpräpariert und die oberflächliche Muskulatur sowie der Muskulus Seratus unter sorgfältiger Blutstillung mittels Elektrokauter entfernt. Nach Resektion der 4. und 5. Rippe kann anschließend das Fenster (Abb. 2) in die Thoraxwand eingesetzt werden, das den optischen Zugang zur Oberfläche der rechten Lunge mittels Wasserimmersionsmikroskopie ermöglicht.

Das thorakale Fenster besteht aus einem hohlen Metallzylinder an dessen Unterseite eine transparente Teflonmembran (YSI Model 5793, Standard Membrane Kit, Yellow Springs Instruments Co., Ohio, USA) ausgespannt ist. Ein über 16 vertikale Bohrlöcher am Fensterrand angeschlossener Unterdruck von –0,4 bar fixiert die Lungenoberfläche an der Membran und dient der Absaugung eventuell vorhandener Luftpolster. Um ein Austrocknen und Abkühlen der Lungenoberfläche zu verhindern, wurde die Membran kontinuierlich mit 37^{o}C warmen und auf Blutgaswerte äquilibrierten Thyrodepuffer superfundiert. Durch Tabaksbeutelnaht (3-0 Ethibond, Fa. Ethicon, Nordersted) wurde abschließend die Haut wieder ringförmig um das implantierte Fenster luftdicht verschlossen.

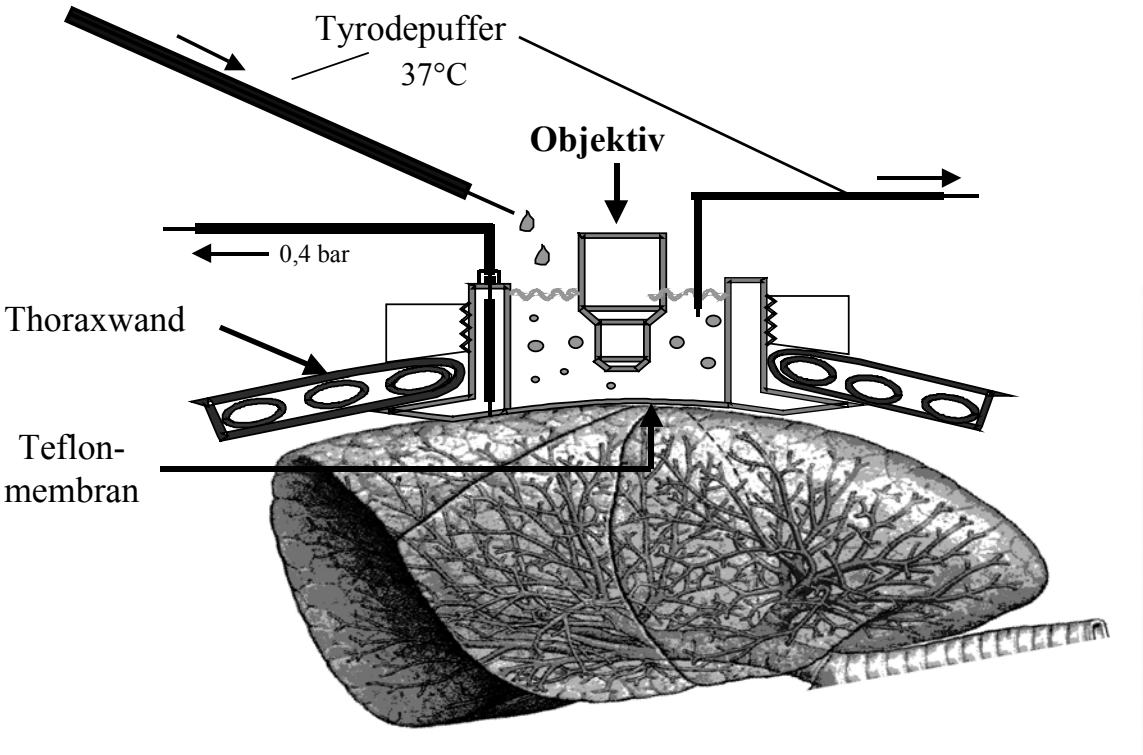

Abb. 5: Schematische Übersicht des implantierten Thoraxfensters. Ausführliche Beschreibung siehe Text.

2.5 Fluoreszenzmarkierung autologer Blutzellen

2.5.1 Ex-Vivo Markierung von Erythrozyten mit FITC

Zur Quantifizierung mikrohämodynamischer Paramter wurden als Tracer *ex vivo* mit Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) (Fluoreszein Isothiozyanate Isomer I No. F7250, Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) markierte Erythrozyten verwendet. Zu Beginn des Versuchs wurden dem Kaninchen hierfür aus der Ohrarterie ca. 5ml Vollblut in eine heparinisierte Spritze (Heparin-Natrium Braun, B.Braun Melsungen AG, Melsungen) abgenommen und die aus dem Vollblut separierten Erythrozyten gemäß der von Zimmerhackl *et al*. (186) etablierten und von Berger *et al*. (16) und Goetz *et al*. (60) modifizierten Methode markiert. Nach der Fluorezenzmarkierung wurden die Erythrozyten mit physiologischer NaCl-Lösung auf einen Hämatokrit von 0,5 verdünnt und nach Beendigung der gesamten Präparationsphase den Tieren 1,2 ml der verdünnten Lösung via A. carotis reinjiziert.

2.5.2 In vivo Markierung der Leukozyten mit Rhodamin 6G

Um Leukozyten in der pulmonalen Mikrostrombahn mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiern zu können, wurden die Leukozyten *in vivo* durch Bolusinjektion des lipophilen Fluoreszenzfarbstoffs Rhodamin 6G (Merck, Darmstadt, Deutschland) markiert. Rhodamin 6G ist ein positiv geladener Farbstoff, der sich spezifisch in der Mitochondrienmembran in Abhängigkeit von deren Membranpotential anreichert (5). Erythrozyten besitzen keine Mitochondrien und werden deshalb durch Rhodamin 6G nicht markiert. Gemäß Kübler *et al.* (86) wurde zur *in vivo* Färbung der Leukozyten ein Bolus von 0,3 ml/kg KG einer 0,2 mM (0,096 mg/ml) Rhodamin 6G Lösung i.v. appliziert.

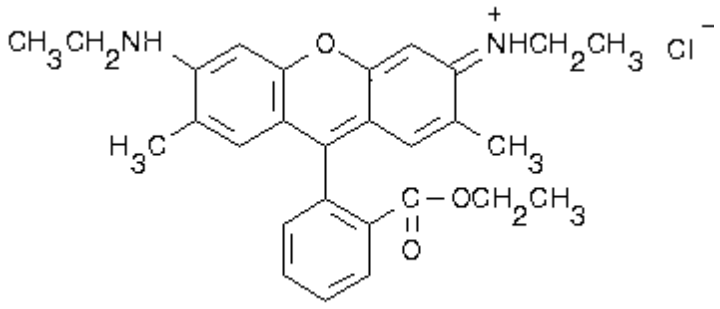

Abb. 6: Chemische Strukturformel des Fluorochroms Rhodamin 6G

2.5.3 Ex vivo Fluoreszenzmarkierung autologer Thrombozyten

Im Rahmen der Studie IV wurde erstmals die Kinetik von Thrombozyten und Thrombozyten/Endothel-Interaktion in allen Segmenten der pulmonalen Mikrozirkulation direkt mittels Fluoreszenzmikroskopie *in vivo* untersucht. Zur Fluoreszenzmarkierung der Thrombozyten nach der Methode von Massberg *et al*. (108) wurden zunächst 10ml Vollblut über den arteriellen Katether in 15ml Polypropylen-Röhrchen entnommen, die 3ml PBS-Puffer (PBS; Seromed, Berlin, Germany) und 0,55ml aqua ad injektabilita enthielt, in dem 15,2 µmol Zitratsäure, 30µmol Trisodiumzitrat, 40µmol Dextrose und 3µg Prostaglandin E_1 gelöst waren. Das Blut wurde anschließend bei 250g für 10 Minuten zentrifugiert und das so gewonnene plättchenreiche-Plasma in ein neues Röhrchen

abpipettiert, das 15,2 µmol Citratsäure, 30µmol Trisodiumcitrat, 40 µmol Dextrose und 3 µg Prostaglandin E_1 in insgesamt 0,55ml aqua ad injektabilita enthielt. Zur Fluoreszenzmarkierung wurde Rhodamin 6G (0,05%; 15µl/ml plättchenreichem Plasma) zugegeben und erneut bei 2000g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das verbleibende Zellsediment mit 2 ml PBS resuspendiert. Mittels Coulter A^cT counter (Coulter Corp., Miami, USA) wurde der Zellgehalt untersucht und die Fluoreszenzmarkierung durch flusszytometrische Messung kontrolliert. Die Plättchenanzahl in der Resuspension betrug in etwa 10^9.

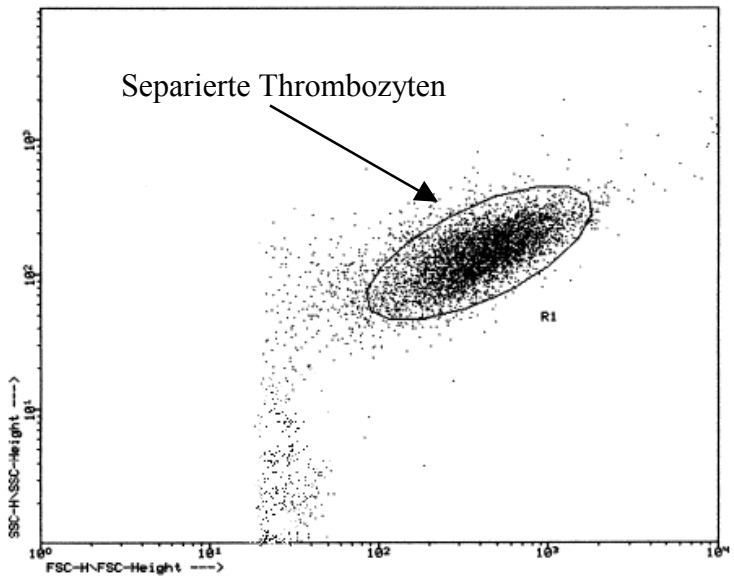

Abb. 7: Flusszytometrische Analyse der separierten und fluoreszenzmarkierten Thrombozyten.

Zur Untersuchung aktivierter Thrombozyten wurde die Plättchensuspension vor Injektion *in vitro* für 15 Minuten bei 25°C mit 5 U/ml humanem Thrombin (Thrombin, Sigma Chemicals, Deisenhofen, Deutschland) inkubiert. Die Überprüfung der Plättchenaktivierung erfolgte in vitro ebenfalls mittels Flußzytometrie. Als Marker der Thrombozytenaktivierung wurden vor, sowie nach der Thrombininkubation die Präsentation von P-Selektin und die Zunahme im Vorwärtsstreulicht resultierend aus einer Thombozytenaggregation untersucht. Die Thrombozytensuspension wurde hierfür mit 5 µg/ml eines FITC-markierten kreuzreagierenden P-Selektin Antikörpers (Maus-anti Human, Fa. Acris-Diagnostika, Hiddenhausen,) bei Raumtemperatur für 10 Minuten

inkubiert, anschließend mit D-PBS (Pan-Biotech, Aidenbach) gewaschen und flußzytometrisch analysiert. Wie auf Abbildung 8 dargestellt, zeigt sich nach der Inkubation der Thromboyten mit Thrombin eine Zunahme im Vorwärtsstreulicht, die als Folge einer Thrombozytenaggregation interpretiert werden kann. Die Präsentation von P-Selektin nimmt nach der Inkubation mit Thrombin deutlich zu. Dies kann aus der Zunahme Antikörper-markierter Thrombozyten um 44,7 % gefolgert werden.

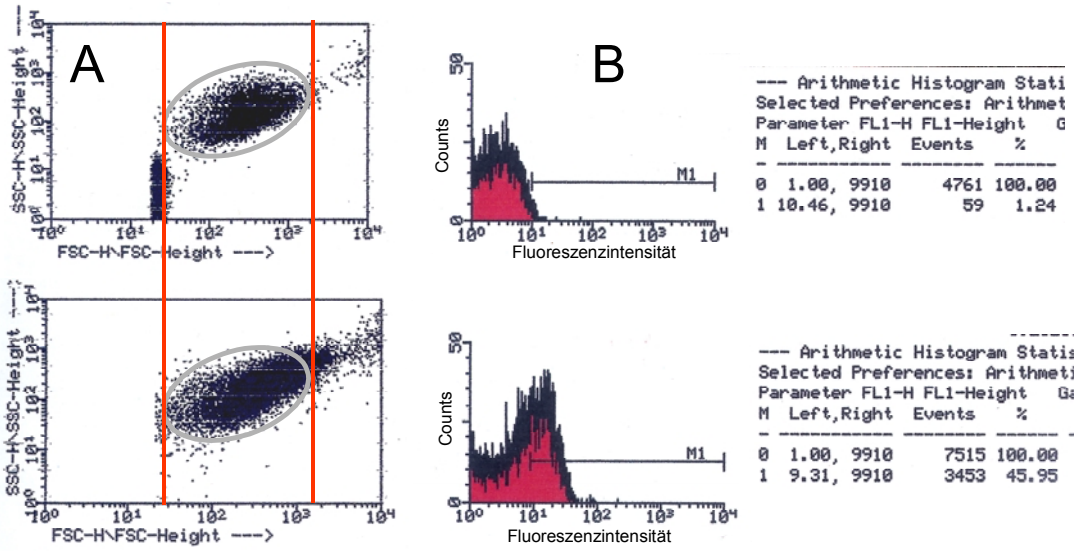

Abb. 8. Flußzytometrische Analyse der Thrombozytenaktivierung nach Thrombin-Stimulation. **A:** Als Folge der Thrombozytenaktivierung ist eine Zunahme im Vorwärtsstreulicht (x-Achse) zu beobachten. **B:** Nach Inkubation der Thrombozyten mit einem FITC-markierten, gegen P-Selektin gerichteten Antikörper erfolgt eine deutliche Zunahme FITC-markierter Thrombozyten.

2.6 Video-Fluoreszenzmikroskopie

2.6.1 Experimenteller Aufbau

Nach Implantation des Thoraxfensters wurde das Kaninchen samt untergelegter Heizplatte auf einen unter dem Fluoreszenzmikroskop plazierten, in alle Richtungen neigbaren Kipptisch gelagert. Der Kipptisch wurde derart geneigt, dass das Thoraxfenster in exakt horizontaler Ebene zu liegen kam. Das Fenster wurde mit einem eingeschraubten Metallstab an einem Mikromanipulator fixiert und derart tariert, dass das Gewicht des Fensters weder auf der Thoraxwand oder Lungeoberfläche lastete noch Zug auf die Präparation ausübte.

Die Kinetik der fluoreszenzmarkierten Erythroyzten und Leukozyten bzw. Thrombozyten in der subpleural gelegenen Lungenmikrostrombahn wurde mittels eines speziellen Intravitalmikroskops (Orthoplan; Leitz GmbH; Wetzlar) visualisiert und über eine Silikon-intensivierte Restlichtkamera (C2400-08, Fa. Hamamatsu, Herrsching) mit einem S-VHS Videorecorder (AG-7350, Panasonic, München) auf Videoband aufgenommen. Als Lichtquelle fand eine 75W Xenon-Lampe (XBO 75 W/2, Fa. Leitz, München) Verwendung. Das Licht passiert zunächst einen 7 mm Wärmeschutzfilter (Fa. Leitz München), eine variable Irisblende und einen Anregungsfilter des Fluoreszenzauflichtluminator (Ploemopak, Leica GmbH, Wetzlar). Über einen dichromatischen Teilerspiegel mit Refelxionskurzpaßfilter fällt das Licht durch das Objektiv (Wasser-Immersionsobjektiv 25x, n.A. 0,6, Leitz GmbH, Wetzlar) auf die Lungenoberfläche im Beobachtungsareal. Das aufgrund dieser Anregung von den Fluoreszenzfarbstoffen emmitierte Fluoreszenzlicht gelangt wiederum über das Objektiv, das gleichzeitig als Kondensor fungiert, zum Reflexionskurzpaßfilter. Am Filter wird das Licht nun aufgrund seiner höheren Wellenlänge abgelenkt und gelangt über einen Sperrfilter und einen weiteren Spiegel entweder zum Okular (Periplan 10x, Leitz GmbH, Wetzla oder direkt über einen C-Mount Adapter zur hochauflösenden Restlichtkamera. Mittels eines Videozeitgenerators (VTG 33, FOR-A-Company Ltd., Japan) wurden simultan Datum (MM-TT) und aktuelle Uhrzeit (hh:mm:ss:s/100) in das Videobild eingespielt. Die mikroskopischen Bilder wurden mit einer Frequenz von 50 Halbbildern/Sekunde auf Videoband aufgezeichnet und gleichzeitig zur Kontrolle in 930-facher Vergrößerung auf einem Videomonitor (WV-5470, Panasonic, München) dargestellt. Über einen motorgetriebenen Spindeltrieb (Fa. Leitz, München) und einen manuellen Mikro-/Makrofeintrieb waren Mikroskop- und Kameraaufbau in vertikaler Richtung beweglich. Das auf dem Kipptsich gelagerte Kaninchen konnte dagegen mit

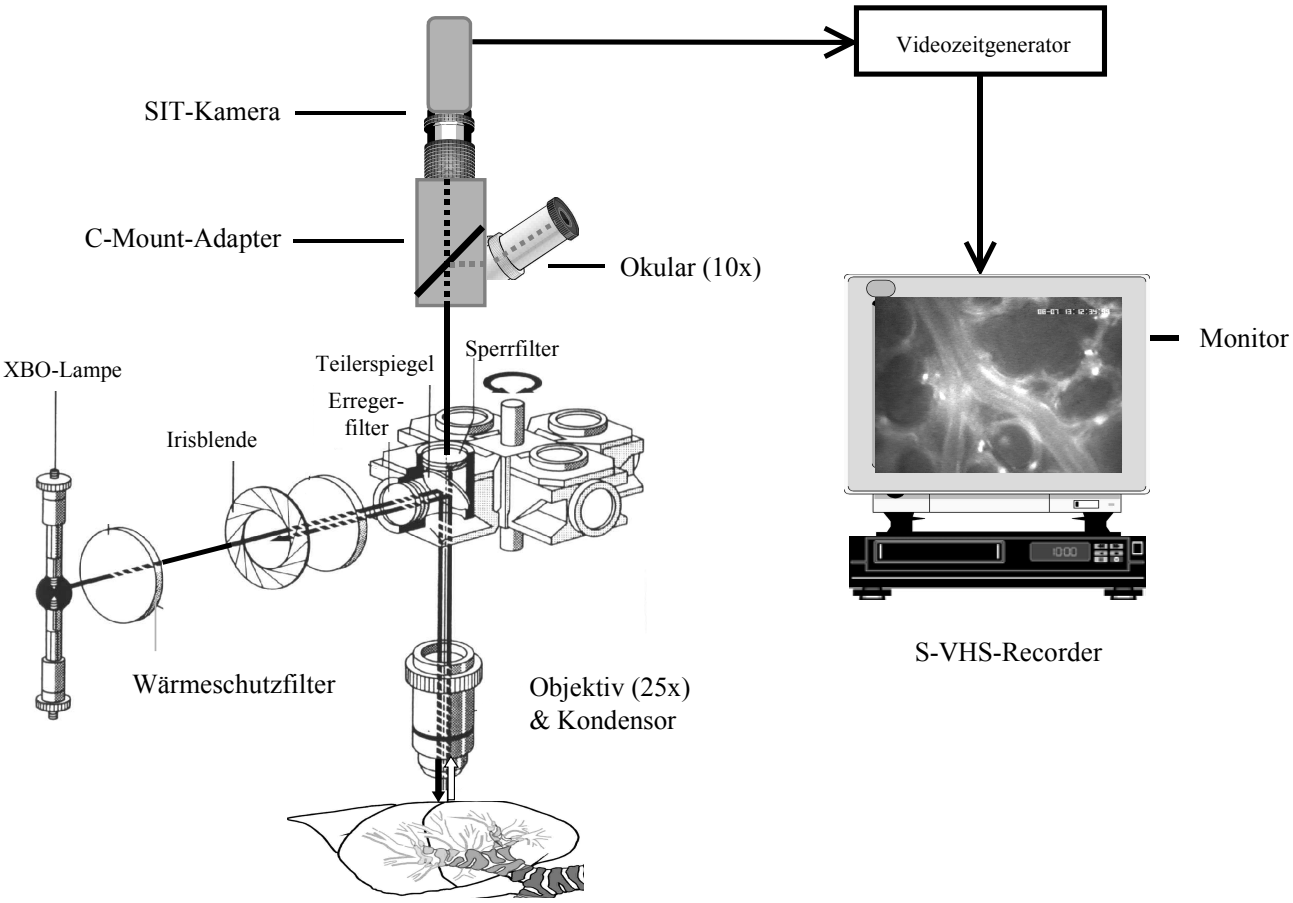

Abb. 9: Schematische Übersicht des experimentellen Aufbaus zur Intravital-Fluoreszenz-Mikroskopie der pulmonalen Mikrozirkulation. Ausführliche Beschreibung siehe Text.

Filterblock	Dargestellter Zelltyp	Anregungsfilter [nm]	Teilerspiegel [nm]	Sperrfilter [nm]
L3	RBC	BP 450 - 490	RKP 510	BP 525
N2	WBC / PLT	BP 530-560	RKP 580	LP 580
I2/3	RBC / WBC/ PLT	BP 450-490	RKP 510	LP 515

Tab. 2: Wellenlängenbereiche der in den verwendeten Filterblöcken eingebauten Anregungsfilter, Teilerspiegel und Sperrfilter (alle Bauteile: Fa. Leitz, München)
BP=Bandpassfilter, LP=Langpassfilter, RKP=Reflexionskurzpassfilter

Hilfe eines über einen Schrittmotor-getriebenen Kreuztisches mit elektronischer Steuerung und digitaler Koordinatenangabe (IXE.C, Phytron, Göbenzell) beliebig in horizontaler Ebene unter dem Mikroskop positioniert werden. Die gesamte Mikroskopieeinheit war zur Dämpfung von Erschütterungen auf einer schweren Granitplatte schwingungsfrei montiert, die wiederum auf einem Metallunterbau pneumatisch gelagert war.

2.6.2 Differenzierung der fluoreszenzmarkierten Zellen

Die Verwendung unterschiedlicher Anregungsfilter, Teilerspiegel und Sperrfilter ermöglicht bei gleicher Lichtquelle die differenzierte Darstellung der unterschiedlich fluoreszezmarkierten Erythrozyten und Leukozyten bzw. Thrombozyten. Die im Mikroskop integrierten Filterkombinationen waren dabei in Filterblöcken, L3, N2, I2/3 (Fa. Leitz, München) installiert und konnten durch Rotation gewechselt werden.

Zur Darstellung der FITC-markierten Erythrozyten diente der L3- Filterblock und zur Visualisierung ausschließlich der Leukozyten bzw. Thrombozyten der N2 Filterblock. Die Verwendung des I2/3-Filterblocks ermöglicht dagegen die simultane Beobachtung von FITC-markierten Erythrozyten und Rhodamin-6G-markierten Leukozyten bzw. Thrombozyten.

In Tabelle 3 sind die Anregungsmaxima und Emissionsmaxia der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe angegeben, sowie in Tabelle 2 die optischen Eigenschaften der in den Filterblöcken verwendeten Anregungsfilter, Teilerspiegel und Sperrfilter aufgeführt.

Farbstoff	markierter Zelltyp	Anregungsmaxima [nm]	Emissionsmaxima [nm]
FITC	Erythroyzten	490	525
Rhodamin 6G	Leukoz./Thromboz.	525	555

Tab. 3: Maximale Anregungs- und Emmissionswellenlängen der Fluoreszenzfarbstoffe FITC und Rhodamin 6G. Zusätzlich ist der mit dem jeweiligen Farbstoff markierte Zelltyp angegeben.

2.6.3 Atemzyklus und Mikroskopierareal

Die Inspirations und Exspirationsbewegungen der Lunge bewirken ein zyklisches Heraustreten der Lungenoberfläche aus der Focusebene und verhindern damit eine mikroskopische Untersuchung der pulmonalen Mikrozirkulaion während des normalen Atemzykluses. Die videomikroskopischen Sequenzen wurden deshalb während mehrerer inspiratorischer Plateauphasen von 5s Dauer aufgenommen. Zwischen den Plateauphasen erfolgte eine normale Ventilation des Versuchstiers. Durch die inspiratorischen Plateauphasen wurden außerdem die Fortleitung der kardialen Kontraktion auf die Lungenoberfläche minimiert.

Zu Beginn der Mikroskopie wurde zunächst die Lappengrenze zwischen rechtem Lungenmittel- und Lungenunterlappen im Mikroskop identifiziert und entlang des Randes des Lungenmittellappens ein für die Mikroskopie geeignetes Gefäßareal aufgesucht. Um einen möglichen Bias des Untersuchers hinsichtlich adhärenter Leukozyten bzw. Thrombozyten bei der Auswahl des Mikroskopierareals auszuschließen, wurde das Areal unter Verwendung des L3 Filterblocks, das lediglich die Darstellung der Erythrozyten ermöglicht, aufgesucht.

Während mehrerer 5 Sekunden langer Inspirationsphasen wurden dann zu unterschiedlichen Versuchzeitpunkten jeweils 1-2 Arteriolen, 1-2 Venolen und jeweils ein Kapillarareal unter aufeinanderfolgender Verwendung des L3 und N2 Filterblocks dargestellt und auf Videoband aufgezeichnet. Der Computergesteuerte Kreuztisch gewährleistete die sichere Identifizierung und Beobachtung der identischen Gefäßareale zu unterschiedlichen Versuchszeitpunkten, so daß ein direkter quantitativer Vergleich zwischen den einzelnen Phasen möglich war.

Ausgewählt wurden nur Gefäßareale, die sich scharf und mit deutlichen Gefäßgrenzen in der Focusebene darstellten und kontinuierlichen Erythrozytenfluß zeigten.

2.7 Lipopolysacharid

Lipopolysacharid (LPS) ist Bestandteil der äußeren Schicht der Hüllmembran gramnegativer Bakterien. Es besteht aus dem Lipid A, einem Protein, dem Kernpolysacharid (Core) sowie der O-spezifischen Polysacharidkette (O-Kette).

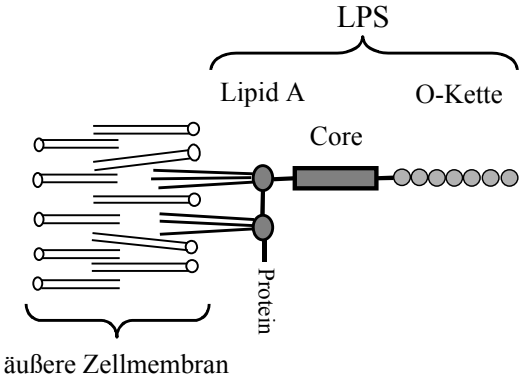

Abb. 10: Schematische Darstellung des Endotoxinmakromoleküls mit den für die toxische Wirkung verantwortlichen Komponenten: Lipid A sowie die Polysacharidkette, die in die Kernregion (Core) und das O-Antigen unterteilt wird.

Das thermostabile LPS wird nach Zelllyse und in geringeren Konzentrationen auch im Rahmen einer mitotischen Zellteilung freigesetzt. Die toxische Wirkung des freigesetzen LPS (Endotoxin), wird primär durch das Lipid A vermittelt.

Zur Induktion einer experimentellen Endotoxinämie wurden in der Studie II den Versuchstieren Lipopolysacharid des Eschericia Coli Stamms 0111:B4 intravenös als Bolus injiziert. Das LPS (Sigma Chemie, Deisenhofen) wurde in Aqua ad injektabilita in einer Konzentration von 20 µg/ml gelöst und in Aliquots zu je 1ml bis kurz vor der Injektion bei –70^{o}C gelagert.

2.8 Arachidonsäure

Arachachidonsäure (20:4; ω6) gehört gemäß der chemischen Struktur zur Gruppe mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Pufa=**P**oly**u**nsaturated **f**atty **a**cids). ω-6 steht für die Stellung der ersten Doppelbindung, die 6 C-Atome vom OH-Ende der Fettsäure aus entfernt liegt. Abbildung 10 zeigt die chemische Strukturformel der Arachidonsäure.

Um die Wirkung der Arachidonsäure auf die Entwicklung eines akuten Lungenschadens hin zu untersuchen, wurde in Studie II und Studie III jeweils einer Versuchsgruppe freie

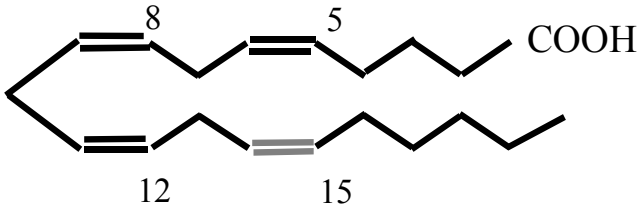

Abb. 11: Chemische Strukturformel der Arachidonsäure

Arachidonsäure intravenös über die marginale Ohrvene mittels Infusionspumpe infundiert. Die freie Arachidonsäure (Fa. Braun-Melsungen, Melsungen, Deutschland) stand in Glasampullen zu je 5ml in 1 prozentiger Lösung zur Verfügung, als Lösungsmittel für die unpolare Arachidonsäure diente eine 10-prozentige Emulsion aus mittelkettigen Triglyceriden (MCT) (Fa. Braun-Melsungen, Melsungen, Deutschland). MCTs enthalten in veresterter Form gesättigte Fettsäuren mit einer Länge von 12-14 Kohlenstoffatomen. Für die Vorversuche und die Studien I und II wurden jeweils unmittelbar vor Infusionsbeginn entsprechende Verdünnungen der Arachidonsäure durch weitere Zugabe der 10%igen MCT-Lösung hergestellt.

2.9 Bestimmung von Triglyceriden und Arachidonsäure im Plasma

Zur Quantifizierung der Plasmatriglyceridkonzentration wurden Plasmaproben nach einem Standardverfahren im Institut für klinische Chemie, Klinikum Großhadern der LMU-München untersucht. Die Konzentration von Arachidonsäure im Plasma wurde gemäß dem unter 1.2 beschriebenen Verfahren gemessen.

2.10 Bestimmung der Thromboxan B_2 Konzentration im Plasma

Eine Reihe verschiedener Zellen und Gewebe kann aus Arachidonsäure durch Prostaglandin-Endoperoxidasen biologisch potent wirksames Thromboxan A_2 bilden. Thromboxan A_2 stellt ein äußerst labiles bizyklisches Produkt dar, das mit einer Halbwertszeit von 30 sec. in sein stabiles, biologisch inaktives Abbauprodukt Thromboxan B_2 hydrolysiert wird. Die kurze Halbwertszeit von Thromboxan A_2 verhindert seine Bestimmung in physiologischen Konzentrationen. Ein zuverlässiges Maß für die Bildung von Thromboxan A_2 liefert daher die Bestimmung des Abbauprodukts Thromboxane B_2, das eine Halbwertszeit von ca. 20 - 30 Minuten besitzt.

Die Thromboxan B_2 Messung im Kaninchenplasma wurde mittels eines kommerziell erhältlichen Enzyme Immunoassay Kits (Thromboxane B_2 Enzyme Immunoassay Kit, Cat# 519031, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA) durchgeführt.

2.10.1 Aufarbeitung der Plasmaproben

Zu entsprechenden Versuchszeitpunkten wurde dem Kaninchen jeweils 1,5 ml Vollblut in eine eisgekühlte, heparinisierte Spritze abgenommen, die Blutprobe unmittelbar nach der Abnahme bei 3000 U/min und 4^{o}C zentrifugiert und der Überstand bis zur weiteren Aufarbeitung bei -70^{o}C gelagert.

Zur weiteren Analyse wurde das gebildete TxB_2 zunächst aus den Plasmaproben extrahiert: 400 µl der Probe wurden mit 2 ml Ethanol versetzt, 5 min bei 4°C inkubiert und anschließend bei 3000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert, um sämtliche Proteine aus der Probe zu fällen. Der Überstand wurde in ein neues 10 ml Glasröhrchen dekantiert, mit 8 ml Wasser (Ultrapur, Merck KGaA, Darmstadt) verdünnt und mit HCl auf einen pH-Wert von 4.0 eingestellt.

Anschließend wurden Reversed Phase C-18 Kartuschen (Sep-Pak Vac C18 1CC, Waters GmbH, Eschborn) für die folgende Festphasenextraktion durch Spülen mit 5 ml Ethanol und 5 ml Ultrapure Wasser aktiviert und die verdünnte Probe mittels Vakuumpumpe (Vak Elut) langsam durch die Kartusche gesaugt. Interferierende Substanzen wurden mit 5 ml Ultrapure Wasser und 5 ml HPLC grade Hexan ausgewaschen und schließlich das TxB_2 mit Ethylacetat, das 1% Methanol enthielt, eluiert. Das Ethylacetat wurde vollständig unter einem konstanten Stickstoffstrom eingedampft und der Bodensatz mit 450 µl des im Enzym Immunoassays enthaltenen EIA-Puffers resuspendiert.

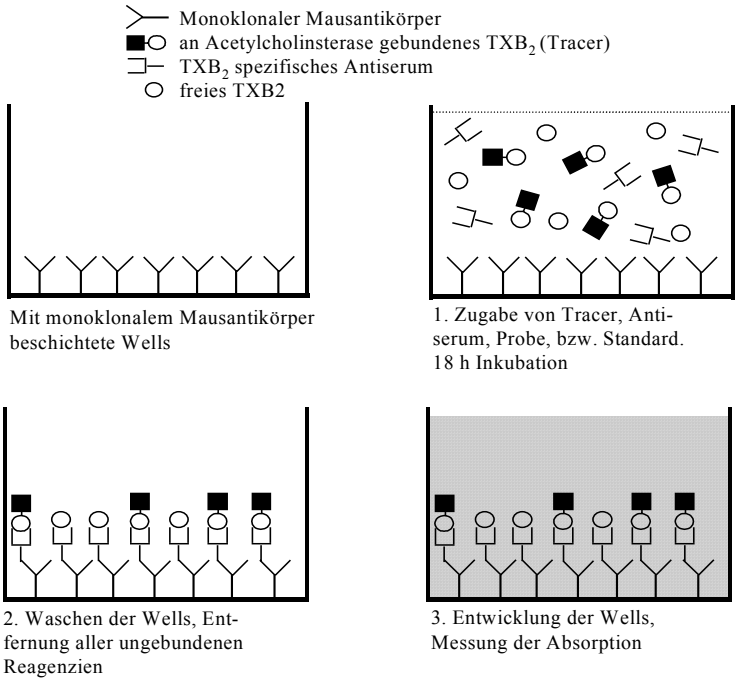

Abb. 12: Schematische Übersicht des Prinzip des verwendeten Enzym Immunoassays zur Bestimmung der Thromboxan B_2 Konzentration im Serum. Ausführliche Beschreibung siehe Text.

2.10.2 Enzym Immunoassay

Der Enzym Immunoassay basiert auf der Konkurrenz zwischen freiem, in der Probe enthaltenem, Thromboxan B_2 und einem Thromboxan B_2-Tracer (an Acetylcholinesterase gekoppeltes TxB_2) um eine limitierte Anzahl von Bindungsstellen an TxB_2-spezifischem Kaninchen Antiserum. Die Konzentration des TxB_2-Tracers ist hierbei bekannt und konstant, während die Konzentration der Probe variiert. Die Menge des TxB_2-Tracers, die an das Kaninchen Antiserum binden kann, ist somit indirekt proportional zur Konzentration von freiem TxB_2.

Für den Assay wurden jeweils 50 µl des resuspendierten Eluates, 50 µl Thromboxan B_2 Acetylcholinesterase-Tracer und 50 µl Thromboxane B_2-Antiserum auf einer Mikrotiterplatte in jeweils ein Well pipettiert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur 18 Stunden lang inkubiert, die Wells entleert und fünf mal mit Puffer gewaschen. Schließlich wurde jedes Well mit 200 µl Ellman`s Reagent entwickelt und nach 60 Minuten die Absorption mit Hilfe eines automatischen Mikrotiterplattenlesegerätes (Dynex MRX II, Dynex, Deutschland) bestimmt. Pro Mikrotiterplatte wurde jeweils eine TXB_2-Standardkurve gemessen sowie Totalaktivität, Nicht-Spezifische-Bindung und Maximale Bindung bestimmt. Mit Hilfe eines Computerprogramms wurde anschließend die ursprüngliche Plasmakonzentration berechnet.

2.11 Myeloperoxidase-Assay

Zur Quantifizierung der Granulozytenakkumulation in der pulmonalen Strombahn wurden Lungengewebeproben hinsichtlich der Myeloperoxidaseaktivität mittels des von Kübler *et al*. (87) etablierten Assays untersucht.

Die Myeloperoxidase (MPO), ein 145 κD großes Protein, wird in der azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten gespeichert und beträgt rund 6,8 % des Trockengewichts des Granulozyten (26). Der Myeloperoxidasegehalt in mononukleären Zellen ist demgegenüber um Zehnerpotenzen niedriger (84). Die Myeloperoxidase gilt deshalb als spezifisches Markerenzym der neutrophilen Granulozyten und die MPO-Aktivität im Lungengewebe ist somit direkt proportional der Anzahl akkumulierter neutrophiler Granulozyten. Die Myeloperoxidase dient in erster Linie der oxidativen Zerstörung phagozytierter Mikroorganismen und katalysiert hierbei folgende Reaktionsgleichung:

$$H_2O_2 + Cl^- + H^+ \rightarrow HOCl + H_2O$$

Durch Oxidation von Chloridionen mit Hilfe des vom NADPH-Oxidase Systems gebildeten Wasserstoffperoxids entsteht das eigentlich potent toxisch wirkende Agens hypochlorige Säure (HOCL).

Die Myeloperoxidaseaktivität im Lungengewebe kann mittels photometrischer Nachweisreaktion bestimmt werden. Hierzu ist zunächst die Isolierung der Myeloperoxidase aus dem Lungengwebe notwendig.

2.11.1 Isolierung der Myeloperoxidase

Die bei –70°C gelagerten Gewebeproben wurden mit einer Feinwaage gewogen und mit 1 ml gekühltem 0,02 M Kaliumphosphatpuffer (ph 7,4; Fa. Merck, Darmstadt) im Potter (Typ 853203, Fa. E. Braun, Melsungen) homogenisiert. Das Homogenisat wurde anschließend 15 min bei 4°C und 20000 U/min in einer Ultrazentrifuge (R5C5, Dupont De Nemours GmbH, Bad Homburg, Deutschland) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet im Wasserbad bei 60°C für 2h inkubiert. Zur Lyse der Granulozyten und vollständigen Freisetzung der Myeloperoxidase aus der azurophilen Granula wurde das Sediment mit 1 ml einer 0,5 %igen HTAB-Lösung versetzt, soniziert, 3 mal bei –70°C eingefroren, aufgetaut und anschließend nochmals soniziert. Die Lösung wurde dann erneut bei 4°C und 20000 U/min für 15 min zentrifugiert und der Überstand, der für die folgende photometrische Reaktion als Probe diente, vorsichtig abpipettiert.

2.11.2 Messung der MPO-Aktivität

In der Nachweisreaktion wird das Chromogen 3,3`-5,5´-Tetramethylbenzidin (TMB, Sigma Chemie, Deisenhofen, Deutschland) in Abhängigkeit der Myeloperoxidaseaktivität durch H_2O_2 oxidiert.

TMB nimmt nach Oxidation eine blau-grüne Farbe an. Die Kinetik der hieraus resultierende Extinktionsänderung wird bei 625 nm im Photometer bei standardisierter Temperatur von 25°C gemessen werden. Die Extinktionsänderung pro Zeiteinheit dE/dt ist direkt proportional zur MPO-Aktivität der Probe.

Nach Nullpunktkalibrierung des Photometers wurden für den Assay in eine Küvette 150µl H_2O_2 Lösung (0,6 mM, Perhydrol, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) und 150 µl TMB Lösung (1,6 mM, gelöst in DMSO, Sigma Chemie, Deisenhofen, Deutschland) pipettiert und anschließend die Enzym-Reaktion durch Zugabe von 300 µl der jeweiligen Probe gestartet.

2.12 Lichtmikroskopische Untersuchung

Für die Lichmikroskopische Untersuchung wurden Lungengewebeproben mit 10 prozentiger Formalinlösung fixiert, in Paraffin eingebettet und mit Hilfe eines Mikrotoms (Hn 40, Fa. Reichert und Jung (Leica), Bensheim) 3µm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf einem Objektträger auftragen, eine Naphthol AS-D Chloroacetat Esterasefärbung (Naphthol AS-D Chloroacetate Kit, # 91-C, Sigma Diagnostics, St.Luis, USA) durchgeführt und die Schnitte mit Hematoxylin gegengefärbt. Die mit einem Deckglas verschlossenen Präparate wurden bei unterschiedlichen Vergrößerungen (10, 20, 40, 100X) im Lichtmikroskop (Axiophot, Fa. Zeiss) hinsichtlich histopathologischer Veränderungen beurteilt.

2.13 Quantifizierte Parameter

2.13.1 Makrohämodynamik und pulmonalvaskulärer Widerstand

Über die in die A. Carotis dextra, V. jugularis interna und A. pulmonalis implantierten Katheter wurden kontinuierlich die systolischen und diastolischen Werte des arteriellen (AP), zentralvenösen (CVP) und pulmonalarteriellen (PAP) Blutdrucks gemessen und gleichzeitig zur Kontrolle die Druckkurven auf einem Oszilloskop (Fa. Siemens, Erlangen) dargestellt. Der AP wurde mit einer Auflösung von 50 mmHg = 10 mm, CVP und PAP mit einer Auflösung von 10 mmHg = 10 mm auf einem Mehrkanalschreiber (Oscilloreg, Fa. Siemens, Erlangen) während der Meßphasen bei einem Papiervorschub von 50 mm/s aufgezeichnet. Der mittlerer Druck errechnet sich dabei wie folgt aus den gemessenen systolischen (P_s) und diastolischen (P_d) Werten:

$$P_m = P_d + \frac{P_s - P_d}{3} \qquad [1]$$

Anhand der Anzahl der systolischen Druckmaxima pro Zeiteinheit wurde die Herzfrequenz (HR) ermittelt.

Nach Messung der Injektattemperatur und der Temperaturänderung in der Aorta abdominalis berechnet der HZV-Computer anhand der modifizierten Stewart-Hamilton-Gleichung unter Berücksichtigung der spezifischen Gewichte und spezifischen Wärmekapazitäten des Blutes und des Injektats das Herzzeitvolumen:

$$CO = \frac{V_I \times (T_B - T_I) \times C_I \times \sigma_I \times 60 \times C_T}{\sigma_B \times C_B \times \int_0^\infty \Delta T_B(t)\, dt} \qquad [2]$$

CO	Herzzeitvolumen	[l/min]
V_I	Volumen des Injektates in	[ml]
$T_{B/I}$	Temperatur Blut / Injektates	[^oC]
$\sigma_{B/I}$	Dichte Blut / Injektat	[kg/m^3]
$C_{B/I}$	spezifische Wärmekapazität Blut / Injektat	[$J*kg^{-1}*K^{-1}$]
C_T	Katheterkonstante	
$\int_0 \Delta T_B(t)\, dt$	Integral der Thermodilutionskurve	[$^oC\ sec^{-1}$]

Die Dichte von Blut und 0,9%iger Kochsalzlösung beträgt 1,045 bzw. 1,005 kg/m^3, die spezifische Wärmekapazität 0,87 bzw. 0,997 J*kg^{-1}*K^{-1}. Die Kathterkonstante C_T muß als Korrekturfaktor eingeführt werden, da die Injektattemperatur aufgrund von Flüssigkeitsresten im Katheterlumen und Erwärmung des Injektats während der Injektion nicht exakt der Temperatur des in die Vena cava superior gelangenden Bolus entspricht. C_T wurde für den von uns verwendeten Katheter empirisch ermittelt und betrug 0,06.
Zur Bestimmung des Herzzeitvolumens zu entsprechenden Versuchszeitpunkten wurden jeweils 3 Messungen durchgeführt und anschließend das arithmetische Mittel berechnet.
Der systemisch vaskuläre Widerstand (SVR) wurde aus arteriellem Blutdruck, zentralvenösem Blutdruck und Herzzeitvolumen abgeleitet:

$$SVR = \frac{AP_m - CVP_m}{CO} \qquad [mmHg \times l^{-1} \times min] \qquad [3]$$

Als Maß des pulmonalvaskulären Widerstandes (PVR) wurde aus pulmonalarteriellem Mitteldruck und Herzzeitvolumen der PVR-Index nach folgender Formel berechnet:

$$PVR - Index = \frac{PAP_m}{CO} \qquad [mmHg \times l^{-1} \times min] \qquad [4]$$

2.13.2 Blutgasanalyse und peripheres Blutbild:

Während jeder Versuchsphase wurden aus dem arteriellen Katheter ca. 80µl Blut in eine heparinisierte Glaskapillare (Clinitubes, Fa. Radiometer, Kopenhagen) zur Blutgasanalyse und ca. 0,5 ml Blut in eine heparinisierte (Heparin, Fa. Ratiopharm Gmbh & Co., Ulm) Spritze zur Analyse des peripheren Blutbildes entnommen. Mittels eines Blutgasanalysegerätes (Chiron Diagnostics, Fernwald, Deutschland) wurden die Partialdrucke von Sauerstoff (PaO_2) und Kohlendioxid ($PaCO_2$), der pH-Wert (pH) und die Bicarbonatkonzentration ($HCO3^-$) im arteriellen Blut bei 37°C gemessen und der Basenüberschuß (BE) berechnet. Da die Körpertemperatur der Versuchstiere während des gesamten Versuches auf konstant 37 ±0,5 °C gehalten wurde, erübrigt sich eine Temperaturkorrektur der Blutgaswerte.
In einem Coultergerät (Coulter A^CT Counter, Coulter Corp., Miami, USA) wurden Erythrozyten – (RBC), Leukozyten- (WBC) und Thrombozytenzahlen (PLT), Hämoglobingehalt (Hb) und Hämatokrit (Hk) im peripheren arteriellen Blut bestimmt.

2.13.3 Intravitalmikroskopische Parameter

2.13.3.1 Off-line Analyse am Monitor

Gefäßdurchmesser, Mikrohämodynamik und Leukozyten- bzw. Thromboyztenkinetik in den untersuchten Gefäßen wurden durch off-line Analyse der aufgezeichneten Videosequenzen am Bildschirm bei 930-facher Vergrößerung quantifiziert. Die Eichung des optischen Systems in der Horizontal- und Vertikalebene des Monitors erfolgte durch Ausmessung von unter Versuchsbedingungen aufgenommenen Mikrometerskalen (Leica, GmbH, Wetzlar). Untersuchungen von Kübler (86) zufolge beträgt die Meßgenauigkeit des Bilverarbeitungssystems ± 1µm.

Die Analyse am Monitor erfolgte interaktiv mittels eines computergestützten Bildverarbeitungssystems (Optimas, Bioscan, Edmonds, Washigton, USA) und eines von Kuhnle entwickelten Datenverarbeitungsprogramms. Ein am Personalcomputer angeschlossener Mouse gesteuerter Cursor ermöglichte die Einblendung von Markierungen in die videofluoreszenzmikroskopischen Bilder. Die Längen einzelner Markierungslinien bzw. die Größe markierter Flächen wurden interaktiv in eigens konzipierte Datensheets des Tabellenkalkulationsprogramms MS-Excel (MS-Excel, Microsoft GmbH, München) eingelesen.

Sehr kleine Gefäßdurchmesser, geringe Blutfließgeschwindigkeit bei niedrigem Zellflux, sowie ein auf 5 Sekunden begrenzte inspiratorische Plateauphase limitierten die quantitative Analyse der Mikrohämodynamik in einzelnen Kapillarsegmenten. Deshalb wurden ganze Kapillarareale umgeben von Alveolarsepten analysiert.

Die in den alveolären Kapillarnetzwerken quantifizierten Parameter unterscheiden sich von den in singulären Arteriolen uind Venolen erfaßten und werden deshalb im folgenden gesondert abgehandelt.

1 Gefäßdurchmesser

2 FITC-Erythrozyt

3 Alveolarseptenbreite

..... Alveolarfläche

Erythrozytenwege durch Kapillarnetzwerk

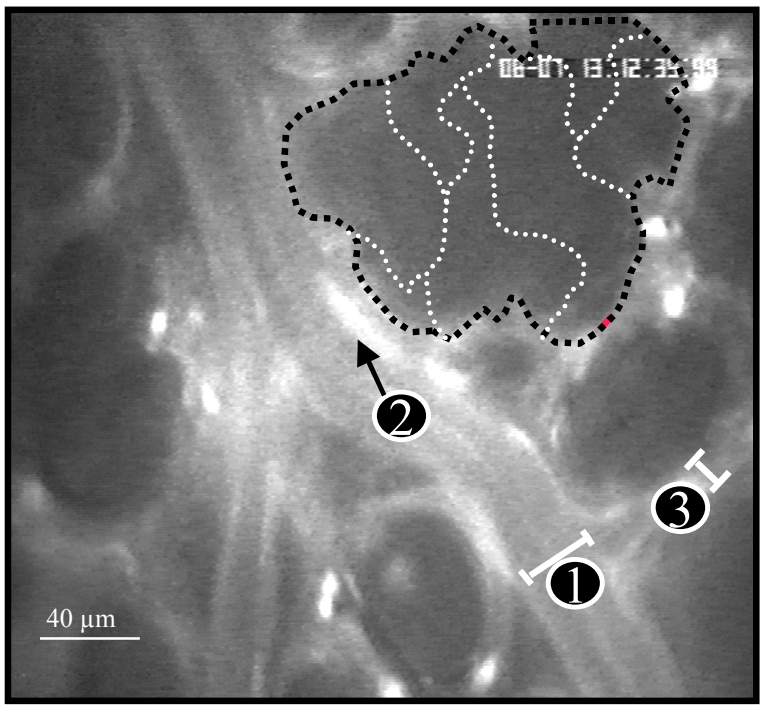

Abb. 13: Intravitalmikroskopisches Bild der pulmonalen Mikrozirkulation. Im FITC-Modus stellt sich eine pulmonale Venole mit einem Gefäßdurchmesser von ca. 30µm dar, in der FITC-markierte Erythrozyten fließen.

2.13.3.2 Gefäßdurchmesser

Nach der Reinjektion der FITC-markierten Erythrozyten kommt es trotz mehrfacher vorheriger Waschvorgänge der Erythrozytensuspension durch noch vorhandenes freies FITC und ebenso durch geringe FITC Verluste der markierten Zellen zu einer leichten Anfärbung der Gefäßinnenwände. Der Durchmesser der untersuchten Arteriolen und Venolen kann deshalb auf dem Videoschirm (Videomonitor WV5470, Fa. Panasonic, München) mit Hilfe des Bildverarbeitugssystems als Distanz der gegenüberliegenden Gefäßinnenwände quantifiziert werden. Abb. 13 zeigt unter anderem die Bestimmung des Gefäßdurchmesssers (D) einer perfundierten Venole.

2.13.3.3 Mittlere Erythrozytenfließgeschwindigkeit

In den untersuchten pulmonalen Arteriolen und Venolen wurde die Geschwindigkeit v_{RBC} einzelner passierender FITC-markierter Erythrozyten als Quotient der zurückgelegten Wegstrecke Δs und des dazu benötigten Zeitintervalls Δt berechnet.

Die Bestimmung des zurückgelegten Weges erfolte in axialer Gefäßrichtung durch Bild-zu-Bild Analyse mit Hilfe des Bildverarbeitungssystems, die des Zeitintervalls Δt anhand

der in die Videobilder eingeblendete Zeitanzeige. Die mittlere Erythrozytenfließgeschwindigkeit v_{rbc} wurde nach Sarelius und McKinlay (140) und Sachs (139) als harmonisches Mittel der Fließgeschwindigkeiten v_{rbc} von n Einzelerythrozyten

$$\overline{v}_{RBC} = n \times 1 / \quad (1/v_{RBC\,1}, 1/v_{RBC\,2}, 1/v_{RBC\,3}, \ldots 1/v_{RBC\,n}) \qquad [5]$$

nach folgender Formel berechnet:
Nach Sarelius und McKinlay ergibt sich für v_{RBC} ein Variazionskoeffizient CV_{VRBC} von:

$$CV(\overline{v}_{RBC}) = \sqrt{[\sigma^2(\overline{v}_{RBC})} \;/\; (n \times \overline{v}_{RBC}{}^2)] \qquad [6]$$

Dabei entspricht σ^2 derVarianz der Einzelmeßwerte v_{RBC}. Die Fließgeschwindigkeit einzelner Erythrozyten wurde solange gemessen, bis CV_{VRBC} unter 10% lag. Hierfür war meist die Geschwindigkeitsmessung von 20 Einzelerythrozyten notwendig.

2.13.3.4 Blutvolumenfluß und Wandscherrate

Der Blutvolumenfuß Q in einem Gefäß, d.h. das Blutvolumen, das pro Zeiteinheit einen imaginären Gefäßquerschnitt passiert, kann aus dem Gefäßdurchmesser D und der Blutfließgeschwindigkeit V_Q errechnet werden. Unter Berücksichtigung des Faehreus-Effektes (48) läßt sich V_Q wiederum aus der mittleren Erythrozytenfließgeschwindigkeit v_{RBC} ableiten. Bei der Ableitung von V_Q aus v_{RBC} gilt, daß das Verhältnis zwischen dynamischem Mikrohämatokrit (Tubular Hematocrit, H_T) im untersuchten Gefäß und Abflußhämatokrit (Discharge Hematocrit, H_D) dem Verhältnis zwischen V_Q und v_{RBC} entspricht (130). Für jede Arteriole und Venole wurde das jeweilige Verhältnis zwischen H_T / H_D nach der Methode von Pries *et al*. (130) berechnet:

$$H_T/H_D = H_D + (1-H_D) \times (1+1{,}7\times e^{-0{,}415 \times D} - 0{,}6\times e^{-0{,}011 \times D}) \qquad [7]$$

Hierbei wurde angenommen, daß H_D annährend dem im aortalen Blut gemessenen systemischem Hämatokrit Hk entspricht. V_Q wurde dann bestimmt als:

$$v_Q = \overline{v}_{RBC} \times H_T / H_D \qquad [8]$$

Daraus folgend ergibt sich unter Annahme einer zylindrischen Gefäßgeometrie die Berechnung von Q [nl/min] als:

$$Q = v_Q \times (D/2)^2 \times \pi \times 60 \ / \ 10^6 \qquad [9]$$

Da an der intravasalen Gefäßwand auftretende Scherkräfte insbesondere bei der Interpretation der Leukozyten-Endothelzellinteraktion berücksichtigt werden müssen, wurde die Wandscherrate γ unter Verwendung des Poiseuille´schen Gesetzes für Newtons`sche Flüssigkeiten und Annahme einer zylindrischen Gefäßgeometrie berechnet als:

$$\gamma\ \gamma = 8 \times V_Q / D \qquad [10]$$

2.13.3.5 Anzahl Endothel-adhärenter Leukozyten

Die Anzahl der endotheladhärenten Leukozyten wurde in einem definierten Gefäßsegment der Länge L_{Seg} bestimmt und auf die innere Gefäßwandoberfläche des Segments bezogen. Adhärente Leukozyten wurden als Zellen definiert, die innerhalb des Beobachtungszeitraums von 5s ihre Lokalisation am Endothel nicht änderten.

Wiederum unter Annahme einer zylindrischen Gefäßgeometrie kann die Anzahl Endothel-adhärenter Leukozyten pro mm^2 Gefäßwandoberfläche (Ad) wie folgt bestimmt werden, wobei n die Anzahl der in diesem Gefäßsegment identifizierten ortsständigen Leukozyten darstellt:

$$Ad = n / (D \times \pi \times L_{seg}) \times 10^6 \qquad [11]$$

2.13.3.6 Thrombozytenfließgeschwindigkeit in Arteriolen und Venolen

Die in Versuchsstudie IV untersuchten Thrombozyten wurden in fließende sowie Endothel-adhärente Thrombozyten klassifiziert. Die mittlere Fließgeschwindigkeit der frei fließenden Thrombozyten wurde analog der Erythrozyten sowie der nach Kübler

$$\overline{v}_{PLT} = n \times 1 \ / \ \ (1/v_{PLT\,1}, 1/v_{PLT\,2}, 1/v_{PLT\,3}, \ldots 1/v_{PLT\,n}) \qquad [12]$$

quantifizierten mittleren Leukozytenfließgeschwindigkeit als harmonisches Mittel der Thrombozyten (n>30), die einen definierten Gefäßquerschnitt passierten nach folgender Formel berechnet:

Als endothel-adhärente Thrombozyten wurden Blutplättchen definiert, die über einen Untersuchungszeitraum von 5s ihre Lokalisation am vaskulären Endothel nicht veränderten. Die Anzahl wird wiederum analog gemäß der Formel [11] zur Berechung der endothel-adhärenten Leukozyten auf die Gefäßwandoberfläche des untersuchten Gefäßabschnittes bezogen angegeben.

2.13.3.7 Fläche des Alveolarareals, Länge der perfundierten Kapillarstrecke

Die subpleurale Wandfläche einer untersuchten Alveole A_{Alv} wurde mit Hilfe des Mouse Cursor durch Umfahren markiert und anschließend durch das Bildverarbeitungssystem die Fläche des Kapillararelas berechnet.

Mit Hilfe des Bildverarbeitungssystems wurde im alveolären Kapillarareal die Länge der erythrozytenperfundierten Kapillarstrecke L_{ALV} erfaßt. Hierbei dienten die FITC-markierten Erythrozyten als Indikatoren der perfundierten Kapillaren. Der Passageweg jedes FITC-markierten Erythrozyten wurde mit dem Mouse-Cursor am Videobildschirm exakt nachgefahren und interaktiv die zurückgelegte Wegstrecke durch die Bildverarbeitungssoftware berechnet. Die zurückgelegten Wegstrecken aller in diesem Zeitraum passierenden Erythrozyten wurden zu einer Gesamtlänge der erythrozyten perfundierten Kapillarstrecke addiert. Dabei wurde darauf geachtet, daß mehrfach perfundierte Kapillarstrecken nur einmal in die Berechnung eingingen.

2.13.3.8 Kapillarer Perfusions-Index (CPI)

Nach der Methode von Wagner und Latham (174) wurde aus den Parametern A_{ALV} und L_{ALV} der funktionelle kapillare Perfusionsindex (CPI) bestimmt. Nur von Plasma perfundierte Kapillarsegmente gingen in diesem Modell nicht in die Berechnung des CPI ein. Der CPI diente somit als Mass für Dichte der von Erythrozyten perfundierten Kapillaren im Alveolarareal. Der CPI bezieht sich dabei auf eine mittlere Oberfläche der Einzelalveolen von 10000 μm^2 und berechnet sich nach folgender Formel:

$$CPI = L_{ALV} / A_{ALV} \times 10000 \mu m^2 \qquad [13]$$

2.13.3.9 Erythrozytenfließgeschwindigkeit in Kapillaren

Analog zur Bestimmung der Erythrozytenfließgeschwingdigkeit in Arteriolen und Venolen wurde auch in den Alveolarkapillaren die Geschwindigkeit jedes innerhalb der Beobachtungsphase von 5s passierenden FITC-markierten Erythrozyten anhand des Quotienten $\Delta s/\Delta t$ bestimmt und die mittlere Erythrozytenfließgeschwindigkeit v_{RBC} als harmonisches Mittel der Einzelerythrozytenfließgeschwindigkeiten berechnet. Der Passageweg jedes einzelnen Erythrozyten durch das Kapillarareal wurde Bild für Bild mit dem Mouse-Cursor am Videoschirm nachgezeichnet und die Wegstrecke durch die Bildverarbeitungssoftware berechnet. Das benötigte Zeitintervall wurde wiederum anhand der im Videobild eingeblendeten Zeitanzeigen ermittelt.

2.13.3.10 Anzahl in Alveolarkapillaren permanent retinierter Leukozyten

Die Quantifizierung der permanent retinierten Leukozyten wurde in den selben Alveolararealen durchgeführt, in denen auch die Messung der Fließgschwindigkeit von Erythrozyten und die Bestimmung des CPI erfolgten. Als permanent retinierte Leukozyten wurden gemäß Kübler (86,88) alle Leukozyten definiert, die während des gesamten Beobachtungszeitraums von 5s ihre Lokalisation im alveolären Kapillarnetzwerk nicht veränderten. Ihre Anzahl wurde im Kapillarareal bestimmt und auf die Fläche des Areals bezogen als Ret_{per} / Alv [mm^{-2}]:

$$Ret_{per}/ALv = \text{Anzahl permant retinierter Leukoyten} / A_{Alv} \times 10^6 \qquad [14]$$

2.13.3.11 Thrombozytenfließgeschwindigkeit- und Retention in Alveolarkapillaren

Nach dem Prinzip der Bestimmung der mittleren Erythrozytenfließgeschwindigkeit wurde auch in den Alveolarkapillaren die mittlere Thrombozytenfließgeschwindigkeit ermittelt. Die Thrombozytenfließgeschwindigkeit setzt sich aus dem harmonischen Mittel aller Thrombozyten zusammen, die während des Beobachtungszeitraumes nicht permanant, d.h nicht läger als 5s an der selben Stelle des Kapillarnetzwerkes retiniert wurden. Die Anzahl permanent retinierter Thrombozyten (Ret_{PLT}) wurde gezählt und gemäß der Formel 14 für Leukozyten bezogen auf die Fläche des untersuchten Kapillarareals angegeben.

2.13.3.12 Alveolarseptenbreite

Als Hinweis auf die Entwicklung eines interstitiellen Lungenödems wurde die Alveolarseptenbreite zu unterschiedlichen Versuchszeitpunkten quantifiziert. Die Alveolarseptenbreite war definitionsgemäß der schmälste Abstand zweier benachbarter Alveolen und wurde zu unterschiedlichen Versuchszeitpunkten an der exakt gleichen Stelle durchgeführt. Die Messung erfolgte pro Alveole an 4-5 verschiedenen Stellen durch Markierung der Septen am Videobild. Die Septenbreite wurde anschließend durch das Bildverarbeitungssytem als arithmetisches Mittel der Einzelmessungen berechnet.

2.14 Einschlußkriterien

Nach Abschluß Präparation wurden für die weitere intravitalmikroskopische Untersuchung bei allen Versuchstieren folgende Einschlußkriterien gefordert:

- Arterieller Mitteldruck > 65 mmHg
- Herzzeitvolumen >150 ml/min
- Oxygenierungsindex >250 mmHg
- Fehlen von Mikro- und Makrohämorrhagien
- Fehlen von minderperfundierten Arealen auf der Lungenoberfläche im Beobachtungsareal

Die Ausfallsquote der Versuchtiere nach erfolgter Präparation betrug insgesamt 30,2%.

2.15 Vorversuche

Um gemäß der Zielsetzung, den Einfluß eines erhöhten Arachidonsäureangebotes auf die initiale Entwicklung des Endotoxin-induzierten akuten Lungenschadens hin zu untersuchen, sollte zunächst durch intravenöse Infusion freier Arachidonsäure das Arachidonsäureangebot im Organismus innerhalb kurzer Zeit gesteigert werden, um anschließend die Auswirkungen des erhöhten Angebotes während experimenteller Endotoxinämie zu untersuchen. Hierfür waren zunächst Dosisfindungsversuche hinsichtlich der infundierten Arachidonsäurekonzentration und der zu verabreichenden Endotoxinkonzentration notwendig.

2.15.1 Dosisfindung der Endotoxinkonzentration

Zielparameter der gewählten Endotoxinkonzentration waren zum einen konstante makrohämodynamische Verhältnisse im Pulmonalkreislauf, zum anderen ein Abfall der peripheren Leukozytenkonzentration innerhalb von 5 min nach i.v. Bolusinjektion des Lipopolysacharids auf rund 50% des Ausgangswertes als Hinweis auf eine signifikante Leukozytenaktivierung. Die gewählten Parameter wurden bei einer einmaligen intravenösen Bolusinjektion von 20µg/kg KG Lipopolysacharid erreicht.

2.15.2 Infusion der Arachidonsäure

Die aufgrund ihrer chemischen Struktur unpolare Arachidonsäure stand zur Infusion gelöst in amphiphilen mittelkettigen Triglyceriden (MCT) zur Verfügung. Um eine gute Löslichkeit der Arachidonsäure im MCT-Träger zu gewährleisten, war laut Hersteller ein Mischungsverhältnis von mindestens 1:10 (AA:MCT) notwendig. Als Zielgrößen der angestrebten Arachidonsäureinfusion galten:

- Infusionszeit 6h
- konstante Makrohämodynamik
- allenfalls geringer Anstieg der Plasmatriglyceride durch den MCT-Träger, keine sichtbare Lipidämie

Zunächst wurde eine Lösung von 100mg AA/h bei MCT 1g/h kontinuierlich über die marginale Ohrvene des Kaninchens infundiert. Nach 10-15 Minuten verstarben die jedoch die Versuchtiere. Das während dieses Zeitraumes durchgeführte makrohämodynamische Monitoring ist auf Abbildung 14 dargestellt. Innerhalb kurzer Zeit entwickelt sich eine massive pulmonale Hypertonie. Der Nachlastanstieg des rechten Ventrikels kann nicht kompensiert werden, das Versuchtier verstirbt schließlich infolge eines Rechtsherzversagens.

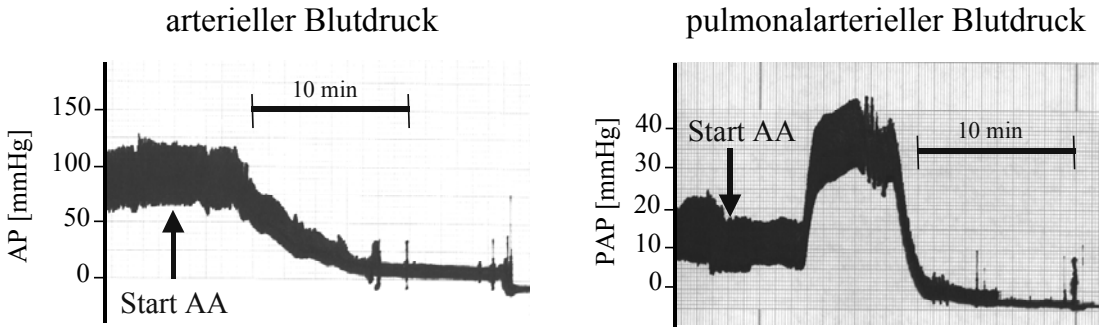

Abb. 14: Orginal Schreiberprotokoll der makrohämodynamischen Monitorings während der Dosisfindungsversuche. Infundierte Dosierung: 100mg AA/h, MCT 1000mg/h; Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie mit annährend simulater Reduktion des arteriellen Blutdrucks.

Tabelle 4 faßt die Dosisfindungsversuche zusammen. Durch Reduktion der Arachidonsäurekonzentration auf 10mg/h) wurden zwar konstante makrohämodynamische Verhältnisse erreicht, eine unter diesem Infusionsregime nach längerer Infusionszeit auftretende massive Hyperlipidämie durch den infundierten MCT-Träger und damit verbunden mögliche Wirkungen des Lösungsmittels waren aber nicht akzeptabel. Die Konzentration des Triglyceridträgers wurde deshalb bei konstanter Arachidonsäurekonzentration auf 100mg/h reduziert. Die Reduktion des Triglyceridkonzentration führte jedoch erneut zum Tod der Versuchstiere. Erst bei einer Konzentration von 5 mg Arachidonsäure bei einem MCT Anteil von 100mg wurden die geforderten Zielparameter erreicht.

Arachidonsäure [mg/h]	MCT [mg/h]	Wirkung
100	1000	Letal
10	1000	stabile Makrohäm. Hyperlipidämie
10	100	Letal
5	100	stabile Makrohäm.

Tab. 4: Übersicht der verwendten Arachidonsäure- und MCT Konzentrationen in den Vorversuchen, sowie die resultierende Wirkung im Organismus.

2.16 Experimentelle Protokolle

Nach Abschluß der Dosisfindungsversuche wurden 3 Untersuchungen durchgeführt: In Studie II wurde zunächst der Einfluß der Arachidonsäureinfusion auf Makrohämodynamik sowie pulmonale Mikrohämodynamik und Leukozyten-Endothel Interaktion im unstimulierten Modell untersucht. Im Zentrum des Interesses der Studie III steht dagegen die Wirkung der Arachidonsäureinfusion im Rahmen einer experimentellen Endotoxinämie. Um in Zukunft weitere Aussagen über über die Rolle der Thrombozyten treffen zu können, wurden im Rahmen der Studie IV nach einer Erweiterung des bestehenden Modells erstmals die Thrombozytenkinetik sowie die Thrombozyten-Endothelinteraktionen in der pulmonalen Mikrostrombahn untersucht.

2.16.1 Studie II

Die Abfolge der Versuchsphasen ist in Abbildung 15 dargestellt. Während der 4 stündigen kontinuierlichen Arachidonsäureinfusion erfolgen alle Schritte der Präparation. Nach 3,5 Stunden ist die Präparation abgeschlossen es folgt die Reinjektion der fluorezenzmarkierten Erythrozytern mit anschließender halbstündiger Rezirkulationsphase. Darauf folgt die erste intravitalmikroskopische Untersuchug der pulmonalen Mikrostrombahn. Nach 60 min erfolgt eine weitere Untersuchung, zu angegebenen Zeitpunkten wurden außerdem Makrohämodynamik, arterielle Blutgase und Blutbild bestimmt. Nach Beendigung der Versuchsphase wurden die Tiere durch intravenöse Bolusinjektion von 20 mval Kaliumchlorid getötet und die Lungengewebeproben für die

histologische Untersuchung sowie zur Bestimmug der Myeloperoxidasaktivität entnommen.

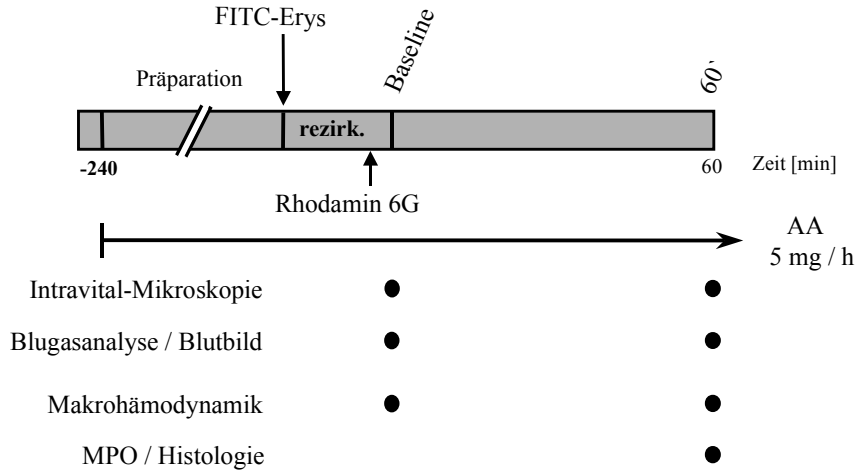

Abb. 15: Experimentelles Protokoll der Studie II. Eingezeichnete Punkte bzw. Pfeile geben die Zeitpunkte von Interventionen (z.B. Farbstoffapplikation) und die Erhebung von Messparametern wieder. Rezirk.= Rezirkulationsphase der Erythrozyten

2.16.2 Studie III

Zur Untersuchung der Wirkung der Arachidonsäureinfusion während experimenteller Endotoxinämie wurden weitere Versuchtiere nach Tracheotomie und Implantation von arteriellem und zentralvenösem Kathter und Thoraxfenster randomisiert den in Tabelle 5 dargestellten Versuchsgruppen zugeteilt:

Versuchsgruppe	„Priming“	Stimulus
AA n=10	AA 5mg/h MCT 100mg/h i.v.	20 µg/kg Endotoxin E. coli 0111:B4 i.v.
MCT n=8	MCT 100mg/h i.v.	20 µg/kg Endotoxin E. coli 0111:B4 i.v.
NaCl n=8	NaCl 0,9% 1ml/h i.v.	20 µg/kg Endotoxin E. coli 0111:B4 i.v.

Tab. 5: Übersicht der Versuchsgruppen der Studie III mit entsprechenden Infusionsregimen; n = Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe; AA Arachidonsäure; MCT mittelkettige Triglyceride.

Folgendes experimentelles Protokoll (Abbildung 16) wurde durchgeführt: Nach insgesamt 4 stündiger kontinuierlicher Infusion und 30 minütiger Rezirkulationszeit der fluoreszenzmarkierten Erythrozyten wurden sowohl vor als auch 5, 30 und 60 Minuten nach der intravenösen Injektion von 20µg/kg KG intravitalmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Zu angegeben Zeitpunkten wurden Makrohämodynamik, Blutgase sowie Blutbild bestimmt. Vor Infusionbeginn, nach 4 h Infusionszeit und 60 Minuten nach Endotoxininjektion wurde die Plasmatriglyceridkonzentration und Konzentration an freien Fettsäuren gemessen. Nach 4 stündiger Infusionzeit wurde außerdem die Konzentration von freier Arachidonsäure im Plasma durch gaschromatische Analyse bestimmt sowie die Gesamtkonzentration an Triglyceriden und freien Fettsäuren gemessen. Vor sowie 60 Minuten nach Endotoxininjektion wurde die Plasmakonzentration an TxB_2 gemessen. Nach Tötung der Versuchstiere am Ende der Versuchsphase wurden Lungengewebeproben für die histologische Untersuchung sowie Quantifizierung der Myeloperoxidaseaktivität entnommen.

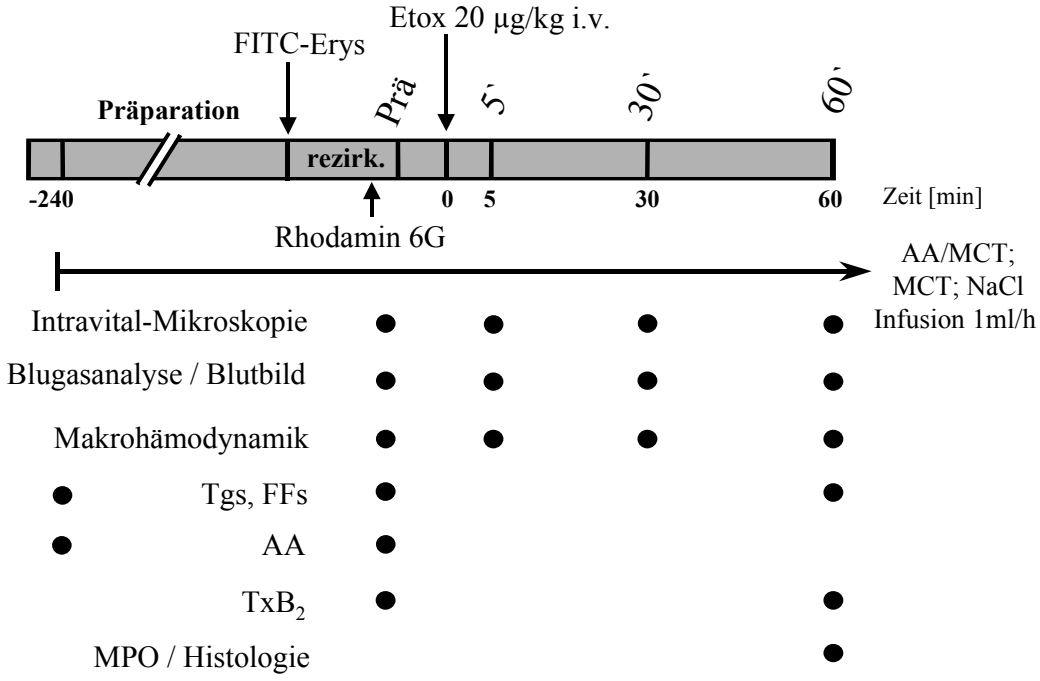

Abb. 16: Experimentelles Protokoll der Studie III; Punkte kennzeichnen Messzeitpunkte bzw. Zeitpunkt der Probengewinnung; Tgs: Bestimmung der Plasmatriglyceridkonzentration, FFs: Bestimmung der Konzentration freier Fettsäuren im Plasma, AA: Bestimmung der Plasmaarchidonsäurekonzentration, TxB_2: Probenentnahme zur Bestimmung der Thromboxan B_2 Konzentration, MPO: Myeloperoxidaseaktivität im Lungengewebe.

2.16.3 Studie IV

Nach abgeschlossener Präparation wurde das zur *ex vivo* Thrombozytenmarkierung benötigte Vollblut entnommen und die Thrombozyten nach der unter 2.5.3 beschrieben Methode fluoreszenzmarkiert. FITC-markierte Erythrozyten wurden intravenös injiziert und eine 30 minütige Stabilisierungs und Rezirkulationszeit abgewartet. Kurz vor der ersten intravitalmikroskopischen Untersuchung wurden die Rhodamin-6G markierten Thrombozyten injeziert und die Mikrohämodynamik sowie Thromboyztenkinetik nacheinander in Arteriolen Venolen und Alveolararealen auf Videoband aufgezeichnet. Die Tiere wurden dann 2 Versuchsgruppen zugeteilt: in Gruppe 1 wurde die Stabilität des Modells über einen Untersuchungszeitraum von 60 Minuten kontrolliert. Hierfür wurden 60 Minuten nach den ersten Aufnahmen erneut fluoreszierende Blutplättchen injeziert und in den selben Gefäßsegmenten untersucht. In Gruppe 2 wurde der Einfluß der Thrombozytenaktivierung mittels Thrombin auf die Thrombozytenkinetik und Thrombozyten-Endothelinteraktion untersucht. *Ex vivo* Thrombin-aktivierte Blutplättchen wurden zum Zeitpunkt 60' injeziert und wiederum in den selben Gefäßsegmenten visualisiert.

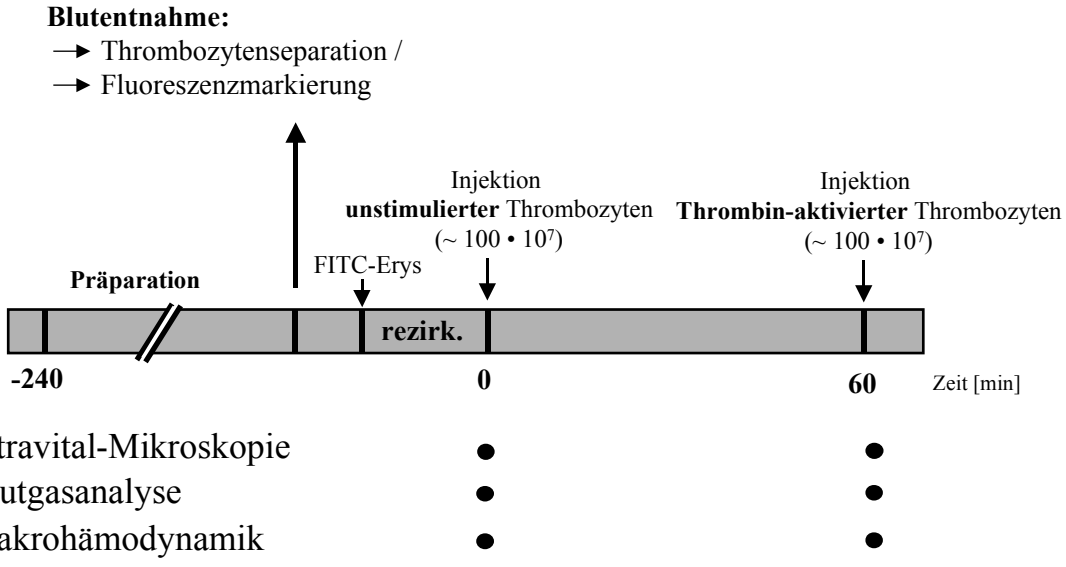

Abb. 17: Experimentelles Protokoll der Studie IV zur Quantifizierung der Thrombozytenkinetik und zur Untersuchung thrombin-aktivierter Thrombozyten. Pfeile bzw. Punkte kennzeichnen die Zeitpunkte von Interventionen bzw. Erhebung von Messparametern.

2.17 Datenverarbeitung und Statistik

Die Parameter der Gefäßmorphologie, Mikrohämodynamik und Leukozytenadhärenz wurden mittels des computergestützten Bildverabeitungssystems (Optimas, BioScan, Washington,USA) quantifiziert und interaktiv in Datenblätter des Tabellenkalkulationsprogramms MS-Excel (MS-Excel, Microsoft GmbH, München) übertragen. Ebenso wurden die Ergebinisse der makrohämodynamischen Messungen, der Blutgasanalyse, des Blutbildes, der gemessenen blutchemischen Paramter, sowie der MPO-Untersuchungen in Tabellen des Tabellenkalkulationsprogramms am Personalcomputer eingegeben. Mit Hilfe programmierter Formeln wurden unter Berücksichtigung von Korrekturfaktoren alle abgeleiteten Parameter berechnet. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde das Computerprogramm Sigmaplot (Jandel Corp., San Rafael, Ca.,USA) verwendet.

Die statistische Auswertung der gemessenen und berechneten Parameter erfolgte am Personalcomputer mittels des Statistikprogramms Sigmastat (Jandel Corp., San Rafael, Ca.,USA). Aufgrund der geringen Fallzahlen pro Versuchsgruppe wurde auf die Annahme bzw. Überprüfung einer zugrundeliegenden Normalverteilung verzichtet und ausschließlich nichtparametrische Tests verwendet.

In Studie III wurden alle Versuchsgruppen mittels Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis und anschließendem Dunn`s-Test unverbunden gegeneinander auf signifikante Unterschiede an den Versuchszeitpunkten getestet. Innerhalb jeder Gruppe wurden die Daten mit Hilfe der wiederholten verbundenen Varianzanalyse nach Friedmann und anschließender post hoc Analyse mittels Dunn´s-Test auf signifikante Änderungen gegenüber dem Ausgangswert getestet. In Studie II und Studie IVwurde zum Vergleich der Ergebnisse der Wilcoxon Test für verbundene Paardifferenzen verwendet. In Studie I (Untersuchung der Erythrozytenkonzentrate) wurden die Ergebnisse mittels Mann Whitney Rank Sum Test für unverbundene Paardifferenzen auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen überprüft.

Signifikanz wurde jeweils bei einer Wahrscheilichkeit für Fehler 1. Art unter 5% angenommen ($p<0,05$). Falls nicht anders angegeben, sind alle Werte als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

III. Ergebnisse

1. Studie I: Untersuchung der Erythrozytenkonzentrate

1.1 Fettsäuregehalt in Erythrozytenkonzentraten

In insgesamt 42 Erythrozytenkonzentraten wurden die Konzentrationen freier Fettsäuren im zellfreien Überstand der Konzentrate gemäß der unter II.1 beschriebenen Methodik gemessen. In Abhängigkeit der Konservierungszeit wurden die Erythrozytenkonzentrate entweder der Gruppe der „frischen" Konzentrate (**EK-F**), oder der Gruppe der „alten" Konzentrate (**EK-A**) zugeteilt. Die Konservierungszeit „frischer" Konzentrate lag bei weniger als 7 Tagen, die der „alten" Konzentrate zwischen 30 und 42 Tagen. Die Anzahl der Konzentrate sowie mittlere Konservierungszeit und die Fettsäurekonzentrationen in den beiden untersuchten Gruppen sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

		EK – F	**EK - A**
	n	24	22
Konservierungszeit [d]		1.5 ± 0.49	35.4 ± 1.6 *
Palmitinsäure	**16:0**	16.7 ± 1.5	26.7 ± 2.0*
Stearinsäure	**18:0**	14.1 ± 0.8	17.2 ± 0.9*
Ölsäure	**18:1 n9**	4.9 ± 0.7	8.2 ± 1.2*
Linolsäure	**18:2 n6**	3.4 ± 0.4	7.0 ± 0.8*
γ-Linolensäure	**18:3 n6**	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0
α-Linolensäure	**18:3 n3**	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1
Stearidonsäure	**18:4 n3**	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.1*
Arachidonsäure	**20:4 n6**	0.1 ± 0.0	1.9 ± 0.3*
Eicosapentaensäure	**20:5 n3**	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.1
Erucinsäure	**22:1 n9**	0.6 ± 0.0	4.0 ± 0.9*
Docosahexaensäure	**22:6 n3**	0.1 ± 0.0	0.8 ± 0.1*

Tab. 6: Übersicht der Konservierungszeit in Tagen und der gemessenen Konzentrationen an freien Fettsäuren im zellfreien Überstand der ‚alten' (EK-A) und ‚frischen' (EK-F) Erythrozytenkonzentrate. Angegeben sind Mittelwerte ± SEM in der Einheit ng/µl. n = Anzahl der untersuchten Konzentrate; * $p < 0{,}05$ EK-A *vs*. EK-F, Mann Whitney Rank Sum Test.

Außer den freien Fettsäuren α- Linolensäure, γ-Linolensäure und Eicosapentaensäure sind die Konzentrationen aller anderen gemessenen freien Fettsäuren im zellfreien Überstand der Erythrozytenkonzentrate mit einer mittleren Konservierungszeit von 35,5 Tagen im Vergleich zu den Erythrozytenkonzentraten mit einer durchschnittlich 1,5-tägigen Konservierungszeit signifikant erhöht. Die Gesamtkonzentration (Abb. 19A) aller quantifizierten freien Fettsäuren steigt in der Gruppe der alten Erythrozytenkonzentrate auf das 1,7-fache im Vergleich zu frischen Erythrozytenkonzentraten an. Die Konzentration der gesättigten Fettsäuren ist auf das 1,4-fache, die Konzentration ungesättigter freier Fettsäuren sogar auf das 2,4-fache erhöht (Abb. 19B/C). Die Relation zwischen ungesättigten und gesättigten freien Fettsäuren verschiebt sich nach 35-tägiger Lagerungszeit damit signifikant zugunsten der ungesättigten Fettsäuren, der Quotient liegt jedoch nach wie vor unter 1 (Abb. 19D). Betrachtet man nicht den absoluten, sondern den relativen Anstieg (Abb. 18) aller freien Fettsäuren in alten Erythrozytenkonzentraten im Vergleich zu frischen Erythrozytenkonzentraten, so zeigt die mehrfach ungesättigte Fettsäure Arachidonsäure im statistischen Vergleich zu allen anderen freien Fettsäuren den stärksten Anstieg.

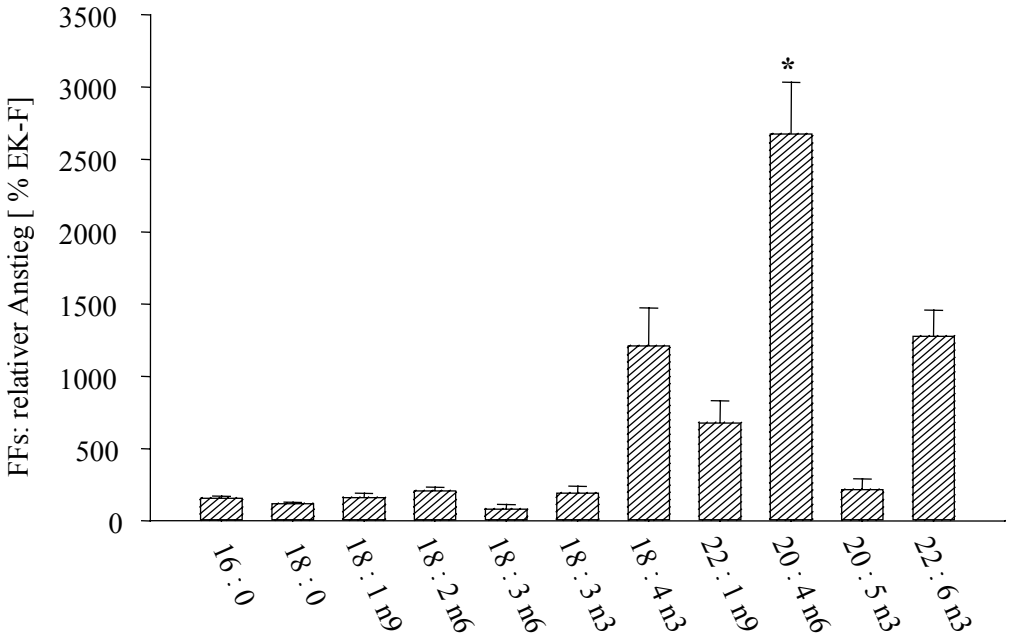

Abb. 18: Relativer Anstieg der freien Fettsäuren (FFs) in alten Erythrozytenkonzentraten in % der Konzentration in frischen Konzentraten. Angegeben sind Mittelwerte ± SEM. * $p<0,05$ 20:4 n6 *vs*. alle übrigen FFs; RM Anova on Ranks, Post hoc Analyse: Dunn's Test.

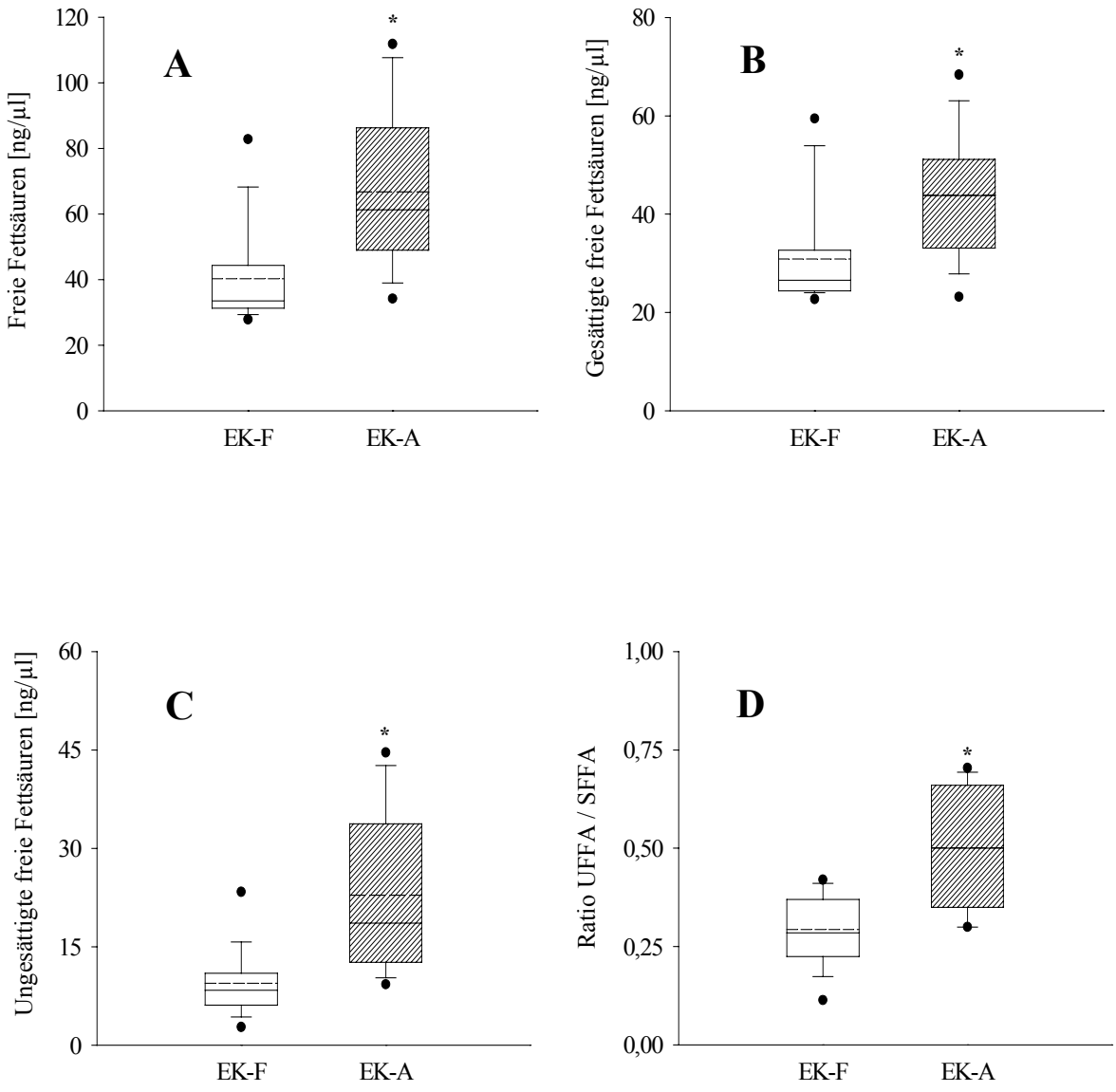

Abb. 19 A-D: **A**: Gesamtkonzentration der freien Fettsäuren (16:0, 18:0, 18:1 n9,18:2 n6, 18:3 n6, 18:3 n3, 18:4 n3, 22:1 n9, 20:4 n6, 20:5 n3, 22:6 n3); **B**: Konzentration gesättigter freier Fettsäuren (16:0, 18:0); **C**: Konzentration ungesättigter freier Fettsäuren (18:1 n9,18:2 n6, 18:3 n6, 18:3 n3, 18:4 n3, 22:1 n9, 20:4 n6, 20:5 n3, 22:6 n3); **D**: Verhältnis zwischen ungesättigten und gesättigten freien Fettsäuren. EK-A alte Erythrozytenkonzentrate, EK-F frische Erythrozytenkonzentrate.
Boxplots: ---- Mittelwert, - Median, 1. und 3. Quartil, 5. 95. Perzentil. *p< 0,05 EK-A vs. EK-F.

Vergleicht man die Konzentration der mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den Erythrozytenkonzentraten und im Plasma gesunder Probanden (Abb. 20), wird deutlich, dass die Konzentration in den Konserven überwiegend kleiner oder gleich den physiologischen Plasmakonzentrationen sind. Eine wichtige Ausnahme stellt Arachidonsäure dar. Die Konzentration von Arachidonsäure in alten Erythrozytenkonzentraten übersteigt die physiologische Plasmakonzentration signifikant um das 3,2-fache.

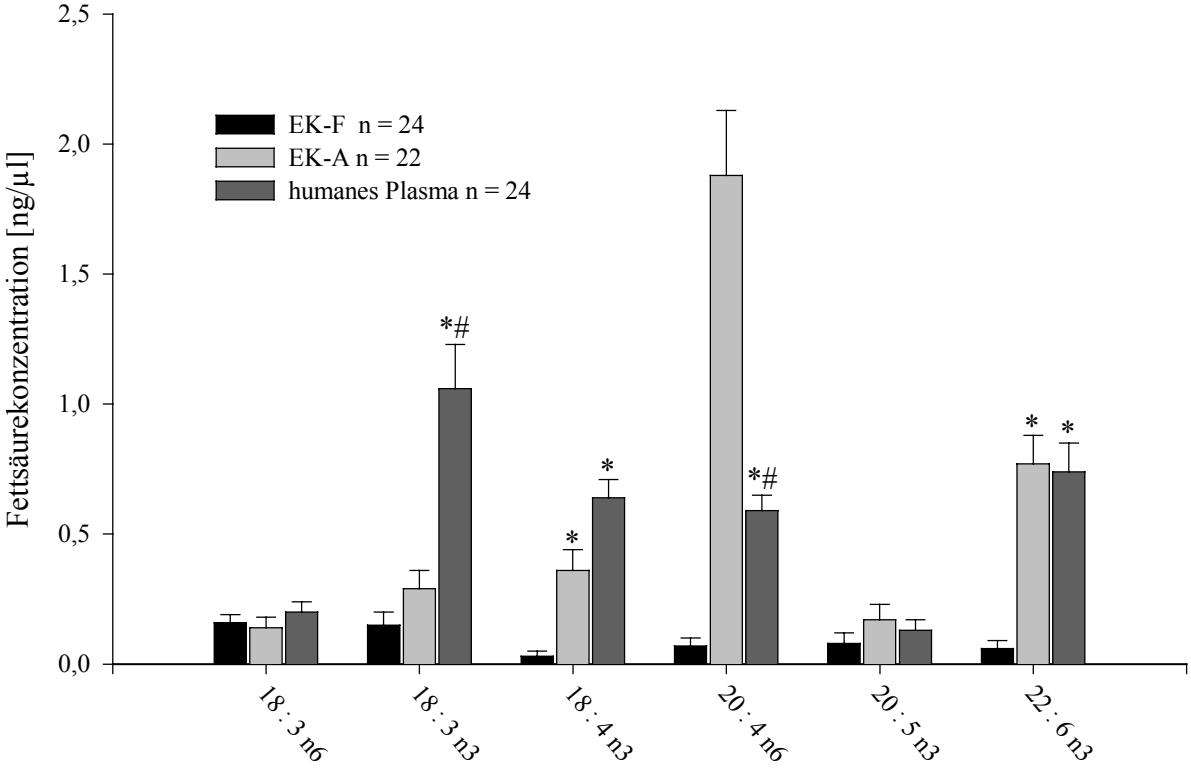

Abb. 20: Vergleich zwischen den Konzentrationen der mehrfach ungesättigten Fettsäuren in alten und frischen Erythrozytenkonzentraten und den physiologischen Konzentrationen der Fettsäuren in humanem Plasma. Angegeben sind Mittelwert ± SEM; *p<0,05 vs. EK-F, # p<0,05 vs. EK-A. Kruskal-Wallis Analyse.

1.2 Wirkung der Arachidonsäurekonzentration auf Burstaktivität

In vitro wurde Zeit- und konzentrationsabhängig die Wirkung der Arachidonsäure auf die Respiratory Burst-Aktivität humaner neutrophiler Granulozyten gemessen. Verglichen

wurden hierbei Arachidonsäure-freie BSA-Lösung, Arachidonsäure in einer Konzentration ähnlich der gemessenen Konzentration der Arachidonsäure in alten Erythrozytenkonzentraten (3µg/ml), sowie die hierzu 10-fache Arachidonsäurekonzentration (30µg/ml). Die Burstaktivität wurde nach 15- und 30-minütiger Inkubation der Granulozyten mit entsprechender Lösung gemessen (Abb. 21).
Die Produktion von Hydrogenperoxid nimmt in Abhängigkeit von der Inkubationszeit signifikant zu. Während nach 15-minütiger Inkubation nur die hohe Arachidonsäurekonzentration zu einer signifikanten Zunahme der Burstaktivität im Vergleich zu arachidonsäurefreiem Medium führt, bewirken nach 30 minütiger Inkubationszeit sowohl die niedrige (3µg/ml) als auch die hohe Arachidonsäurekonzentration (30µg/ml) eine signifikante Steigerung der Hydrogenperoxidproduktion .

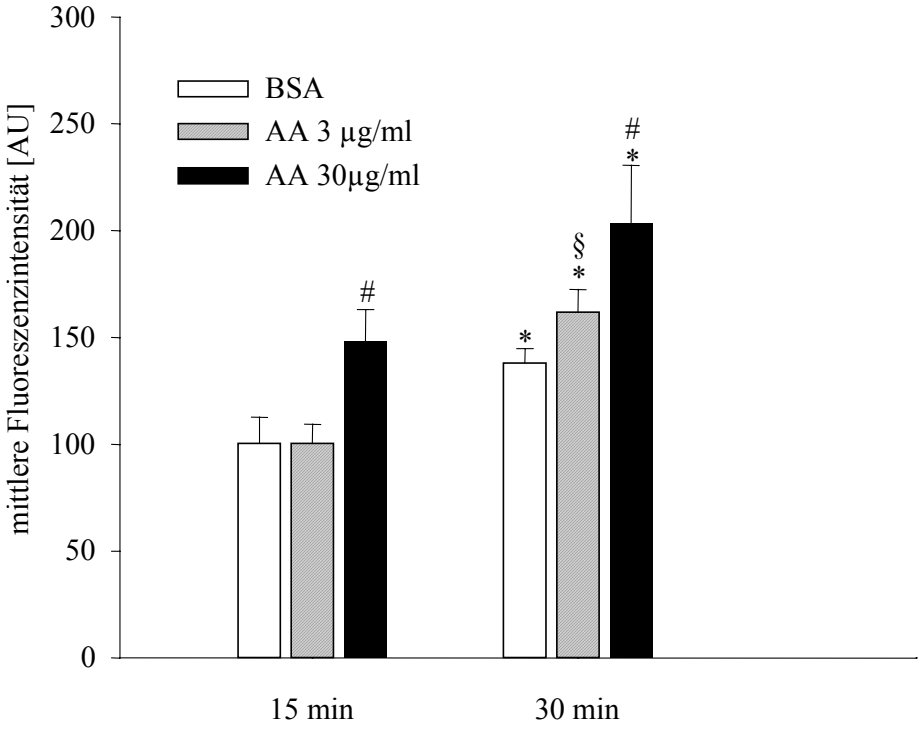

Abb. 21: Hydrogenperoxidproduktion in polymorphkernigen Leukozyten von gesunden Probanden. Dihydrorhodamin markierte Zellen wurden für 15 bzw. 30 min. mit BSA-Lösung oder Arachidonsäure (3 µg/ml; 30 µg/ml) inkubiert. Oxidation von Dihydrorhodamin zu fluoreszierendem Rhodamin wurde mittels Flußzytometrie gemessen. Angegeben sind Mittelwert ± SEM der mittleren Fluoreszenzintensitäten; n = 5.

2. Studie II

Gemäß des in Abb. 15 dargestellten Versuchsprotokolls wurde in 4 Versuchtieren (2,6 ± 0,1 kg KG) *in vivo* der Einfluß der intravenösen Arachidonsäureinfusion zunächst ohne weitere inflammatorische Stimulation auf die Makrohämodynamik, pulmonale Mikrohämodynamik und Leukozytenadhärenz untersucht. Die ursprünglich geplante Gruppenstärke lag bei n=8. Aufgrund einer nach 4 Versuchen durchgeführten Interimanalyse, die keine Hinweise auf einen Einfluß der Arachidonsäureinfusion auf die untersuchten Parameter zeigte, wurde aus ethischen und statistischen Überlegungen die Versuchsserie nach der Durchführung von 4 Experimenten beendet.

2.1 Makrohämodynamik, Blutgase, Blutbild

Die zu den Versuchszeitpunkten Baseline und 60´ quantfizierten Werte der Makrohämodynamik sind in Tabelle 8 zusammengefaßt: Nach 4 stündiger kontinuierlicher Arachidonsäureinfusion liegen die Werte der makrohämodynamischen Parameter im

Makrohämodynamik		
Parameter	**Baseline**	**60´**
AP_m [mmHg]	78 ± 6	74 ± 4
CVP_m [mmHg]	3,3 ± 1,4	3,0 ± 1,4
PAP_m [mmHg]	13,4 ± 1,3	12,5 ± 1,5
HR [min^{-1}]	241 ± 16	245 ± 10
CO [$ml*min^{-1}$]	285 ± 10	308 ± 26
PVR-Index [$mmHg*l^{-1}*min$]	48 ± 6	42 ± 6

Tab. 7: Makrohämodynamische Parameter: mittlerer arterieller Blutdruck AP_m, zentralvenöser Blutdruck CVP_m, mittlerer pulmonalarterieller Blutdruck PAP_m, Herzfrequenz (HR) Herzzeitvolumen (CO), Index des pulmonalvaskulären Widerstandes (PVR-Index), Systemisch vaskulärer Widerstand (SVR). Angegeben sind Mittelwerte ± SEM. n=4.

physiologischen Normalbereich, signifikante Änderungen innerhalb der folgenden weiteren Infusionszeit von 60 Minuten konnten nicht beobachtet werden.

In Tabelle 7 sind die prozentualen Änderungen der Blutgase und des Blutbildes zum Zeitpunkt 60´ im Vergleich zum Ausganswert (Baseline) angegeben. Alle genannten

Paramter ändern sich über den Untersuchungszeitraum nicht signifikant (Wilkocon Test für Paardifferenzen).

Blutgase [% Baseline]		Blutbild [% Baseline]	
PaO_2	114,6 ± 5,3	RBC	93,6 ± 3,0
$PaCO_2$	110,1 ± 2,6	WBC	112,5 ± 18,9
pH	99,7 ± 0,3	PLT	81,3 ± 19,3
Saet	100,4 ± 0,3	Hb	92,6 ± 2,2
HCO_3^-	105,6 ± 3,9	Hk	93,5 ± 2,8

Tab. 8: Übersicht der Blutgasanalyse und des Blutbildes. Arterieller Sauerstoffpartialdruck (PaO_2), arterieller Kohlendioxidpartialdruck ($PaCO_2$), pH-Wert (pH), arterielle Sauerstoffsättigung (Saet) und Bicarbonatkonzentration ($HCO3^-$). Angegeben sind jeweils die Ergebnisse zum Zeitpunkt 60‘ in % des Ausganswertes (Baseline). Mittelwert ± SEM, Anzahl der Versuchstiere n=4.

2.2 Gefäßdurchmesser und Mikrohämodynamik in Arteriolen und Venolen

In Tabelle 9 sind die in pulmonalen Arteriolen und Venolen intravitalmikroskopisch erhobenen Paramter der Mikrohämodynamik zusammengefaßt. Die gemessene mittlere Erythrozytenfließgeschwindigkeit und Gefäßdurchmesser und damit ebenso die hieraus abgeleiteten Paramter Blutvolumenfluß Q bzw. Wandscherrate γ bleiben über den Untersuchungszeitraum von 60 min konstant.

2.3 Leukozytenadhärenz in pulmonalen Arteriolen und Venolen

Auf Abbildung 22 ist jeweils die Zahl adhärenter Leukoyzten bezogen auf die Gefäßwandoberfläche in pulmonalen Arteriolen bzw. Venolen zum Zeitpunkt Baseline und 60’ dargestellt. Weder in Arteriolen noch in pulmonalen Venolen erfolgt eine signifikante Veränderung der Leukozytenadhärenz innerhalb des Untersuchungszeitraums.

Arteriolen		
Parameter	**Baseline**	**60´**
D [µm]	28,3 ± 2,1	28,5 ± 0,8
V_{RBC} [µm/s]	1229 ± 248	1421 ± 154
CV v_{RBC} [%]	7,9 ± 0,9	9,8 ± 1,8
γ [s^{-1}]	194 ± 36	225 ± 26
Q [nl/min]	27,4 ± 7,5	30,7 ± 3,3
Venolen		
D [µm]	30,0 ± 2,4	29,3 ± 1,7
V_{RBC} [µm/s]	1623 ± 159	1611 ± 261
CV v_{RBC} [%]	4,8 ± 0,7	5,3 ± 0,7
γ [s^{-1}]	248 ± 20	253 ± 47
Q [nl/min]	40,5 ± 8,6	36,2 ± 4,1

Tab. 9: Übersicht der quantifizierten mikrohämodynamischen Parameter in pulmonalen Arteriolen und Venole. Gefäßdurchmesser (D), mittlere Erythrozytenfließgeschwindigkeit (v_{RBC}), Wandscherrate (γ), Blutvolumenfluß (Q). Angegeben sind Mittelwerte ± SEM. n=4.

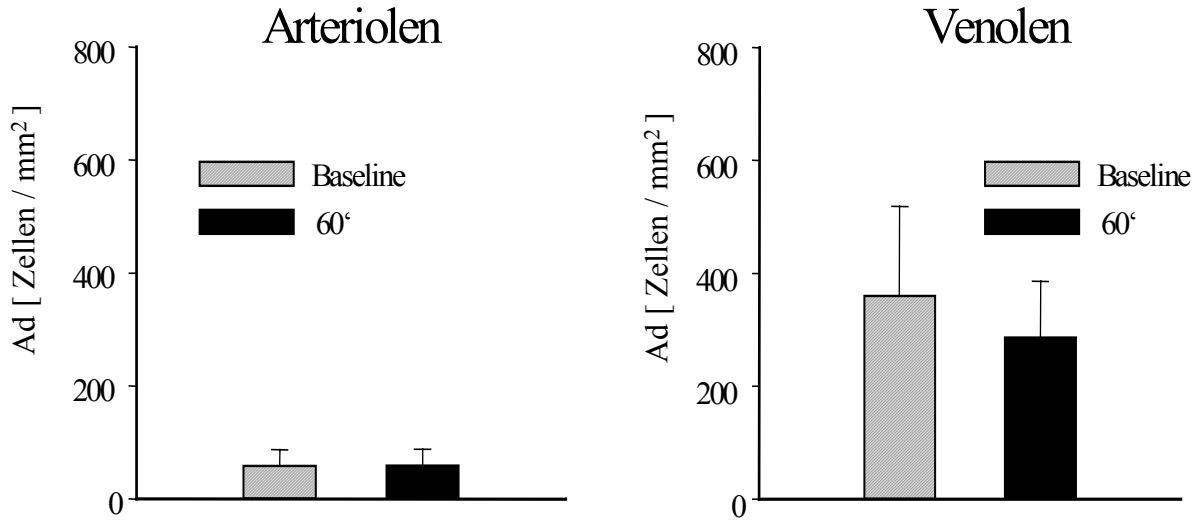

Abb. 22: Anzahl der endothel-adhärenten Leukozyten (Ad) in pulmonalen Arteriolen und Venolen zu den Versuchszeitpunkten Baseline (4h Arachidonsäureinfusion) und 60‘ (5h Arachidonsäureinfusion). Angeben sind Mittelwerte ± SEM.

2.4 Mikrohämodynamik und Leukozytenretention in Alveolarkapillaren

Auch die Parameter der Kapillarmorphologie, der Mikrohämodynamik und Leukozytenretention in den untersuchten alveolären Kapillararealen von 3 Kaninchen änderten sich über den gesamten Untersuchungszeitraum von 60 min nicht. Tabelle 10 zeigt die gemessenen Paramter zum Zeitpunkt Baseline und 60' in Absolutwerten.

Kapillarmorphologie, Mikrohämodynamik, Leukozytenretention		
Parameter	**Baseline**	**60´**
A_{ALV} [10^3 µm^2]	26,4 ± 3,7	27,5 ± 2,3
L_{ALV} [µm]	1243 ± 143	1236 ± 234
CPI [mm^{-1}]	481 ± 52	441 ± 47
v_{RBC} [µm*s]	381 ± 79	354 ± 127
Ret_{per} / Alv [1 / mm^2]	244 ± 32	282 ± 90
D_{sep} [µm]	21,3 ± 2,7	22,7 ± 2,3

Tab. 10: Übersicht der Parameter der Kapillarmorphologie sowie Mikrohämodynamik und Leukozytenretion in alveolären Kapillarnetzwerken. Alveolarfläche A_{ALV}, Gesamtlänge der erythrozytenperfundierten Kapillaren L_{ALV}, funktioneller kapillarer Perfusionsindex CPI, mittlere Erythrozytenfließgeschwindigkeit in Kapillaren v_{RBC}, Anzahl permanent retinierter Leukozyten bezogen auf die Alveolarfläche Ret_{per} / Alv, Alveolarseptenbreite D_{sep}. Angegeben sind Mittelwerte ± SEM.

2.5 Myeloperoxidaseaktivität im Lungengewebe

Die Geschwindigkeiten der photometrisch quantifizierten Extinktionsänderungen ΔE/Δt wurden mit Hilfe des von Kiefmann (82) ermittelten Proportionalitätsfaktors a_{st} direkt in Aktivität der Myeloperoxidase mit der Einheit mU umgerechnet und auf 1g Lungengewebe bezogen. Anschließend wurde außerdem die Anzahl an polymorphkernigen Granulozyten pro Gram Lungengwebe unter Berücksichtigung der Aktivität von 40,3 mU pro 10^6 Granulozyten (87) bestimmt.

Die gemessene Myeloperoxidaseaktivität bzw. Granulozytenzahl erreichet nur ca. 40 % der von Kübler et al.(87) unter physiologischen Bedingungen ermittelten Werte (MPO-Aktivität 741 ± 67 mU/g; 18,4 ± 1,7 * 10^6 PMNs/g). Die MPO-Aktivität des

Lungengewebes differiert jedoch innerhalb der Lunge in Abhängigkeit des vertikalen Gradienten. Die untersuchten Gewebeproben des rechten Unterlappen entsprechen am ehesten dem von Kuebler et al. als „vertikalem Level 3“ (87) bezeichnetem anatomischen Bereich, der auch in den Untersuchungen von Kuebler signifikant geringere MPO-Aktivität aufweist. Die gemessenen MPO-Aktivitäten und berechneten Granulozytenzahlen deuten somit darauf hin, daß die Arachidonsäureinfusion per se keine Zunahme der Granulozytenretention in der pulmonalen Strombahn bewirkt.

Myeloperoxidase rechter Unterlappen n=4		
Probengewicht [mg]	**MPO-Aktivität [mU/g]**	**PMNs [10^6 / g]**
384 ± 70	314 ± 150	7,8 ± 3,7

Tab. 11: Übersicht über die Ergebisse der Myeloperoxidaseaktivität und der berechneten Granulozytenzahlen im rechten Unterlappens.

2.6 Histologie

Auf den mit Estrasefärbung angefertigten Lungenpräparaten ließen sich lichtmikroskopisch in keinem der 4 Versuchtiere histologisch-pathologischen Veränderungen nachweisen. Weder konnte eine vermehrte Leukozyteninfiltration bzw. Emigration noch eine ödematöse Schwellung der Alveolarsepten als Ausdruck eines interstitellen Ödems beobachtet werden. Abb. 23 zeigt exemplarisch einen histologischen Schnitt des linken Lungenoberlappens nach 5-stündiger Arachidonsäureinfusion.

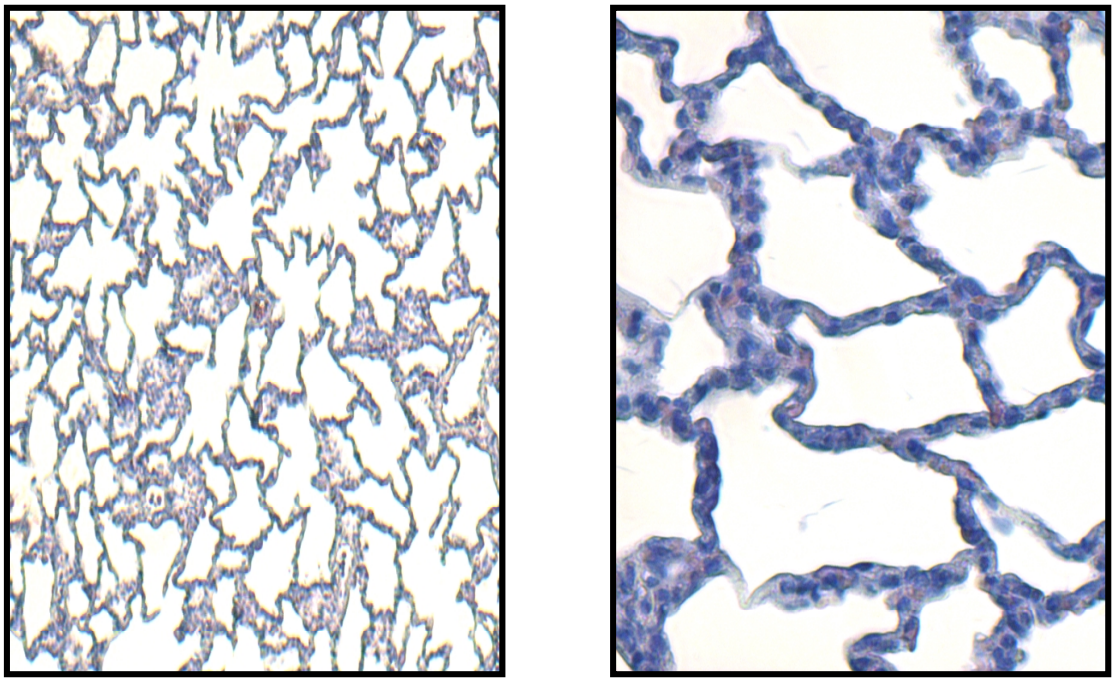

Abb. 23: Histologischer Schnitt des Lungengewebes in Esterasefärbung nach 5-stündiger Infusion der Arachidonsäure. Die lichtmikroskopische Übersichtsaufnahme (10x, links) sowie die Herausvergrößerung (40x, rechts) zeigen einen Normalbefund.

3. Studie III

In der Studie III wurde an weiteren 26 Tieren der Einfluß der Arachidonsäureinfusion während zusätzlicher inflammatorischer Stimulation, d.h. im Rahmen einer experimentellen Endotoxinämie gemäß dem auf Abb. 16 dargestellten Versuchsprotokoll und anhand der in Tabelle 5 zusammengefassten Versuchsgruppen untersucht.

3.1 Makrohämodynamische Parameter

Die quantifizierten Werte der Makrohämodynamik sind in der Übersicht auf Abbildung 23 dargestellt.

Der mittlere arterielle Blutdruck (Abb. 24A) nimmt in allen drei Versuchsgruppen nach Endotoxininjektion über den Versuchsverlauf im Vergleich zum Ausganswert ab. Bei zusätzlicher Infusion der Arachidonsäure erfolgt eine weitere signifikante Verstärkung der arteriellen Hypotension 60 Minuten nach Endotoxininjektion. Der zentralvenöse Blutdruck (Abb. 24B) bleibt dagegen über den Zeitverlauf von 60 Minuten in allen drei Versuchsgruppen konstant. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen können nicht beobachtet werden. Der mittlere pulmonal arterielle Blutdruck (Abb. 24C) nimmt in der AA-Gruppe innerhalb der ersten 30 min nach Endotoxininjektion um rund 53% zu und liegt zum Zeitpunkt 60' tendenziell höher als der Ausganswert. Weder in der MCT,- noch in der NaCL-Gruppe konnten dagegen Veränderungen des PAP_m beobachtet werden.

Auch das Herzzeitvolumen (Abb. 24D) nahm innerhalb des Beobachtungszeitraums nur in der AA-Gruppe zum Zeitpunkt 60' auf 83% des Ausganswertes ab. In der MCT,- und NaCL-Gruppe liegt das Herzzeitvolumen 60 Minuten nach Endotoxininjektion bei 97% bzw. 100% des Ausganswertes. Der aus PAP_m und CO berechnete PVR-Index (Abb. 24E) steigt folglich nur in der AA Gruppe nach Endotoxininjektion innerhalb des Untersuchungszeitraumes auf das 2-fache des Ausgangswertes signifikant an und deutet damit auf eine Erhöhung des pulmonalvaskulären Widerstandes hin. In allen drei Versuchsgruppen zeigt sich eine tendenzielle Reduktion des systemisch vaskulären Widerstandes (Abb. 24F) 60 Minuten nach Endotoxininjektion.

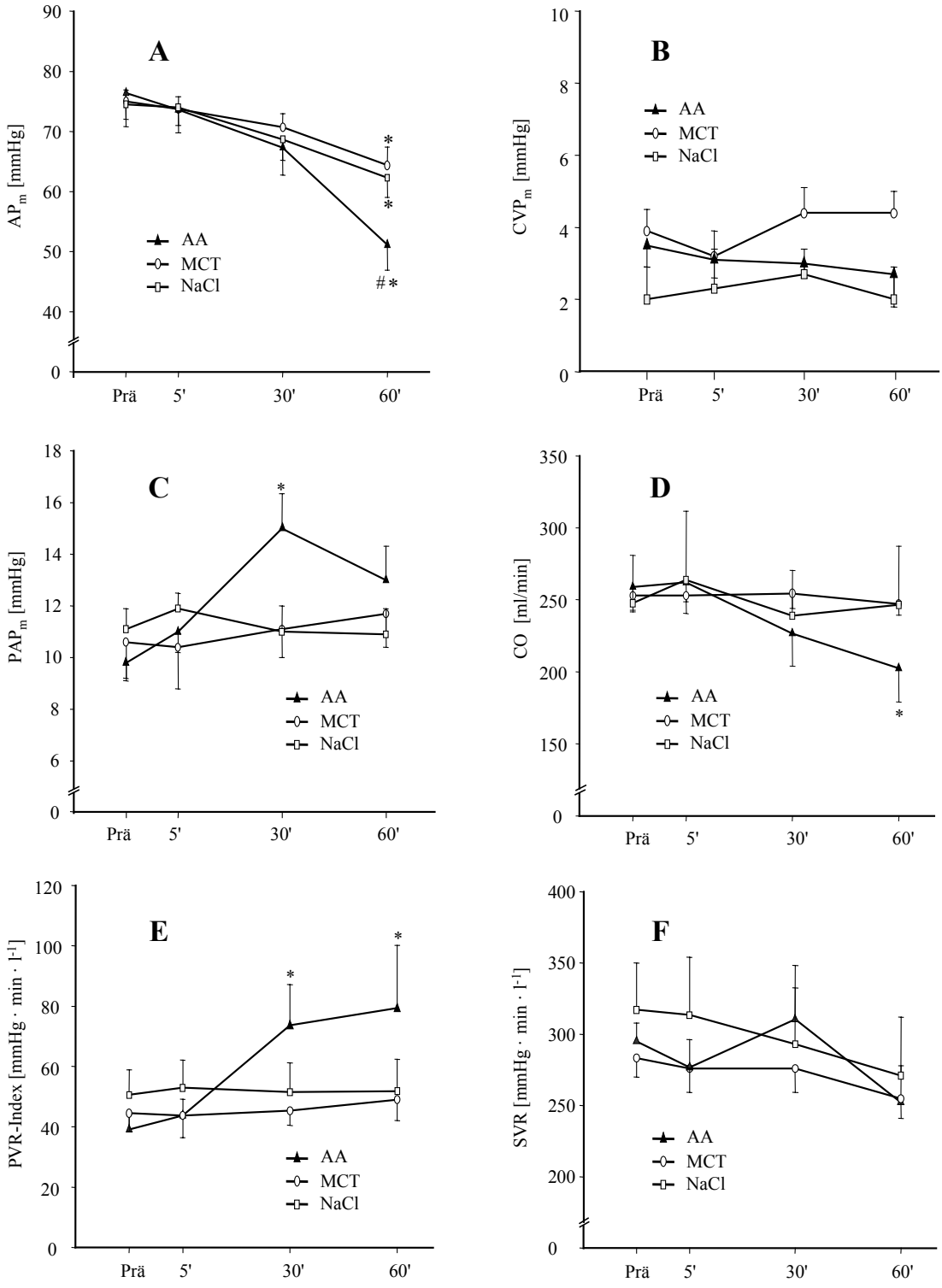

Abb. 24 A-F: Ubersicht der makrohämodynamischen Parameter; **A**: mittlerer arterieller Blutdruck (AP_m); **B**: zentralvenöser Blutdruck (CVP); **C**: mittlerer pulmonalarterieller Blutdruck (PAP_m); **D**: Herzzeitvolumen (CO); **E**: Index des pulmonalvaskulären Widerstandes (PVR-Index); **F**: systemisch vaskulärer Widerstand (SVR); angeben sind Mittelwerte ± SEM; * $p < 0,05$ *vs*. Prä, $^{\#}$ $p \leq 0,05$ AA *vs*. MCT, Kruskal-Wallis Analyse.

3.2 Arterielle Blugasanalyse

Tabelle 12 fasst die Ergebnisse der gemessenen Werte des Gasaustausches und des Säure-Basenhaushaltes zusammen. Zur besseren Veranschaulichung wurden die Werte des arteriellen Sauerstoff- (Abb 25A) und Kohlendioxidpartialdrucks (Abb 25B) graphisch dargestellt. In allen drei Versuchsgruppen treten keine signifikanten Änderungen des PaO_2 im Intragruppenvergleich auf. Zum Zeitpunkt 30` ist der PaO_2 in der AA-Gruppe signifikant im Vergleich zur NaCl-Gruppe reduziert, die Unterschiede erreichen 60 min nach Endotoxininjektion kein signifikantes Niveau mehr zwischen den Gruppen.

Trotz unveränderter Beatmungsparameter entwickelt sich insbesondere in der AA-Gruppe eine deutliche respiratorische Azidose, kenntlich an einer Senkung des pH-Wertes unterhalb des physiologischen Bereiches bei gleichzeitig signifikanter Erhöhung des arteriellen Kohlendioxidpartialdruckes und nahezu unveränderter Bicarbonatkonzentration. Die in der AA-Gruppe gemessenen arteriellen Kohlendioxidpartialdrucke liegen zum Zeitpunkt 30' und 60' im Vergleich zum Ausgangswert und den anderen beiden Versuchsgruppen signifikant erhöht.

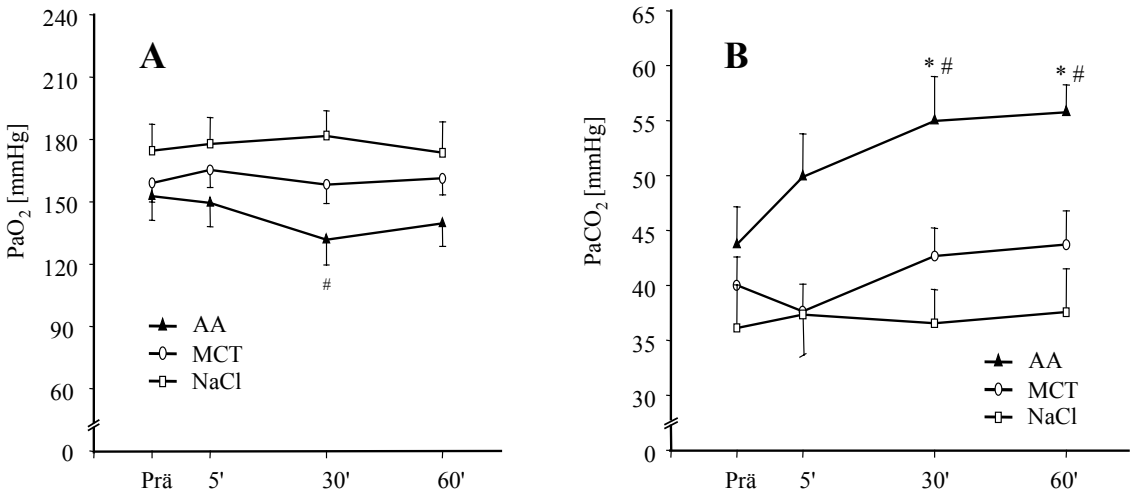

Abb. 25 A-B: Graphische Darstellung der arteriellen Sauerstoff (A) – und Kohlendioxidpartialdrucke (B). Angegeben sind Mittelwerte ± SEM. # $p<0,05$ AA *vs*. NaCL, * $p<0,05$ *vs*. Prä.

PaO_2 [mmHg]				
Versuchsgruppe	**Prä**	**5´**	**30`**	**60`**
AA-Gruppe	153 ± 11	149 ± 11	132 ± 12	139 ± 11
MCT-Gruppe	159 ± 9	165 ± 8	158 ± 9	161 ± 8
NaCl-Gruppe	170 ± 17	174 ± 17	178 ± 17	171 ± 17
$PaCO_2$ [mmHg]				
AA-Gruppe	43 ± 3	50 ± 4	55 ± 4	56 ± 2
MCT-Gruppe	40 ± 3	38 ± 3	43 ± 3	44 ± 3
NaCl-Gruppe	38 ± 5	39 ± 5	38 ± 4	40 ± 5
ph				
AA-Gruppe	7,31 ± 0,04	7,28 ± 0,04	7,23 ± 0,03*#	7,18 ± 0,03*#
MCT-Gruppe	7,36 ± 0,02	7,35 ± 0,02	7,31 ± 0,03	7,27 ± 0,02*
NaCl-Gruppe	7,39 ± 0,66	7,36 ± 0,66	7,34 ± 0,66*	7,32 ± 0,66*
HCO_3^- [mmol/l]				
AA-Gruppe	21,2 ± 0,9	22,1 ± 0,7	22,0 ± 0,8	20,2 ± 1,4
MCT-Gruppe	21,9 ± 1,07	20,7 ± 1,3	20,7 ± 0,7	19,3 ± 1,0*
NaCl-Gruppe	21,8 ± 2,2	21,1 ± 1,9	20,0 ± 1,9	19,0 ± 2,0*

Tab. 12: Ergebnisse der arteriellen Blutgasanalyse. PaO_2 aterieller Sauerstoffpartialdruck, PaCo2 arterieller Kohlendioxidpartialdruck, ph-Wert, HCO3- Bicarbonatkonzentration. Angegeben sind Mittelwerte ± SEM. * p < 0,0,5 vs. Prä. # p<0,05 AA *vs* MCT, NACL.

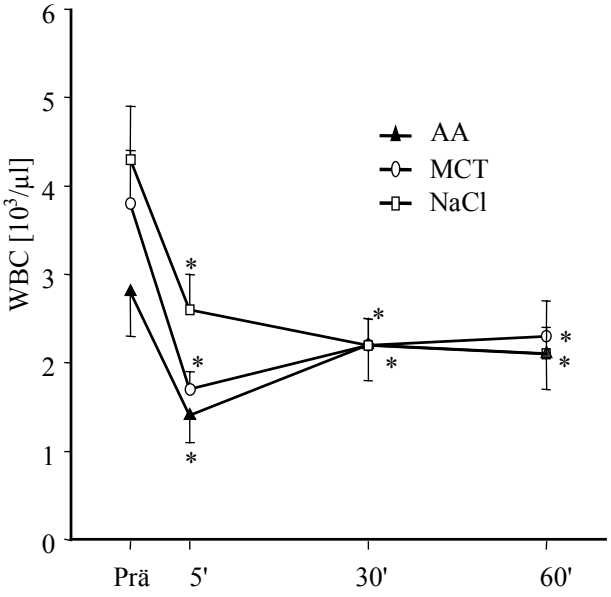

Abb. 26: Gemessene Leukozytenkonzentration im Vollblut, vor (Prä), sowie 5 (5‘), 30 (30‘) und 60 Minuten (60‘) nach der intravenösen Injektion von 20µg/Kg KG Endotoxin. Angegeben sind Mittelwerte ± SEM. * p< 0,05 *vs*. Prä.

3.3 Blutbild

Erythrozytenzahl (RBC), Hämoglobinkonzentration (Hb) und Hämatokrit bleiben über den Untersuchungszeitraum von 60 min nahezu unverändert. Die nach 60 min tendenziell geringradid erniedrigten Werte im Vergleich zum Ausgangswert sind als Folge der mehrmals durchgeführten Blutentnahmen zu bewerten.

Die Anzahl zirkulierender Leukozyten (WBC) sinkt dagegen in allen drei Versuchsgruppen, wie auf Abb. 26 dargestellt, 5 min nach Endotoxininjektion signifikant auf ~50 % der Ausgangswerte ab. Auch 60 min nach Endotoxininjektion liegt die

RBC [10^6 / µl]				
Versuchsgruppe	**Prä**	**5´**	**30`**	**60`**
AA-Gruppe	5,5 ± 0,1	5,1 ± 0,2	5,0 ± 0,1	5,1 ± 0,2
MCT-Gruppe	5,8 ± 0,2	5,4 ± 0,2	5,5 ± 0,2	5,6 ± 0,2
NaCl-Gruppe	5,8 ± 0,2	5,4 ± 0,2	5,4 ± 0,2	5,3 ± 0,2
WBC [10^3 / µl]				
AA-Gruppe	3,8 ± 0,6	1,7 ± 0,2*	2,2 ± 0,3*	2,3 ± 0,4*
MCT-Gruppe	2,8 ± 0,5	1,4 ± 0,3*	2,2 ± 0,4*	2,1 ± 0,4
NaCl-Gruppe	4,3 ± 0,6	2,6 ± 0,4*	2,2 ± 0,3*	2,1 ± 0,3*
PLT [10^3 / µl]				
AA-Gruppe	158 ± 32	158 ± 21	127 ± 25	115 ± 15
MCT-Gruppe	197 ± 20	145 ± 29*	145 ± 20*	148 ± 22
NaCl-Gruppe	116 ± 30	87 ± 22#	91 ± 18	110 ± 35
Hb [g / dl]				
AA-Gruppe	11,8 ± 0,2	11,0 ± 0,4	11,0 ± 0,3	11,0 ± 0,4
MCT-Gruppe	12,0 ± 0,3	11,3 ± 0,4	11,6 ± 0,3	11,7 ± 0,4
NaCl-Gruppe	12,0 ± 05	11,2 ± 0,5	11,2 ± 0,5	11,0 ± 0,5
Hk [%]				
AA-Gruppe	37,8 ± 1,0	34,6 ± 1,1	34,0 ± 1,0	34,2 ± 1,5
MCT-Gruppe	37,4 ± 0,8	35,2 ± 1,4	35,9 ± 1,0	36,7 ± 1,4
NaCl-Gruppe	37,4 ± 1,3	34,5 ± 1,5	34,4 ± 1,7	34,0 ± 1,4

Tab. 13: Übersicht der gemessenen hämatologischen Parameter vor (Prä), sowie 5, 30, und 60 Minuten nach intravenöser Injektion von Endotoxin. RBC Erythrozytenkonzentration, WBC Leukozytenkonzentration, PLT Thrombozytenkonzentration, Hb Hämoglobinkonzentration, Hk Hämatokritwert. Angegeben sind Mittelwerte ± SEM. * $p<0,05$ *vs*. Prä, # $p<0,05$ NaCL *vs*. AA.

periphere Leukozytenzahl niedriger als vor Endotoxininjektion. Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind nicht zu beobachten.

Die Anzahl an Thrombozyten ist in der MCT-Gruppe zum Zeitpunkt 5`und 30`im Vergleich zum Ausgangswert reduziert und liegt in der NaCL-Gruppe zum Zeitpunkt 5` im Vergleich zur AA-Gruppe niedriger. Alle gemessenen Thrombozytenzahlen liegen jedoch innerhalb des physiologischen Normalbereichs

3.4 Blutchemische Parameter

3.4.1 Triglyceridkonzentration

Um den Anstieg an Plasmatriglyceriden durch das verwendete Lösungsmittel MCT zu kontrollieren, wurde in allen Versuchstieren die Konzentration an Plamatriglyceriden zu den auf Abb. 16 angegebenen Versuchszeitpunkten bestimmt. In der AA-Gruppe und der MCT-Gruppe erfolgt über den gesamten Infusionszeitraum von 5h ein signifikanter Anstieg der Plasmatriglyceride auf das rund 2,6-fache des Ausgangswertes. Jedoch erfolgt ebenso in der NaCl-Gruppe, also in den Versuchstieren die lediglich kontinuierlich mit physiologischer Kochsalzlösung infundiert wurden, ein infusionsunabhängiger Anstieg der Triglyceridkonzentration auf das ca. 2-fache des Ausganswertes. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen liegen zu keinem Versuchzeitpunkt vor. Durch den gewählten Lösungsvermittler MCT erfolgt unter Versuchsbedingungen damit ein Konzentrationsanstieg der Plasmatriglyceride innerhalb physiologischer Grenzwerte.

3.4.2 Konzentration an freien Fettsäuren

Bei den Versuchtieren wurden neben der Triglyceridkonzentration auch die Gesamtkonzentration an freien Plasmafettsäuren bestimmt. Nach 4-stündiger Infusion der freien Arachidonsäure erfolgt in der AA-Gruppe ein signifikanter Anstieg der freien Fettsäuren im Vergleich zum Ausgangswert. Die Konzentration an freien Fettsäuren steigt jedoch ebenso in der MCT und NaCl-Gruppe nach 4-stündiger Infusion tendenziell an, so daß die Gruppenunterschiede kein signifikantes Niveau erreichen. 60 min nach Endotoxininjektion ist die Konzentration an freien Plasmafettsäuren in allen drei Versuchsgruppen tendenziell wieder erniedrigt.

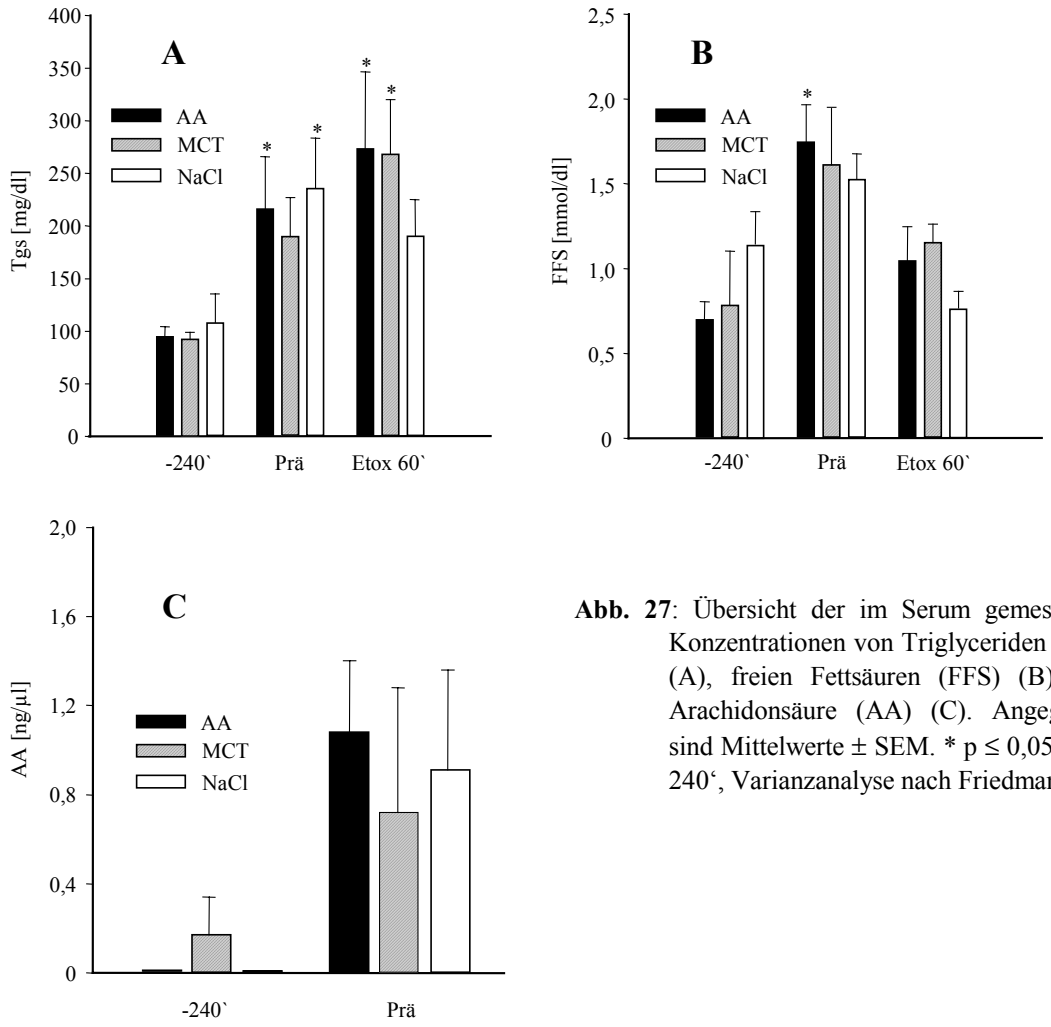

Abb. 27: Übersicht der im Serum gemessenen Konzentrationen von Triglyceriden (Tgs) (A), freien Fettsäuren (FFS) (B) und Arachidonsäure (AA) (C). Angegeben sind Mittelwerte ± SEM. * $p \leq 0,05$ vs. – 240‘, Varianzanalyse nach Friedman.

3.4.3 Thromboxane B_2- Konzentration

Als Hinweis auf mögliche oxidadative Metabolisierung der Arachidonsäure zu biologisch potent wirksamem Thromboxan A_2 (Tx A_2) wurde mit Hilfe eines Enzym-Immuno-Assays die Plasma Konzentration an Thromboxan B_2, dem stabilen Abbauprodukt von TxA_2, bestimmt. Die Konzentration wurde in den Plasmaproben sowohl vor (Prä) als auch 60 min (60’) nach Endotoxininjektion gemessen. Die Ergebnisse sind graphisch als Säulendiagramm auf Abb. 28 dargestellt. In der AA-Gruppe steigt die Konzentration an TxB_2 60 min nach Endotoxininjektion auf die annähernd 2-fache Konzentration des Ausganswertes an und erreicht im Intergruppenvergleich Signifikanzniveau. In der NaCl- bzw. MCT-Gruppe erfolgt nach Endotoxininjektion nur eine unwesentliche Änderung der TxB_2-Plasmakonzentrationen.

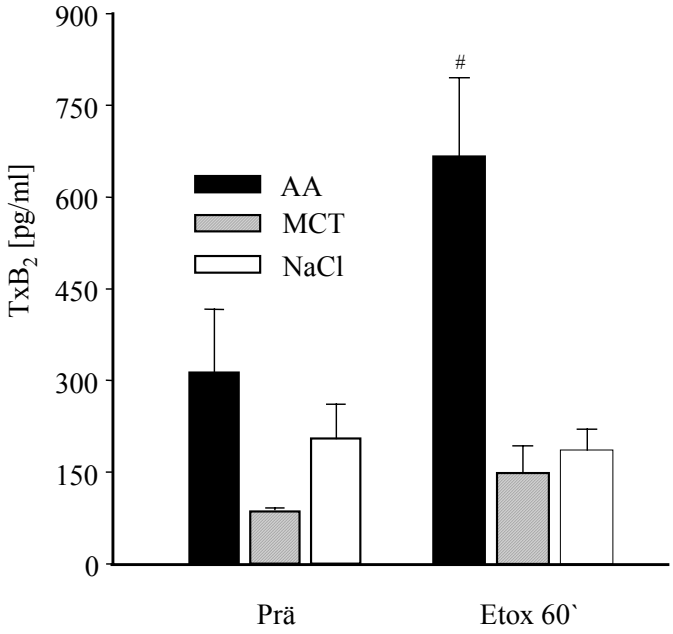

Abb. 28: Plasmakonzentration des gemessenen Thromboxan B_2 vor (Prä) sowie 60 Minuten nach Endotoxininjektion (Etox 60'). Angegeben sind Mittelwerte ± SEM. # $p \leq 0{,}05$ AA vs. MCT, Varianzanalyse nach Kruskal Wallis.

3.5 Mikrohämodynamik und Leukozytenadhärenz in Arteriolen und Venolen

3.5.1 Gefäßdurchmesser

Auf Abbildung 29 A sind die Gefäßdurchmesser der untersuchten Arteriolen und Venolen über den Versuchsverlauf hinweg dargestellt. In der AA-Gruppe zeigt sich in den Arteriolen zum Zeitpunkt 30' und 60'eine tendenzielle Reduktion der Gefäßdurchmesser, die Unterschiede erreichen jedoch kein signifikantes Niveau. In pulmonalen Venolen sind die Gefäßdurchmesser in der AA-Gruppe und MCT-Gruppe 30 und 60 Minuten nach Endotoxininjektion im Vergleich zum Ausgangswert verkleinert. Auch in der NaCl-Gruppe zeigt sich eine tendenzielle Reduktion der Gefäßdurchmesser, Signifikanzniveau wird jedoch nicht erreicht (p=0,064).

3.5.2 Erythrozytenfließgeschwindigkeit, Blutvolumenfluß, Wandscherrate

Nach der intravenösen Injektion von Endotoxin sinkt in allen drei Versuchsgruppen die mittlere Erythrozytenfließgeschwindigkeit in pulmonalen Arteriolen und Venolen ab

(Abbildung. 29B). Bei simultaner Infusion der Arachidonsäure ist die Reduktion der Fließgeschwindigkeit zu allen Untersuchungszeitpunkten stärker ausgeprägt und liegt 60 min nach Endotoxininjektion in Arteriolen bei nur 17 %, in Venolen bei 34% des Ausganswertes. Äquivalent zur Reduktion der Erythrozytenfließgeschwindigkeit sinken in pulmonalen Arteriolen und Venolen ebenso der Blutvolumenfluß Q (Abb. 29C) und die Wandscherrate γ (Abb. 30B). In der AA-Gruppe sinkt der Blutvolumenfluß innerhalb 60 min nach Endotoxininjektion in Arteriolen um 85 % und in Venolen um 72%. In der MCT- bzw. NaCL-Gruppe reduziert sich der Blutvolumenfluß dagegen im Mittel um 44,5% in Arteriolen bzw. 56 % in Venolen.

Auf Abbildung 30B sind die Ergebnisse der nach Formel 10 berechneten Wandscherraten zusammengefaßt. Die starke Reduktion der Blutfließgeschwindigkeit bei geringgradigen Veränderungen der Gefäßdurchmesser führt insbesondere in der AA-Gruppe zu einer starken Reduktion der Wandscherraten in den untersuchten Arteriolen und Venolen. In der AA-Gruppe liegt die Wandscherrate zum Zeitpunkt 60` in Arteriolen bei 17% und in Venolen bei 38 % des Ausganswertes, in der MCT- und NaCL- Grupppe hingegen liegen die Wandscherraten 60 min nach Endotoxininjektion im Mittel in Arteriolen bei 71% und in Venolen bei 73% des Ausganswertes. Vor allem die starke Reduktion der Wandscherraten in der Arachidonsäuregruppe muß auch in Zusammenhang mit der Interpretation der Leukozyten-Endothelzellinteraktion diskutiert werden.

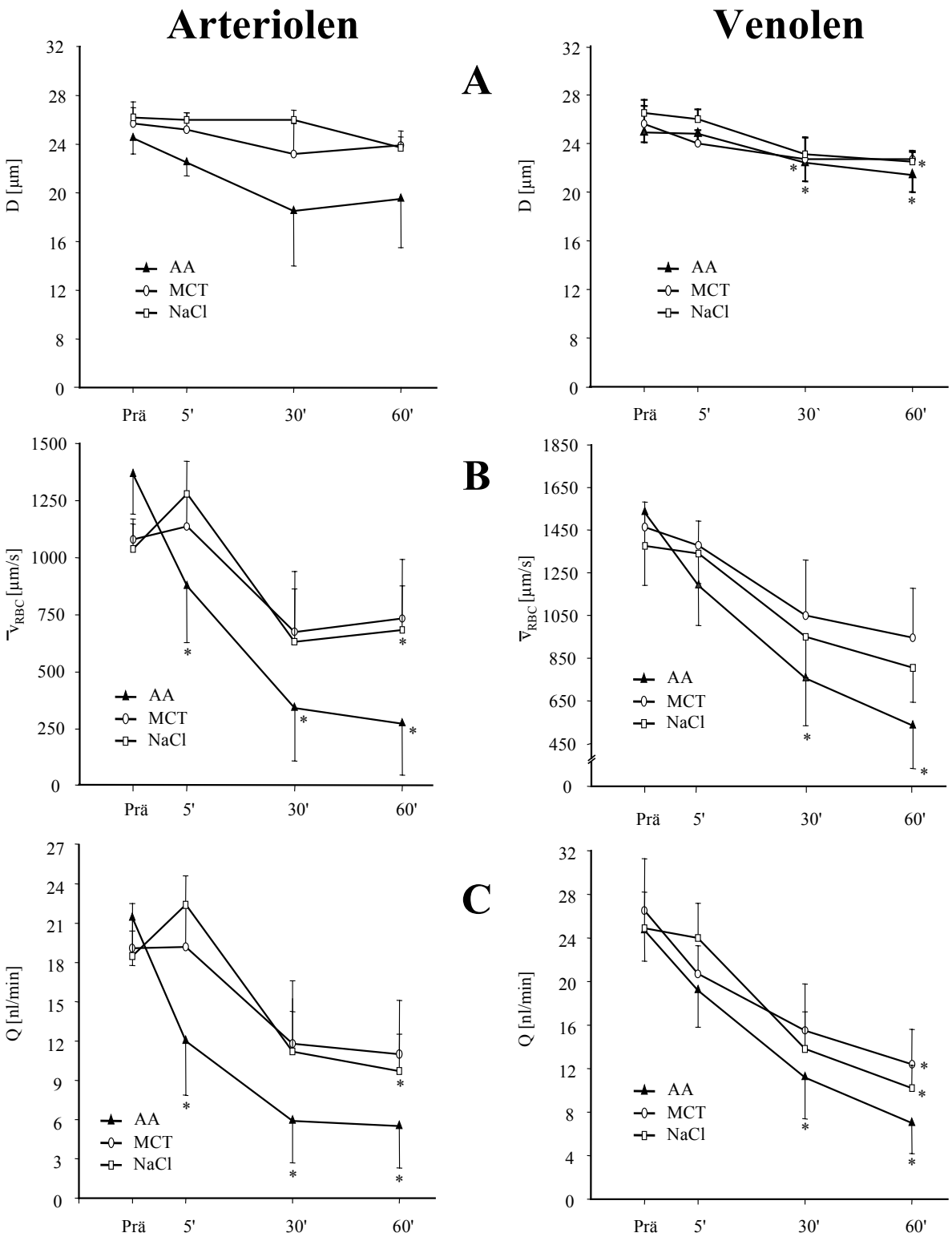

Abb. 29 A-C: Quantifizierte Parameter der Mikrohämodynamik in pulmonalen Arteriolen und Venolen vor (Prä), sowie 5 (5‘) 30 (30‘) und 60 Minuten (60‘) nach intravenöser Endotoxinapplikation. A: Gefäßdurchmesser (D), B: mittlere Erythrozytenfließgeschwindigkeit (v_{RBC}), C: Blutvolumenfluß (Q). Angegeben sind Mittelwerte ± SEM. * $p \leq 0,05$ vs. Prä, Varianzanalyse nach Friedman, Post hoc Analyse: Dunn’s Test.

3.5.3 Leukozytenadhärenz in Arteriolen und Venolen

Die Anzahl Endothel-adhärenter Leukozyten, also die Anzahl der Leukozyten, die länger als 5s ihre Lokalisation am Endothel nicht veränderten, wurde in den selben Gefäßabschnitten quantifiziert in denen auch die Parameter der Mikrohämodynamik erhoben wurden. Die Ergebnisse sind graphisch auf Abbildung 30A dargestellt.

In der AA-Gruppe erfolgt innerhalb der ersten 30 min nach Endotoxininjektion eine deutliche Zunahme adhärenter Leukozyten. 60 min nach Endotoxininjektion konnte die Anzahl der Endothel-adhärenten Leukozyten aufgrund der geringen Fließgeschwindigkeiten in der überwiegenden Zahl der Versuche nicht mehr quantifiziert werden. Geringe Blufließgeschwindigkeit und damit verbunden stark reduzierte Scherkräfte verhindern eine sichere Differenzierung zwischen Leukoyztenadhärenz und Adhäsionsmolekül-unabhängiger „Leukozytenstase“ und könnten deshalb zu einer wesentlich zu hoch angenommenen Anzahl adhärenter Leukozyten führen.

In pulmoanlen Venolen erfolgt in allen drei Versuchsgruppen über den Untersuchungszeitraum eine Zunahme adhärenter Leukozyten, signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen können nicht beobachtet werden.

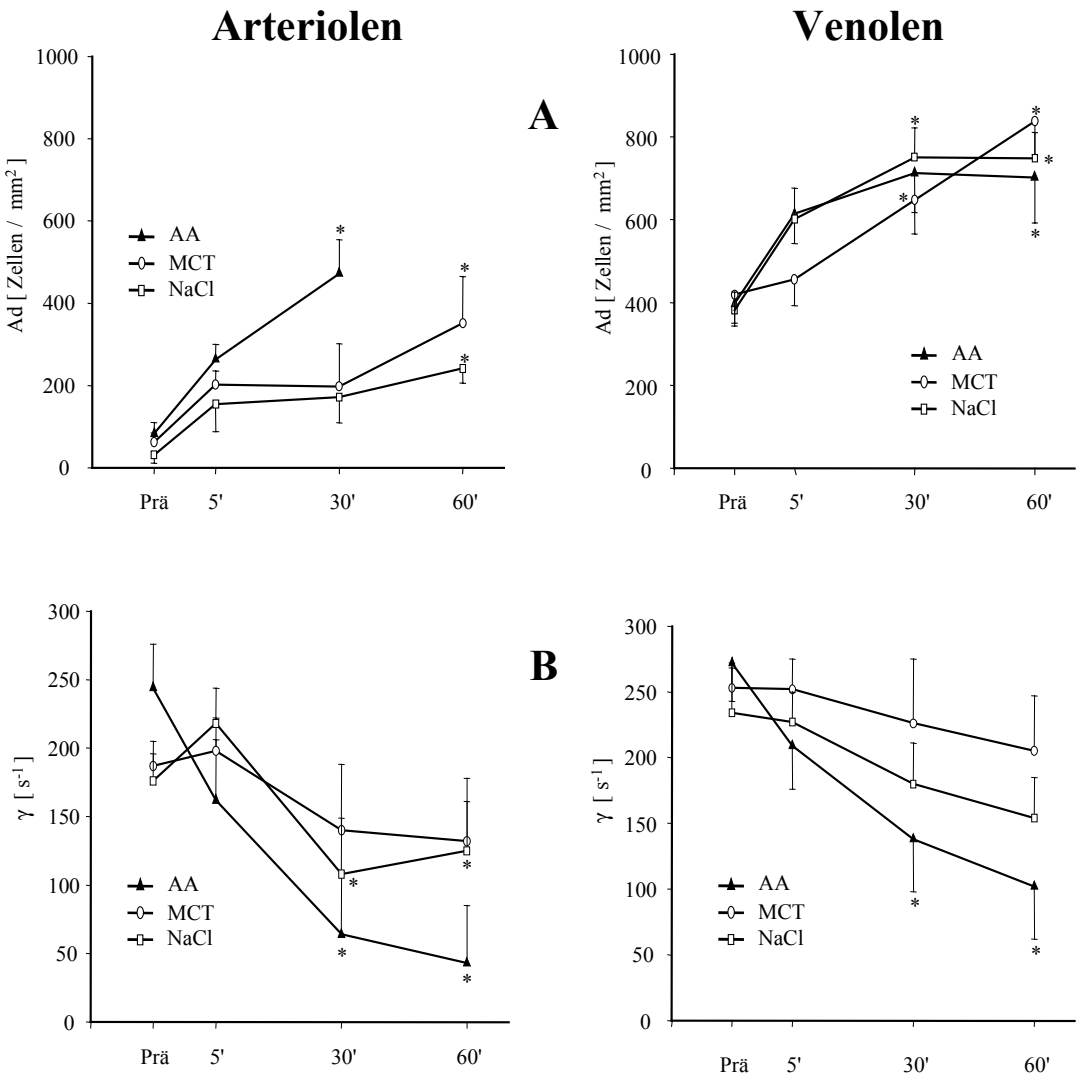

Abb. 30 A-B: Graphische Darstellung der Anzahl Endothel-adhärenter Leukozyten (A) und der Wandscherraten (B) in pulmonalen Arteriolen (linke Spalte) und Venolen (rechte Spalte). Angeben sind Mittelwerte ± SEM. * p≤ 0,05 vs. Prä. Varianzanalyse nach Friedman, Posthoc Analyse: Dunn's Test.

3.6 Mikrohämodynamik und Leukouzytenretention in Alveolarkapillaren

3.6.1 Mittlere Erythrozytenfließgeschwindigkeit in Alveolarkapillaren

Sowohl vor als auch 5, 30 und 60 min nach Endotoxinapplikation wurde die mittlere Erythrozytenfließgeschwindigkeit in den Alveolarkapillaren quantifiziert (Abb. 31A). In allen drei Versuchsgruppen sinkt die mittlere Erythroyzentfließgeschwindigkeit nach der Injektion des Endotoxins über den Untersuchungszeitraum von 60 min kontinuierlich ab.

Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen liegen zu keinem Untersuchungszeitpunkt vor.

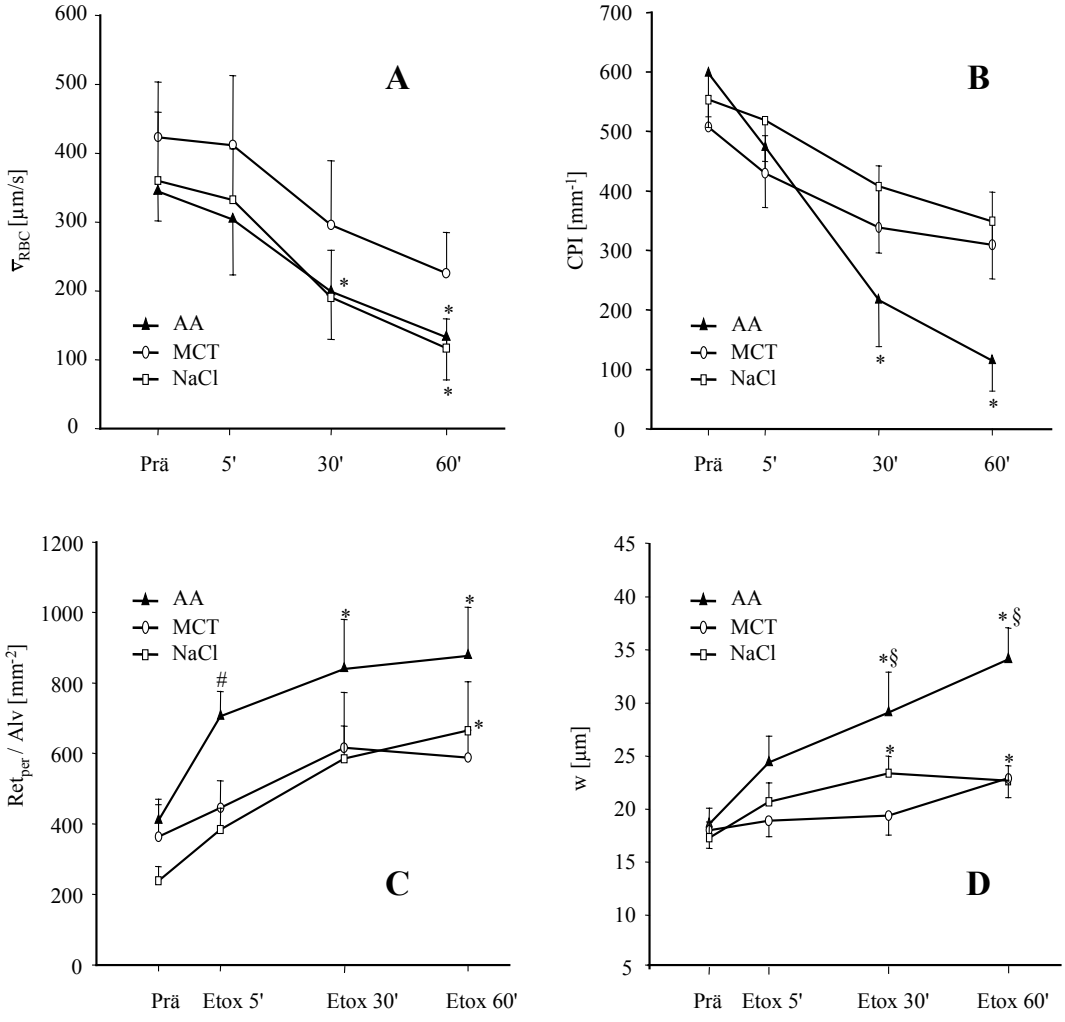

Abb. 31 A-D: Intravitalmikroskopisch erhobene Parameter in den Alveolararealen. A: mittlere Erythrozytenfließgeschwindigkeit in Kapillaren (v_{RBC}); B: funktioneller kapillarer Perfusionsindex (CPI); C: Anzahl permant retinierter Leukozyten in den Alveolarkapillaren (Ret_{per} / Alv); D: Alveolarseptenbreite (w). Angegeben sind Mittelwerte ± SEM. * $p<0,05$ vs. Prä, # $p<0,05$ AA vs. MCT, § $p< 0,05$ AA vs. NACL u. vs. MCT.

3.6.2 Kapillarmorphologie, funktionelle Kapillarperfusion

Die Gesamtlänge der erythrozytenperfundierten Kapillaren sinkt vor allem in der Arachidonsäuregruppe innerhalb von 60 min nach Endotoxinapplikation signifikant ab und liegt zum Zeitpunkt 60` bei 18% des Ausganswertes (Tabelle 14). In der MCT- und NaCL-Gruppe erfolgt dagegen nur eine Reduktion der erythrozyten perfundierten Kapillarlänge um 34%. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen finden sich zum Zeitpunkt 60` jedoch nicht (p=0,054).

Der aus Alveolarfläche und erythrozytenperfundierten Gesamtlänge berechnete Kapillar-Perfusions-Index sinkt konsekutiv ebenfalls in der Arachidonsäuregruppe über den Untersuchungszeitraum am stärksten ab (Abb. 31B). Während in der MCT-und NaCL-Gruppe durchschnittlich noch 62% der funktionellen Kapillarperfusion 60 min nach Endotoxininjektion erhalten sind, liegt der funktionelle Kapillarperfusionsindex in der AA-Gruppe bei nur noch 19% des Ausganswertes.

Alveolarfläche A_{ALV} [10^3 µm^2]				
Versuchsgruppe	**Prä**	**5´**	**30`**	**60`**
AA-Gruppe	14,4 ± 1,6	14,1 ± 1,7	12,7 ± 21	14,0 ± 21
MCT-Gruppe	17,2 ± 2,5	16,9 ± 2,4	15,2 ± 2,4	17,8 ± 2,0
NaCl-Gruppe	13,5 ± 1,7	13,8 ± 1,7	11,9 ± 1,3	13,4 ± 9
Kapillarstrecke L_{ALV} [µm]				
AA-Gruppe	791 ± 88	623 ± 111	272 ± 96*	146 ± 67*
MCT-Gruppe	822 ± 105	692 ± 135	494 ± 172	542 ± 149
NaCl-Gruppe	733 ± 93	700 ± 107	521 ± 152	491 ± 152
Kapillarer Perfusions-Index CPI [µm^{-1}]				
AA-Gruppe	598 ± 73	473 ± 100	217 ± 78*	119 ± 61*
MCT-Gruppe	507 ± 52	430 ± 63	339 ± 104	310 ± 88
NaCl-Gruppe	553 ± 47	518 ± 68	408 ± 112	349 ± 97

Tab. 14: Übersicht der Parameter Alveolarfläche (A_{ALV}), Gesamtlänge der erythrozytenperfundierten Kapillaren (L_{ALV}) und des funktionellen Kapillaren Perfusions-Index (CPI) gemessen vor (Prä), sowie 5 (5‘) 30 (30‘) und 60 Minuten (60‘) nach Endotoxinapplikation. Angegeben sind Mittelwerte ± SEM, * p<0,05 vs. Prä.

3.6.3 Leukozytenretention in Alveolarkapillaren

Die Anzahl der in den Alveolarkapillaren permanent retinierten Leukozyten Ret_{per} / Alv ist zu den unterschiedlichen Versuchszeitpunkten auf Abbildung 31C dargestellt. Innerhalb der ersten 5 min nach Endotoxininjektion nimmt die Anzahl an permanent retinierten Leukozyten in der AA-Gruppe stärker zu als in den beiden anderen Versuchsgruppen. Über den gesamten Untersuchungszeitraum von 60 min nimmt die Anzahl an permant retinierten Leukozyten jedoch in allen drei Versuchsgruppen kontinuierlich zu, so daß 60 min nach Endotoxinapplikation keine signifikanten Gruppenunterschiede mehr beobachtet werden können.

3.6.4 Alveolarseptenbreite

Als Hinweis auf die Entwicklung eines interstitiellen Lungenödems wurde die Breite der Alveolarsepten zu verschiedenen Versuchszeitpunkten gemessen. Die Septenbreite war dabei als kürzester Abstand zweier benachbarter Alveolen definiert. Abb. 31D zeigt den Verlauf der Alveolarseptenbreite in den drei Versuchsgruppen.

Während in der MCT- und NaCL-Gruppe die Septenbreite über den Untersuchungszeitraum nur geringfügig zunimmt, erfolgt in der Arachidonsäuregruppe eine massive Schwellung der Alveolarsepten.. 30 und 60 min nach Endotoxininjektion sind die Alveolarsepten in der Arachidonsäuregruppe signifikant im Vergleich zur MCT-Gruppe verbreitert (Abbildung 31D).

3.7 Myeloperoxidaseaktivität im Lungengewebe

Auf Abbildung 32A-B sind die im Lungengewebeproben gemessenen Myeloperoxidaseaktivitäten sowie die berechneten Granulozytenzahlen graphisch als Säulendiagramme dargestellt. Zusätzlich wurden zum besseren Vergleich außerdem die in Studie II gemessenen MPO-Aktivitäten und Granulozytenzahlen nochmals dargestellt, die hier jedoch natürlich nicht in die statistische Auswertung einbezogen wurden.

Die gemessenen Myeloperoxidaseaktivitäten in der AA,-MCT- und NaCL-Gruppe liegen im Vergleich zur Myeloperoxidaseaktivität in Versuchsstudie I um das 2,8 (NaCL-Gruppe) bis 3,6 –fache (AA-Gruppe) höher. Signifikate Unterschiede zwischen den Gruppen der Studie II können nicht beobachtet werden. Konsekutiv liegen ebenfalls die berechneten Granulozytenanzahlen pro Gramm Lungengewebe (Abb) in der AA-Gruppe mit 28,4 ± 12,3 * 10^6 tendenziell am höchsten, die Anzahl an Granulozyten pro Gram Lungengewebe wird jedoch weder im Vergleich zur NaCl (21,9 ± 5,2 * 10^6) noch zur MCT-Gruppe (24,1 ± 8,8) signifikant übertroffen. Alle drei Versuchsgruppen zeigen deutlich höhere Granulozytenzahlen als die Gewebeproben der Studie II (7,8± 3,7 * 10^6), in der – wie oben dargestellt – kein Endotoxin injiziert worden war.

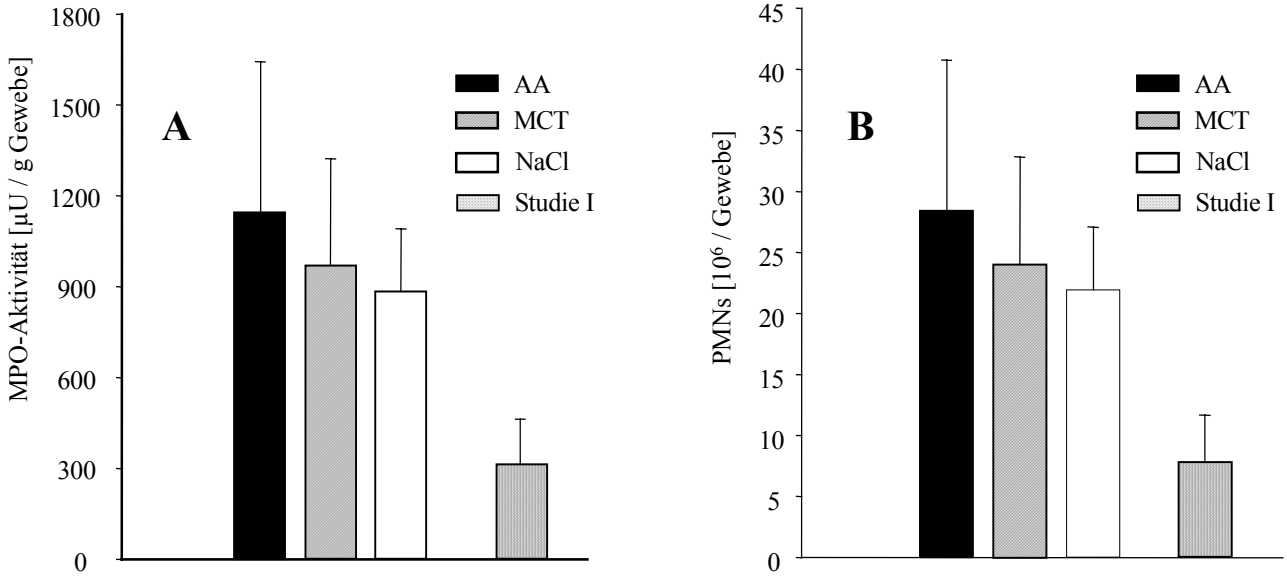

Abb. 32A-B: Myeloperoxidase (MPO)-Aktivität (A) und berechnete Anzahl an Granulozyten pro g Lungengewebe (B). Analysiert wurde jeweils der linke Lungenunterlappen. Angegeben sind Mittelwerte ± SEM.

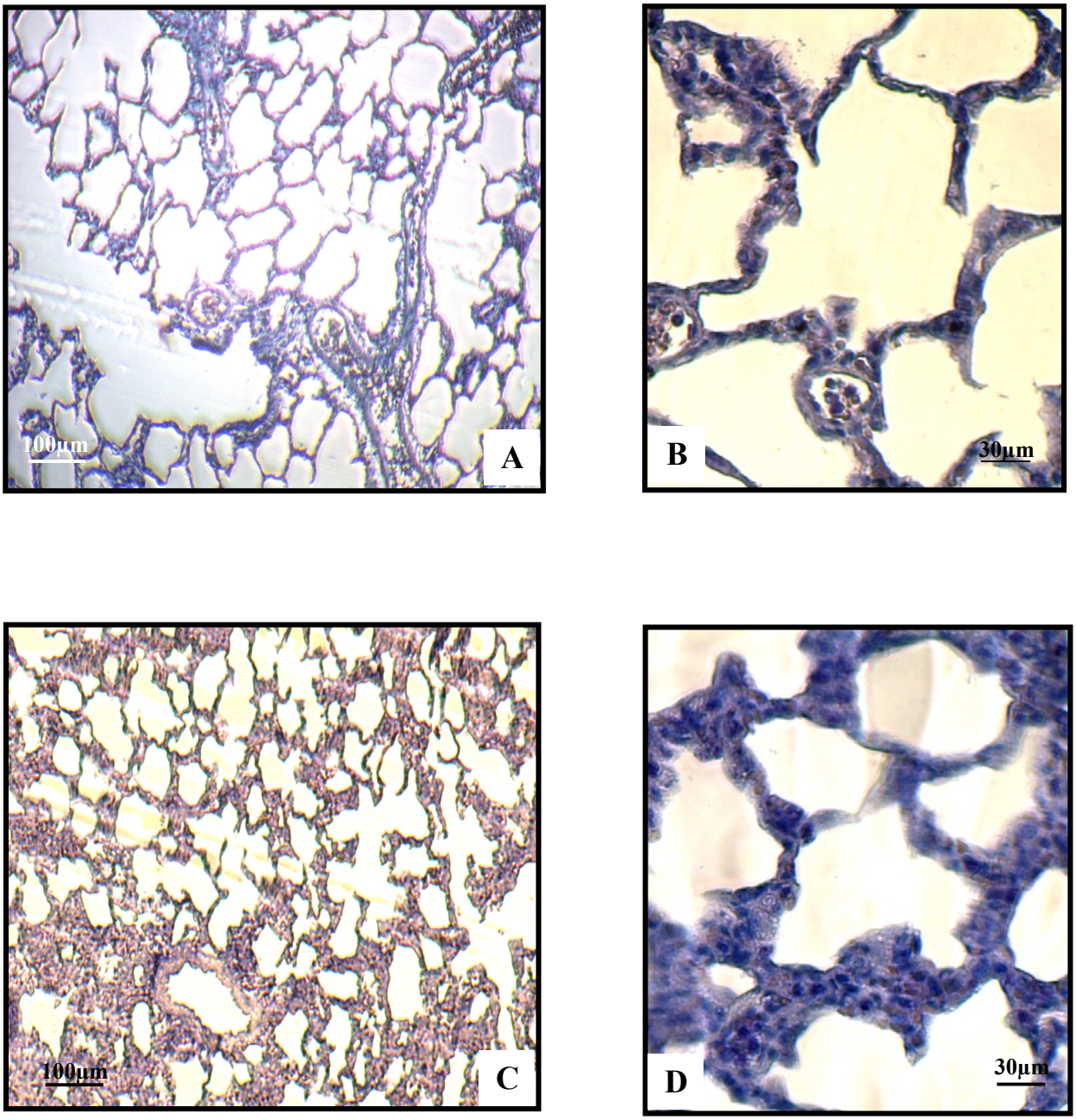

Abb. 33 A-C: Histologische Schnitte der Lunge in Esterasefärbung von Tieren der Studie III. A und B: Tier der MCT-Gruppe, C und D: histologische Präparate von Tieren der Arachidonsäuregruppe jeweils nach 5 stündiger Infusion von MCTs bzw. Arachidonsäure und 60 minütiger Endotoxinämie. In den Präparaten der Arachidonsäuregruppe sind deutlich ödematös aufgequollene Alveolarsepten zu erkennen. Vergrößerung der Schnitte A,C: 10 X, B,D: 40 X.

3.8 Histologie

Histologisch ließen sich in allen drei Versuchsgruppen eine Leukozyteninfiltration nachweisen. Die in der Esterasefärbung zu identifizierenden Granulozyten waren in den pulmonalen Gefäßen randständig, am Gefäßendothel anhaftend lokalisiert. Typisch zu erkennen ist auch die abgeplattete Form der endothel-adhärenten Granulozyten auf Abbildung 34-B. In der AA-Gruppe konnten darüber hinaus in pulmonalen Gefäße ebenso Aggregate aus verschiedenen Zellen, Granulozyten, Erythrozyten und Thrombozyten nachgewiesen werden (Abb. 34A-B). Eine Emigration von Neutrophielen Granulozyten in das Interstitium oder den Alveolarraum konnte nur sehr vereinzelt beobachtet werden. In der Arachidonsäuregruppe zeigten sich ebenso auf den histologischen Schnitten stark ödematös verquollene Alveolarsepten als Ausdruck eines interstitiellen Lungenödems (33D).

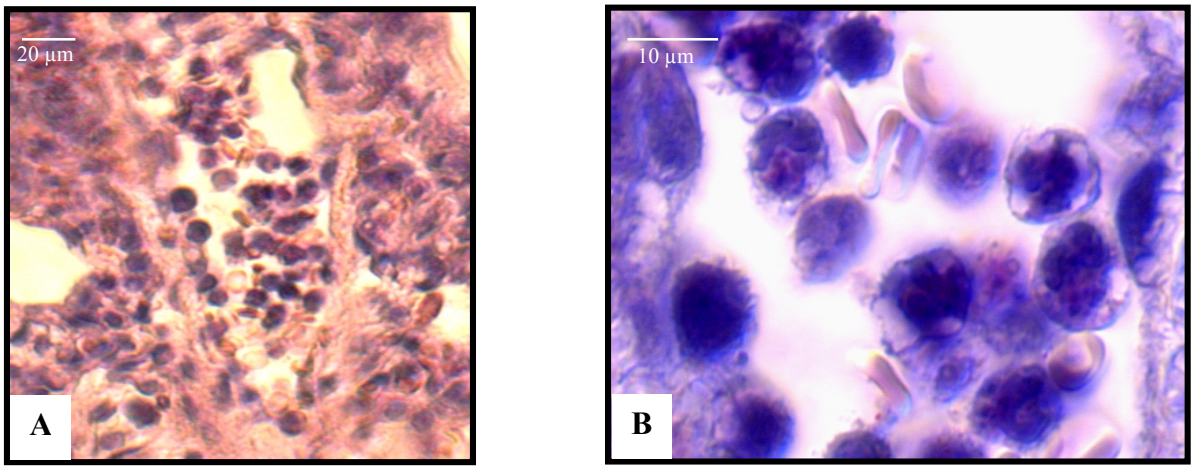

Abb. 34 A-B: Darstellung eines pulmonalen Gefäßes im histologischen Präparat der Arachidonsäuregruppe (Esterasefärbung). Granulozyten mit teilweise typisch abgeflachter Form zeigen deutlichen Kontakt mit dem pulmonalen Endothel. Vergrößerung: A: 40 X, B: 100 X.

4. Studie IV: Thrombozytenkinetik in der pulmonalen Mikrozirkulation

In der Studie IV wurde erstmals in der Lunge intravital die intravaskuläre Kinetik von Thrombozyten und ihre Interaktion mit den pulmonalen Endothelzellen quantitativ untersucht. Da sich in beiden Versuchsgruppen zu diesem Untersuchungszeit keinerlei Differenzen hinsichtlich der quantifizierten Parameter zeigten, wurden zur Beschreibung der Kinetik unstimulierter Bluttplättchen die Ergebnisse beider Versuchsgruppen zusammengefasst und als Mittelwerte aller Experimente (n=11) dargestellt.

4.1 Kinetik unstimulierter Thrombozyten in der pulmonalen Mikrozirkulation

Die gemessenen Paramter der Makrohämodynamik und des Gasaustausches lagen zum Zeitpunkt der Untersuchung alle im physiologischen Normalbereich (AP_m: 87 ± 2,9 mmHg; PAP_m: 16,4 ± 0,8 mmHg; CVP: 4,8 ± 0,7 mmHg; CO: 251 ± 10 ml/min; PVR-Index: 67 ± 5 mmHg × min × l^{-1}; PaO_2: 159 ± 13 mmHg).

Die in pulmonalen Arteriolen und Venolen quantifizierten mikrozirkulatorischen

Parameter	Arteriolen	Venolen
D [µm]	27.6 ± 0,9	27.9 ± 1.6
v_{RBC} [µm/s]	1767 ± 181	1800 ± 184
CV_{vRBC} [%]	7,3 ± 0,5	4,6 ± 0,3
γ [1/s]	287 ± 25	292 ± 30
Q [nl/min]	38,1 ± 6,1	41,6 ± 10,6
v_{PLT} [µm/s]	1936 ± 176	1783 ± 208
CV_{vPLT} [%]	10,7 ± 0,9	6,9 ± 0,5
v_{PLT} / v_{RBC}	1.11 ± 0.03	1.02 ± 0.06
Ad_{PLT} [Zellen/mm^2]	0.0	12.1 ± 9.2

Tab.15: Übersicht der Mikrohämodynamik und der Kinetik unstimulierter Thrombozyten in pulmonalen Arteriolen (n=13) und Venolen (n=15). D Gefäßdurchmesser, v_{RBC} mittlere Erythrozytenfließgeschwindigkeit, CVv_{RBC} Variazionskoef. von V_{RBC}, γ Scherrate, Q Blutvolumenfluß, v_{PLT} mittlere Thrombozytenfließgeschwindigkeit, v_{Plt}/v_{RBC} relative Thromboyztenfließgeschwindigkeit, Ad_{PLT} Anzahl Endothel-adhärenter Thrombozyten bezogen auf die Gefäßoberfläche. Die Untersuchungen wurden an 11 Kaninchen durchgeführt. Alle Werte sind angegeben als Mittelwert ± SEM.

Parameter sind in Tabelle 15 zusammengefasst. Die Gefäßdurchmesser der untersuchten Arteriolen lagen zwischen 23 und 32µm, die der Venolen zwischen 22 und 41µm. Signifikante Unterschiede zwischen Arteriolen und Venolen hinsichtlich der Mikrohämodynamik können nicht beobachtet werden. Unstimulierte fließende Thrombozyten zeigen in etwa die gleiche mittlere Fließgschwindigkeit wie Erythrozyten, erkenntlich an einer relativen Thrombozytenfließgeschwindigkeit von annähernd 1. Bei ähnlichen Scherraten in Arteriolen und Venolen, konnten in Arteriolen keine, in Venolen nur eine sehr geringe Anzahl endothel-adhärenter Thrombozyten beobachtet werden.

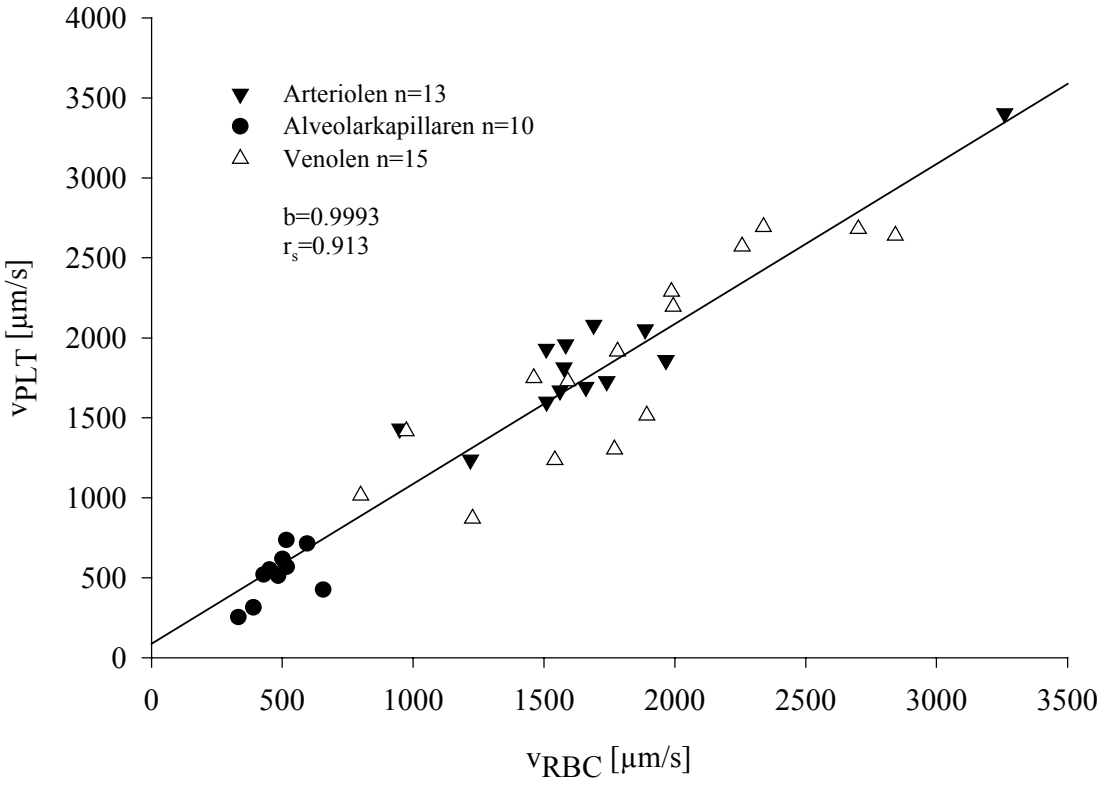

Abb. 35: Korrelation zwischen Erythrozyten und Thrombozytenfließgeschwindigkeit in Arteriolen, Alveolarkapillaren und Venolen. b= Steigung der Korrelationsgeraden, r_s = Korrelationskoeffizient nach Spearman. Anzahl der Versuchstiere N=11.

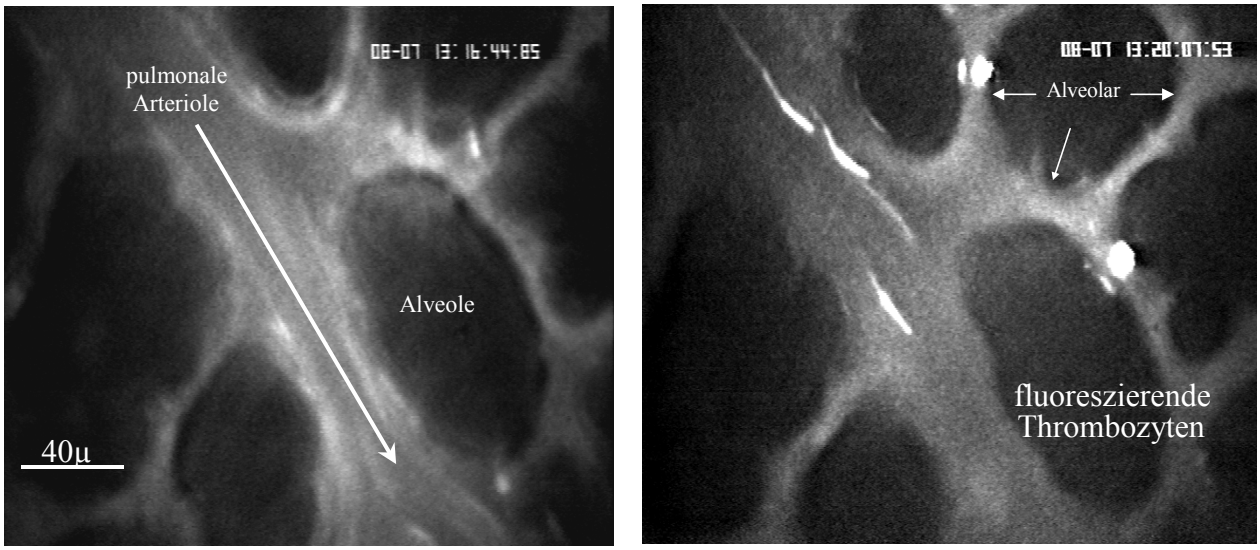

Abb. 36: Intravitalmikroskopisches Bild der fluoreszenzmarkierten unstimulierten Thrombozyten. Dargestellt ist eine Arteriole links im FITC-Modus, recht bei Verwendung des Fluoreszenzfilters für Rhodamin 6G sind im identischen Gefäßsegment die fluoreszierenden Thrombozyten zu erkennen.

Parameter	Kapillaren
Alveolarfläche [10^3 µm^2]	20.7 ± 2.3
Kapillarlänge [µm]	1135 ± 114
CPI [mm^{-1}]	572 ± 52
v_{RBC} [µm/s]	487 ± 30
v_{PLT} [µm/s]	521 ± 49
v_{PLT} / V_{RBC}	1.07 ± 0,08
Ret $_{PLT}$ [Zellen/mm^2]	20.7 ± 7.7

Tab.16: Übersicht der Mikrohämodynamik und der Kinetik unstimulierter Thrombozyten in kapillaren Netzwerken.(n=11). CPI funktioneller Kapillarperfusionsindex, v_{RBC} mittlere Erythrozytenfließgeschwindigkeit, v_{PLT} mittlere Thrombozytenfließgeschwindigkeit, v_{Plt}/v_{RBC} relative Thromboyztenfließgeschwindigkeit, Ret_{PLT} Anzahl permanent retinierter Thrombozyten. Die Untersuchungen wurden in 11 Kaninchen durchgeführt. Alle Werte sind angegeben als Mittelwert ± SEM

Die in 11 Alveolen quantifizierten Parameter der Mikrohämodynamik und Thrombozytenkinetik sind in Tabelle 16 zusammengefasst. Die Fläche der untersuchten Alveolareale lag zwischen 12 × 10^3 und 33 × 10^3 µm^2. Mittlere

Erythrozytenfließgeschwindikeit sowie funktioneller Kapillarperfusionsindex (CPI) waren mit den in den Versuchsstudien I und II quantifizierten Werten vergleichbar. Erwartungsgemäß lag ebenfalls die korpuskuläre mittlere Fließgeschwindigkeit der Thrombozyten signifikant unter der Fließgeschwindigkeit in Arteriolen und Venolen. Nur vereinzelt wurden Thrombozyten im kapillaren Netzwerk retiniert, die überwiegende Mehrheit der Thrombozyten passierte ohne Verzögerungen die Alveolarkapillaren mit einer mittleren alveolären Transitzeit von 31,0 ± 1,8 ms.

Entlang aller mikrovaskulären Gefäßsegmente, Arteriolen, Kapillaren und Venolen konnte eine enge signifikante Korrelation zwischen Erythrozyten und Thromboytenfließgeschwindigkeit ermittelt werden (Abb. 29). Die Steigung der Korellationsgeraden lag bei 0,993, der Korrellationkoeffizient nach Spearman bei 0,913.

Makrohämodynamik [% Ausganswert]		**Blutgase [% Ausganswert]**	
AP_m	98,0 ± 6.6	**PaO_2**	129,8 ± 18,7
PAP_m	102,9 ± 11,2	**$PaCO_2$**	96,4 ± 5,3
CO	100,5 ± 7,6	**pH**	100,4 ± 0,2
PVR-Index	96,8 ± 13,2	**Saet**	101,5 ± 0,1
HR	97,5 ± 1,8	**HCO_3^-**	103,2 ± 7,1

Tab. 17: Parameter der Makrohämodynamik und des Gasaustausches zum Zeitpunkt 60 Minuten angegeben in % des Ausganswertes. AP_m mittlerer arterieller Blutdruck, PAP_m mittlerer pulmonalarterieller Blutdruck, CO Herzzeitvolumen, HR Herzfrequenz, arterieller Sauerstoff und Kohlendioxid-partialdruck PaO_2, $PaCO_2$, Saet Sauerstoffsättigung.

Parameter	**Arteriolen [%Ausganswert]**	**Kapillaren [%Ausganswert]**	**Venolen [% Ausganswert]**
D	97,4 ± 1,4	-	99,7 ± 2,4
v_{RBC}	100,5 ± 8,1	96,7 ± 6,3	110,3 ± 17,4
γ	102,8 ± 7,8	-	110,1 ± 16,3
v_{PLT}	102,3 ± 13,9	93,7 ± 6,3	100,9 ± 28,1
CPI	-	100,2 ± 3,1	-

Tab. 18: Parameter der Mikrohämodynamik und Thrombozytenkinetik in Arteriolen, Kapillaren und Venolen zum Zeitpunkt 60 Minuten in % des Ausgangswertes. D Gefäßdurchmesser, vRBC mittlere Erythrozytenfließgeschwindigkeit, γ Scherraten, vPLT mittlere Thrombozytenfließgeschwindigkeit, CPI funktioneller Kapillarperfusionsindex. N=4

4.2 Konstanz der Parameter

In 4 Versuchstieren wurden makrohämodynamische Parameter sowie in 6 Arteriolen, 7 Venolen und 4 Kapillararealen Gefäßmorphologie, Mikrohämodynamik und Thrombozytenkinetik 60 Minuten nach dem ersten Beobachtungszeitpunkt erneut untersucht, um die Wertekonstanz der quantifizierten Parameter zu kontrollieren. Die relativen Änderungen der Makrohämodynamik sowie des Gasaustausches sind in Tabelle 17 zusammengefasst, die Parameter der Mikrohämodynamik und Thrombozytenkinetik in Arteriolen, Kapillaren und Venolen in Tabelle 18. In sämtlichen erhobenen Parametern waren keine statistisch signifikanten Veränderungen über den Untersuchungszeitraum von 60 Minuten zu beobachten, eine Zunahme der Anzahl endothel-adhärenter Thrombozyten in Arteriolen und Venolen bzw. permanent retinierter Blutplättchen in Alveolarkapillaren waren nicht zu verzeichnen (Abb. 37).

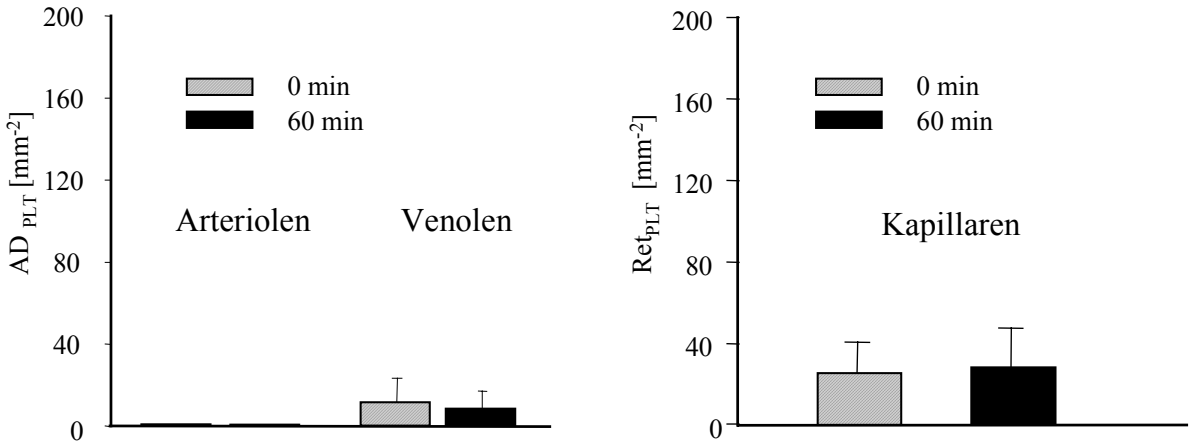

Abb. 37: Anzahl der am arteriolären bzw. venolärem Endothel adhärenten Thrombozyten zum Ausganszeitpunkt und nach 60 Minuten, sowie die Anzahl in Kapillaren permanent retinieter Thrombozuyten. Angegeben sind Mittelwerte ± SEM, Anzahl der Versuchstiere N=4.

4.3 Einfluss der Thrombozytenaktivierung auf die Thrombozytenkinetik

In weiteren 7 Kaninchen wurde der Einfluß der Thromboyztenaktivierung mittels Thrombin auf die Thrombozytenkinetik in Arteriolen, Kapillararealen und Venolen nach dem auf Abb. 17 dargestellten Versuchsprotokoll untersucht.

Die makrohämodynamischen Messergebnisse zum Auaganszeitpunkt (Baseline: unstimulierte Thrombozyten) sowie während der Untersuchung thrombin-aktivierter Thromboyten zum Zeitpunkt 60' sind in Tabelle 19 dargestellt. Zu beiden Untersuchungszeitpunkten lagen annährend gleichwertige makrohämodynamischen Verhältnisse im Körper- und Pulmonalkreislauf vor. Der arterielle Suaerstoffpartialdruck lag zum Zeitpunkt 0` bei 171 ± 15 mmHg, zum Zeitpunkt 60` bei 165 ± 13 mmHg.

Makrohämodynamik		
Parameter	**Baseline**	**60´**
AP_m [mmHg]	89 ± 4	91 ± 4
CVP_m [mmHg]	3,7 ± 0,4	5,1 ± 0,9
PAP_m [mmHg]	16,2 ± 0,7	15,3 ± 1,4
CO [ml*min^{-1}]	247 ± 7	241 ± 6
SVR [mmHg*l^{-1}*min]	347 ± 18	357 ± 15
PVR-Index [mmHg*l^{-1}*min]	66 ± 3	63 ± 5

Tab. 19: Zusammenfassung der makrohämodynamischen Parameter zum Zeitpunkt Baseline (Injektion unstimulierter Thrombozyten, und zum Zeitpunkt 60` nach Injektion der Thrombinaktivierten Blutplättchen. AP_m mittlerer arterieller Blutdruck, PAP_m mittlerer pulmonalarterieller Blutdruck, CVP zentralvenöser Blutdruck, CO Herzzeitvolumen, SVR systemisch vaskulärer Widerstand. Alle Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert ± SEM, Anzahl der Versuchstiere N=7.

Bei Betrachtung der mikrohämodynamischen Paramter und der Gefäßmorphologie (Tab. 20) zeigt sich, dass sowohl die mittlere Erythrozytenfließgeschwindigkeit als auch die berechneten Scherraten in Arteriolen und Venolen ebenso wie die mittlere Erythrozytenfließgschwindigkeit in den Alveolarkapillaren und der funktionelle Kapillarperfusionsindex im Vergleich zum Ausganswert unverändert blieben.

Im Gegensatz zu den Parametern der Mikrohämodynamik sind wesentliche Veränderungen der Thrombozytenfließgeschwindigkeit sowie der Thrombozyten-Endothelinteraktion in Arteriolen, Alveolarkapillaren und Venolen zu beobachten. Die mittlere Fließgeschwindigkeit in Arteriolen reduzierte sich um 28%, in Kapillaren um 24% und in Venolen um 38 % (Abb. 40). Die mittlere alveoläre Transitzeit der Bluttplättchen, die nicht permanent in den Kapillaren retiniert wurde, verlängerte sich tendenziell um 14,9 ms.

Arteriolen		
Parameter	**Baseline**	**60´**
D [µm]	28,0 ± 1,5	27,9 ± 1,8
v_{RBC} [µm/s]	2057 ± 308	1934 ± 280
Q [nl/min]	46,3 ± 10,6	44,0 ± 11,2
γ [s^{-1}]	331 ± 40	312 ± 38
v_{PLT} [µm/s]	2161 ± 313	1564 ± 375
v_{PLT} / v_{RBC}	1,06 ± 0,05	0,85 ± 0,08
Ad_{PLT} [mm^{-2}]	0,0 ± 0,0	98,5 ± 67,6
Venolen		
D [µm]	27,7 ± 2,5	28,3 ± 2,3
V_{RBC} [µm/s]	1820 ± 290	1861 ± 177
Q [nl/min]	43,6 ± 16,9	44,9 ± 14,4
γ [s^{-1}]	297,9 ± 47,7	298,6 ± 24,6
v_{PLT} [µm/s]	1805 ± 297	1111 ± 83 *
v_{PLT} / v_{RBC}	1,05 ± 0,06	0,77 ± 0,66 *
Ad_{PLT} [mm^{-2}]	14 ± 14	188 ± 59 *

Tab. 20: Parameter der Mikrohämodynamik und Thrombozytenkinetik in pulmonalen Arteriolen und Venolen zum Zeitpunkt Baseline (Injektion unstimulierter Thrombozyten) und zum Zeitpunkt 60 Minuten (Injektion thrombin-aktivierter Thrombozyten. D Gefäßdurchmesser, v_{RBC} mittlere Erythrozytenfließgeschwindigkeit, γ Scherrate, Q Blutvolumenfluß, v_{PLT} mittlere Thrombozytenfließgeschwindigkeit, v_{Plt}/v_{RBC} relative Thromboyztenfließgeschwindigkeit, Ad_{PLT} Anzahl Endothel-adhärenter Thrombozyten. Die Untersuchungen wurden in 7 Kaninchen durchgeführt. Alle Werte sind angegeben als Mittelwert ± SEM, *p<0,05 vs. Baseline. Wilcoxon signed Rank Test.

Alveolarkapillaren		
Parameter	**Baseline**	**60´**
CPI [mm^{-1}]	515 ± 56	479 ± 51
v_{RBC} [µm/s]	505 ± 47	538 ± 58
v_{PLT} [µm/s]	544 ± 75	411 ± 91
v_{PLT} / v_{RBC}	1,08 ± 0,12	0,80 ± 0,16
t_{ALV} [ms]	30,4 ± 2,6	45,3 ± 9,7
Ret $_{PLT}$ [Zellen/mm^2]	17 ± 9	143 ± 25 *

Tab. 21: Parameter der Mikrohämodynamik und Thrombozytenkinetik in kapillaren Netzwerken von unstimulierten (Baseline) und thrombin-aktivierten Thrombozyten (60`). CPI funktioneller Kapillarperfusionsindex, v_{RBC} mittlere Erythrozytenfließgeschwindigkeit, v_{PLT} mittlere Thrombozytenfließgeschwindigkeit, t_{ALV} alveoläre Transitzeit, v_{Plt}/V_{RBC} relative Thromboyztenfließgeschwindigkeit, Ret_{PLT} Anzahl permanent retinierter Thrombozyten. Die Untersuchungen wurden in 7 Kaninchen durchgeführt. Alle Werte sind angegeben als Mittelwert ± SEM, *p<0,05 *vs*. Baseline.

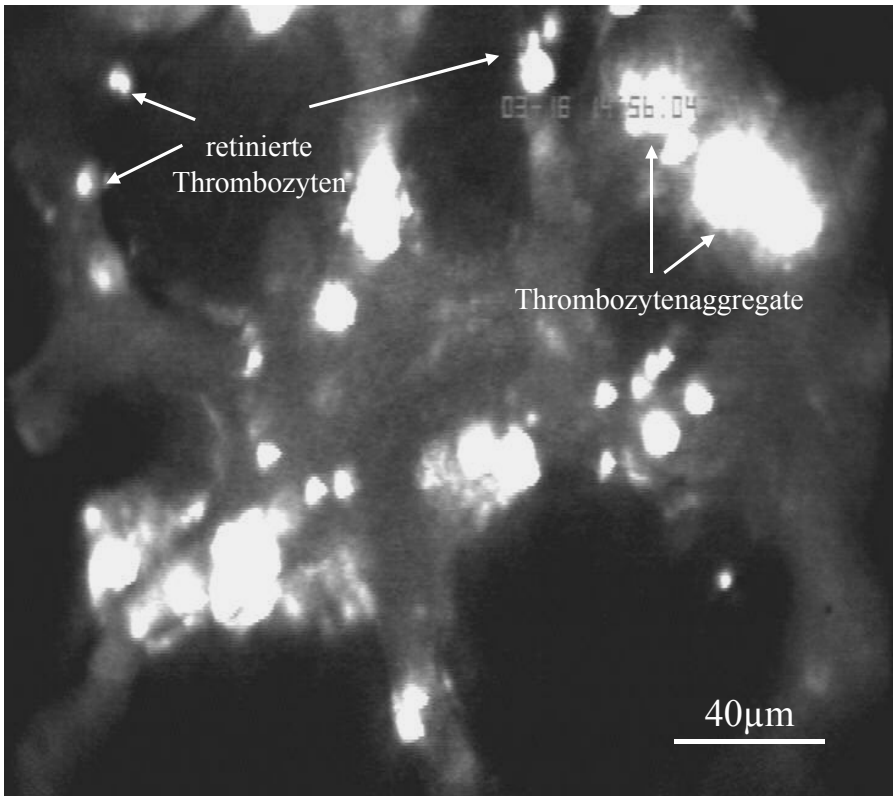

Abb. 38: Intravitalmikroskopische Aufnahme nach der Injektion thrombin-aktivierter Thrombozyten. Es zeigen sich in den Kapillaren retinierte Blutplättchen, sowie ebenso Thrombozytenaggregate.

Nach wie vor bestand eine signifikante Korrelation zwischen Erythrozyten- und Thrombozytenfließgeschwindigkeit entlang aller mikrovaskulären Gefäßsegmente (Abb. 39). Der Korellationskoeffizient nach Spearman lag bei 0,81, im Vergleich zur Korrelation zwischen der Geschwindigkeit unstimulierter Thrombozyten und Erythrozyten zeigt sich jedoch eine Abnahme der Geradensteigung um 52%.

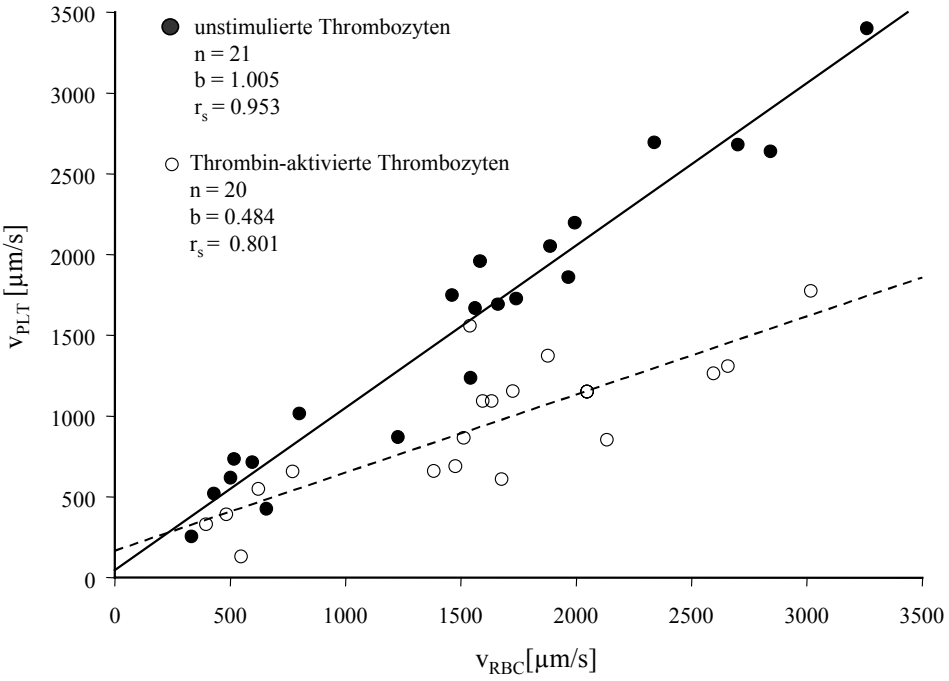

Abb. 39: Korrelation der Erythrozyten- und Thrombozytenfließgeschwindigkeit nach Injektion von unstimulierten und thrombinaktivierten Thrombozyten in Arteriolen, Kapillaren und Venolen. Anzahl der Versuchstiere N=7, b=Steigung der Korrelationsgeraden, r_s= Korrelationskoeffizient nach Spearman.

Während unter Ausgangsbedingungen keine adhärenten Thrombozyten am arteriolären Gefäßendothel nachweisbar waren, stieg die Anzahl Endothel-adhärenter Thrombozyten in Arteriolen auf 99 ± 67 Zellen pro mm^2 Gefäßwandoberfläche. In den Alveolarkapillaren erfolgte ein 8-facher Anstieg permanent retinierter Thrombozyten, in Venolen lag die Zahl endothel-adhärenter Blutplättchen im Vergleich zum Ausgangswert 13-fach höher (Abb. 41.)

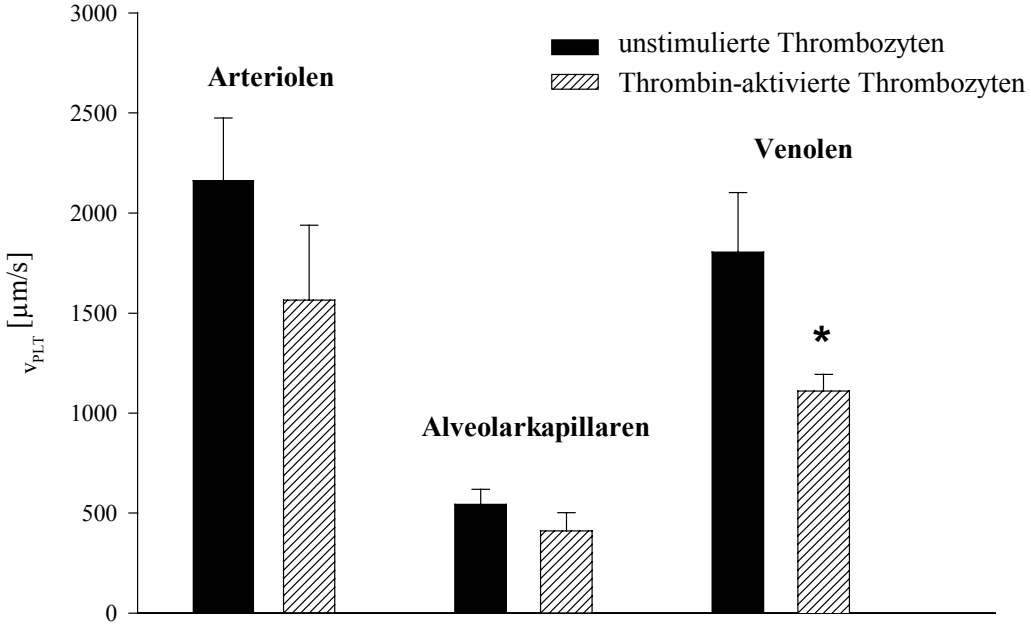

Abb. 40: Thrombozytenfließgeschwindigkeit in Arteriolen (n=7), Kapillaren (n=6) und Venolen (n=8) nach der Injektion von unstimulierten und thrombin-aktivierten Thrombozyten untersucht in 7 Versuchstieren. Alle Resultate sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. *p<0,05 unstimul. *vs*. aktivierte Thrombozyten. Wilcoxon Signed Rank Test.

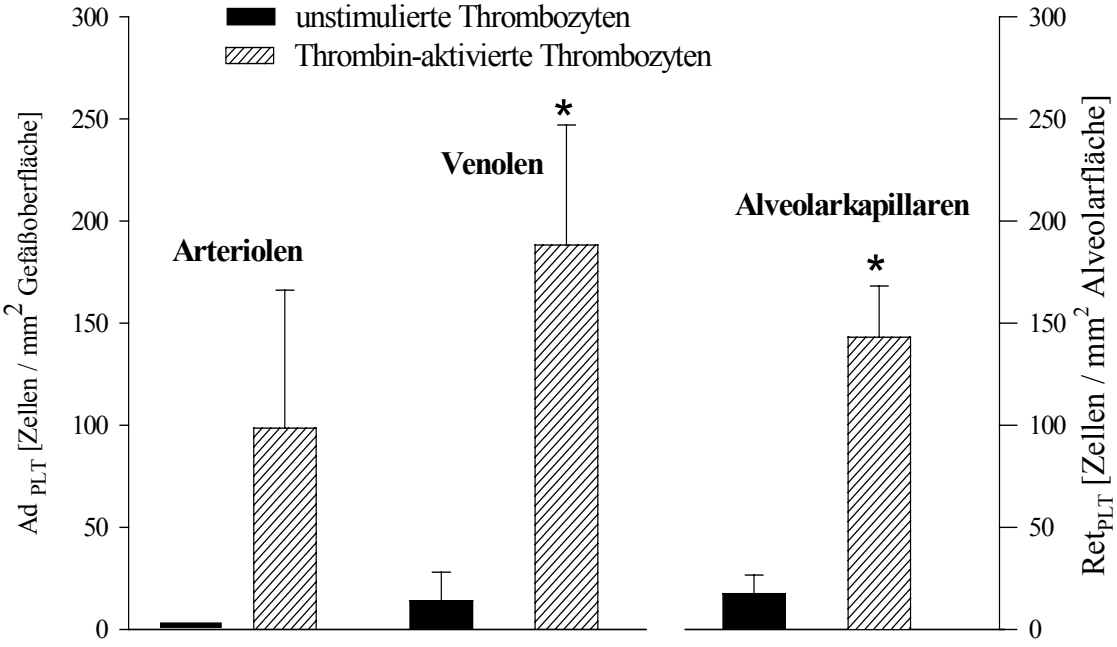

Abb. 41: Vergleich der Anzahl endothel-adhärenter Thrombozyten in Arteriolen und Venolen bzw. retinierter Thrombozyten in Alveolarkapillaren nach Injektion unstimulierter und thrombin-aktivierter Thrombozyten. Alle Ergebnisse sind angegeben als Mittelwerte ± SEM. *p<0,05 *vs*. unstimulierte Thrombozyten.

IV. Diskussion

1. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren in Erythrozytenkonzentraten

Grundlage der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von Erythrozytenkonzentraten hinsichtlich des Gehaltes an freien ungesättigten Fettsäuren in Abhängigkeit der Konservierungszeit. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Konzentration mehrfach ungesättigter Fettsäuren in Konzentraten mit einem mittleren Alter von 35 Tagen signifikant die Konzentration in frischen Erythrozytenkonzentraten übertrifft. Arachidonsäure zeigte im Vergleich zu anderen mehrfach ungesättigten Fettsäuren den stärksten prozentualen Anstieg und war in annähernd äquivalenten Konzentrationen in der Lage, die Respiratory-Burst Aktivität humaner neutrophiler Granulozyten *in vitro* zu stimulieren. Diese Veränderungen sind mit besonderem Blick auf das Konservierungsverfahren sowie potentielle Wirkungen auf den Organismus im Rahmen einer Transfusion zu diskutieren.

1.1 Einfluss des Konservierungsverfahrens

Das beschriebene Herstellungsverfahren lieferte buffy coat-freie Erythrozytenkonzentrate in additiver Lösung. Dieses als CPD/SAGM-System bezeichnete Konservierungsverfahren von Erythrozytenkonzentraten ist in Deutschland seit mehr als 10 Jahren etabliert und findet breiten klinischen Einsatz. Die zugesetzte additive Lösung verbessert die Aufrechterhaltung des Energiehaushaltes und der Membranstabilität von Erythrozyten während der Lagerung und ermöglicht damit eine verlängerte Verwendbarkeit (19,115). Zu den geforderten Qualitätskriterien gehören derzeit eine ausreichende Menge überwiegend voll funktionsfähiger Erythrozyten (>80% der Erythrozytenmasse des Vollblutes) sowie eine Hämolyserate am Ende der Laufzeit, die 0,8% der Erythrozytenmasse nicht überschreiten darf. Als Grenzwert der Verwendbarkeit von Erythrozytenkonzentraten ist international festgelegt, dass die Wiederfindungsrate der transfundierten Erythrozyten 24h nach der Transfusion im Kreislauf eines Patienten ohne gesteigerten Umsatz oder Verlust mindestens 75% betragen muß (1). Obwohl dieser Grenzwert erst ab einer Lagerungsdauer von über 42 Tagen überschritten wird, gilt als allgemeine Empfehlung, die mittels CPD/SAGM konservierten Konzentrate aufgrund eines Anstieges von extrazellulärem

Hämoglobin nur bis zu einer Lagerungsdauer von 35 Tagen für den klinischen Einsatz zu verwenden (1). Alle der bislang geforderten Qualitätskriterien wurden bei dem in der Studie gewählten Konservierungsverfahren erfüllt, die Konserven bei vorschriftsmäßiger Temperatur gelagert, und die Kühlkette bis zur endgültigen Probenentnahme aus den Konzentraten nicht unterbrochen.

Als Folge der Lagerung von Erythrozyten ausserhalb des Organismus kommt es jedoch auch unter optimalen Konservierungsbedingungen zu komplexen Veränderungen, die in ihrer Gesamtheit als Lagerungsschaden bezeichnet werden. Diese Veränderungen geben sich vor allem durch veränderte Zellmorphologie (z.B. Auftreten von Kugelzellen und Stechapfelformen), funktionelle Beeinträchtigungen (z.B. Abnahme des 2,3-Diphosphoglycerat-Gehaltes mit Linksverschiebung der Sauerstoffdissoziationskurve) und der Freisetzung von intrazellulären Stoffen (z.B. Kalium, Laktatdehydrogenase, Hämoglobin) zu erkennen. Eine Akkumulation biologisch aktiver Lipide im zellfreien Überstand der Erythrozytenkonzentrate als Folge des Lagerungschadens wurde bislang nur eine geringfügige Bedeutung beigemessen. Daher wird diese Problematik in den derzeit bestehenden Qualitätskriterien nicht berücksichtigt.

Silliman *et al.* konnte 1992 erstmals nachweisen, dass im zellfreien Überstand von Erythrozytenkonzentraten, Vollblut, sowie Thrombozytenkonzentraten in Abhängigkeit der Lagerungsdauer Lipide akkumulieren, die die Aktivität der NADPH-Oxidase humaner neutrophiler Granulozyten zu steigern vermögen (150). Diese Wirkung konnte durch Zugabe von WEB 2170, einem spezifischen PAF-Inhibitor antagonisiert werden und es wurde daher gefolgert, dass die primenden Lipide strukturelle Ähnlichkeit mit dem Plättchen-aktivierenden-Faktor (PAF) besitzen müssen. In nachfolgenden Arbeiten wurden Lyso-Phosphatidylcholine (Lyso-PCs), insbesondere C_{16}Lyso-PAF und Palmitoyl-Lyso-PCs als wesentliche Substanzen mit primender Aktivität aus den Lipidextrakten des zellfreien Überstandes 42 Tage alter Erythrozytenkonzentrate isoliert (147,148). Nach Inkubation humaner neutrophiler Granulozyten mit den genannten Agentien erfolgt ein 2,5 –3,7-facher Anstieg der fMLP-induzierten Superoxid-Anionen Produktion (147). Im Modell der isoliert perfundierten Rattenlunge wurden darüber hinaus die pathophysiologischen Konsequenzen der Untersuchungsergebnisse in Bezug auf die Entwicklung eines akuten Lugenschadens charakterisiert (151). In diesen Untersuchungen wurde gezeigt, dass der zellfreie Überstand 42 Tage alter Erythrozytenkonzentrate sowie gereinigte Lysophosphatidylcholine per se zur Entwicklung eines akuten Lungenschadens führen. Die isoliert perfundierten Lungen wurden Spendertieren entnommen, die bereits

durch intraperitoneale Endotoxininjektion inflammatorisch stimuliert waren. Als wesentliche pathophysiologische Veränderungen konnten die Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie, die Zunahme des Lungenfeuchtgewichtes als Mass der interstitiellen Ödementwicklung, sowie histopathologische Veränderungen (Sequestrierung neutrophiler Granulozyten, Bildung hyaliner Membranen, Verbreiterung der Alveolarsepten) nachgewiesen werden. Der zellfreie Überstand frischer Konzentrate bewirkte dagegen keine wesentlichen pathologischen Veränderungen. Durch Zugabe eines PAF-Antagonisten zum Perfusat konnten der Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes zu 94%, die Zunahme des Lungenfeuchtgewichtes und damit konsekutiv die Entwicklung des interstitiellen Lungenödems zu 55% inhibiert werden (151).

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konzentrierten sich nicht auf Lyso-Phosphatidylcholine sondern auf freie, insbesondere mehrfach ungesättigte Fettsäuren als mögliche proinflammatorische Mediatoren. Mehrfach ungesättigte freie Fettsäuren finden sich physiologisch in geregelten Konzentrationen im Plasma sowie in veresterter Form als strukturelle Zellmembranbestandteile. Eine mögliche Verbindung hinsichtlich der Phosphatidylcholine bzw. Lyso-Phosphatidylcholine ergibt sich aus deren chemischer Struktur. Phosphatidylcholine (Lecithine) sind esterartig aufgebaute Verbindungen aus Glycerin, Phosphorsäure und Cholin sowie 2 Fettsäuremolekülen: meist ein Molekül einer gesättigten und ein Molekül einer ungesättigten Fettsäure. Als ungesättigte Fettsäuren können Arachidonsäure bzw. Linolsäure verestert sein. Bei partieller Abspaltung einer Fettsäure entstehen als Produkte Lyso-Phosphatidylcholine (Lysolecithin) sowie freie, ungesättigte Fettsäuren.

Untersuchungen bezüglich der Konzentration freier Fettsäuren im zellfreien Überstand von Erythrozytenkonzentraten sind in der derzeitigen Literatur nicht vorhanden, bislang wurde lediglich die Zusammensetzung der Membranlipide gelagerter Erythrozyten in Abhängigkeit der Konservierungszeit untersucht (50). Llanillo *et al*. (101) konnten durch die gaschromatische Analyse der Membranlipide konservierter Schafserythrozyten zeigen, dass nach 6-tägiger Konservierungszeit in der Phospholipidfraktion Sphingomyelin und Phosphatidsäure sinifikant ansteigen, Phosphatidylethanolamin dagegen absinkt. In der Fraktion der mehrfach ungesättigten Fettsäuren war die Konzentration von Arachidonsäure (20:4) sowie Docosahexaensäure (22:6) signifikant reduziert, der Quotient aus ungesättigten Fettsäuren und gesättigten Fettsäuren nahm tendenziell im Verlauf der Konservierung ab. Spektrofluorometrisch wurde als mögliche Urache der Lipidmodifikation eine zunehmende Peroxidation der Membranlipide nachgewiesen.

Mit Hinblick auf die in der vorliegenden Arbeit erzielten Resultate ergeben sich hieraus entscheidende Parallelen und Ergänzungen: Während Arachidonsäure und Docosahexaensäure in der Fraktion der ungesättigten Membranlipide absinkt, konnte ein singnifikanter Anstieg dieser Fettsäuren im zellfreien Überstand der Erythrozytenkonzentrate in Abhängigkeit der Lagerungsdauer nachgewiesen werden. Der Quotient aus gesättigten und ungesättigten freien Fettsäuren stieg nach 35-tägiger Lagerungszeit im zellfreien Überstand an, wohingegen die Veränderung des Quotienten in den Membranlipiden innerhalb einer 6-tägigen Konservierungszeit eine gegenteilige Tendenz aufweist. Während folglich in den Membranlipiden verhältnismäßig mehr ungesättigte Fettsäuren im Vergleich zu gesättigten abnehmen, steigt die Konzentration der ungesättigten Fettsäuren im Vergleich zu gesättigten Fettsäuren im zellfreien Überstand verhältnismäßig stärker an. Aufgrund dieses Zusammenhanges könnte gefolgert werden, dass die Akkumulation freier Arachidonsäure im zellfreien Überstand in direktem Zusammenhang mit der Modifikation der Membranlipide steht. Im Vordergrund möglicher Mechanismen könnte die nachgewiesene Lipidperoxidation stehen, die zu einer gesteigerten Affinität der Phospholipide zu Phospholipasen und damit konsekutiv zur hydrolytischen Abspaltung freier Arachidonsäure führen kann (100,145,146). Dieser Mechanismus liefert jedoch keine Erklärung, weshalb, wie in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen, neben Arachidonsäure und Docosahexaensäure auch andere gesättigte und ungesättigte Fettsäuren extrazellulär akkumulieren, obwohl sich die Konzentration in den Membranlipiden gemäß den Untersuchungen von Llanillo *et at*. nicht ändert. Diese Diskrepanz könnte einerseits auf die unterschiedlichen Konservierungszeiten in beiden Studien zurückgeführt werden, andererseits untersuchten Llanillo *et al*. die Lipidveränderungen in funktionsfähigen Erythrozyten, d.h. in roten Blutkörperchen deren Zellmembran zwar durch peroxidative Prozesse alteriert, jedoch in ihrer Gesamtheit noch intakt war. Nicht berücksichtigt dagegen werden Veränderungen in bereits zytolytisch veränderten Zellen bzw. deren Membranfragmenten. Möglicherweise entsteht ein großer Anteil der akkumulierten freien Fettsäuren durch enzymatische Abspaltung der Fettsäuren aus Membranfragmenten, die im Rahmen zytolytischer Prozesse in Abhängigkeit der Lagerungsdauer entstehen.

Im Folgenden muss diskutiert werden, ob sich aus der Akkumulation der freien, insbesondere mehrfach ungesättigten Fettsäuren im zellfreien Überstand alter Erythroyztenkonzentrate potentielle Wirkungen auf den Organismus im Rahmen einer

Transfusion ergeben könnten und welche Mechanismen in diesem Zusammenhang von pathopysiologischer Bedeutung sind.

1.2 Wirkung mehrfach ungesättigter freier Fettsäuren

Die biologische Wirksamkeit freier Fettsäuren wird entscheidend durch die Länge ihrer Kohlenstoffkette sowie - noch wesentlicher - durch die Anzahl der enthaltenen Doppelbindungen und damit dem Sättigungsgrad determiniert (163). Gesättigte freie Fettsäuren besitzen einen vorwiegend nutritiven Charakter und nur eine geringe chemische Reaktivität. Es konnten bislang keine wesentlichen pro- oder antinflammatorischen und damit immunomodulatorische Wirkungen durch freie gesättigte Fettsäuren mit einer Kettenlänge zwischen 14 und 18 Kohlenstoffatomen nachgewiesen werden. Wird diese Tatsache in Betracht gezogen, erscheint es unwahrscheinlich, dass die in der vorliegenden Arbeit quantifizierten gesättigten Fettsäuren Palmitinsäure bzw. Stearinsäure im Rahmen einer Transfusion immunmodulierende Wirkungen besitzen, obwohl die Konzentrationen dieser Fettsäuren in Abhängigkeit der Lagerungsdauer in den Erythrozytenkonzentraten signifikant ansteigt. Ferner ist ein direkter Vergleich mit der physiologischen Konzentration der Fettsäuren im Plasma essentiell. Gesättigte, wie auch ungesättigte Festtäuren sind in geregelter Konzentration physiologischer Bestandteil des Blutplasmas. Wird von einer immunmodulatorischen Wirkung ausgegangen, müsste vorausgesetzt werden, dass sich zunächst durch exogene Zufuhr (z.B. Transfusion alter Erythrozytenkonzentrate) oder endogene Lipidfreisetzung, diese physiologischen Konzentrationen verändern. Der Vergleich zwischen den Konzentrationen von Palmitin- und Stearinsäure in alten Erythrozytenkonzentraten und im Plasma gesunder humaner Probanden, konnte eindeutig nachweisen, dass die physiologische Plasmakonzentration dieser Fettsäuren ca. 2-fach höher liegt als die Konzentration in alten Erythrozytenkonzentraten. Dieser Zusammenhang lässt erwarten, dass durch die Transfusion alter Erythrozytenkonzentrate keine wesentlichen Veränderungen der Plasmakonzentrationen gesättigter Fettsäuren hervorgerufen werden.

Grundsätzlich anders muss in diesem Zusammenhang jedoch die Bedeutung mehrfach-ungesättigte Fettsäuren (PUFAs) diskutiert werden. Es ist bekannt, dass PUFAs neben ihrer nutritiven Funktion und ihrer Rolle als struktureller Bestandteil der Membranlipide, wesentliche pro- und antiinflammatorische Wirkungen besitzen (163). Diese biologische Aktivität zeigt eine Konzentrationsabhängigkeit und ist wesentlich von der chemischen

Struktur der Fettsäure abhängig. Während allgemein angenommen wird, das ω-6 PUFAs proinflammatorische Wirkung zeigen, konnte nachgewiesen werden, dass ω-3 PUFAs in einem gewissen Konzentrationsbereich antinflammatorische Wirkungen aufweisen.

Vor der näheren Betrachtung der hierfür verantwortlichen Mechanismen sowie der resultierenden biologischen Konsequenzen, muss wiederum geprüft werden, in wie weit von einer Relevanz der Fettsäurekonzentrationen in Erythrozytenkonzentraten mit Hinblick auf potentielle Konzentrationsänderungen im Organismus im Rahmen einer Transfusion ausgegangen werden kann. Zwar konnte nachgewiesen werden, dass abgesehen von α-Linolensäure, γ-Linolensäure und Eicosapentaensäure alle quantifizierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den Erythrozytenkonzentraten in Abhängigkeit der Konservierungszeit signifikant ansteigen, der Vergleich der Konzentration mit den Fettsäurekonzentrationen im humanen Plasma relativiert die Bedeutung dieses Anstiegs jedoch stark. Nahezu alle Konzentrationen der gemessenen mehrfach ungesättigten Fettsäuren liegen unter den physiologischen Plasmakonzentrationen. Eine entscheidende und möglicherweise um so gravierendere Ausnahme bildet die potenteste proinflammatorische ω-6 Fettsäure Arachidonsäure. Die Konzentration der Arachidonsäure zeigt nicht nur im Vergleich zu allen übrigen Fettsäuren in Abhängigkeit der Konservierungszeit den stärksten Anstieg, auch die absolute Konzentration in alten Erythrozytenkonzentraten übersteigt die Konzentration in humanem Plasma signifikant um den Faktor 3,2. Mögliche Konsequenzen dieses Resultates und die zugrundeliegenden Mechanismen werden deshalb im nächsten Abschnitt erörtert.

1.3 Arachidonsäure als proinflammatorischer Mediator

Die proinflammatorische Wirkung der Arachidonsäure lässt sich auf zwei grundlegend unterschiedliche Mechanismen zurückführen. Einerseits stellt Arachidonsäure den entscheidenden Precursor des Eicosanoidstoffwechsels dar und trägt damit erheblich durch die Metabolisierung zu Prostaglandinen und Leukotrienen an der Produktion inflammatorischer Mediatoren bei (78), andererseits konnte gezeigt werden, dass Arachidonsäure selbst als effektiver intrazellulärer Botenstoff Zellsignaltransduktionswege zu moduliern vermag und damit Einfluß auf die Stimulus-Antwort-Reaktion insbesondere der neutrophilen Granulzyten nimmt (3,23,81,143).

In Abhängigkeit hydrolytischer Enzyme (Phospholipase A2, Phospholipase D, Phospholipase C) und damit verbundener Abspaltung freier Arachidonsäure aus den

Phospholipiden der Zellmembran sowie in Abhängigkeit des direkten transmembranären Fettsäuretransportes (81) (58)liegt Arachidonsäure intrazellulär als Ausgangsprodukt des Eicosanoidstoffwechsels vor. Durch oxidative Metabolisierung katalysiert von Zyklooxigenase bzw. Lipoxygenase entstehen unter anderem die proinflammatorischen Mediatoren Leukotrien B_4 (LTB_4), Leukotrien C_4 (LTC_4) sowie Thromboxan A_2 (TXA_2). LTB_4 bzw. LTC_4 besitzen starke chemotaktische Eigenschaften und bewirken die Aktivierung neutrophiler Granulozyten mit konsekutiv gesteigerter Leukozyten-Endothel-Interaktion, Degranulation und Bildung von freien Sauerstoffradikalen (9,78,79). Insbesondere die Freisetzung von LTC_4 führt zur Konstriktion glatter Muskulatur, sowie zur Permeabilitätssteigerung des vaskulären Endothels. Als wesentlichste Wirkungen des Thromboxans A_2 sind die Thrombozytenaktivierung und damit verbunden aggregationsfördernde Wirkungen sowie vasokonstriktorische Effekte zu nennen.

Besondere Bedeutung wird diesen Stoffwechselwegen im Rahmen einer systemischen Inflammation zu teil. Renzi *et al*. konnte nachweisen, dass Lipopolysacharid schon in sehr geringen Konzentrationen (0,01 ng/ml) zu einem gesteigerten Arachidonsäuremetabolismus in mikrovaskulären Endothelzellen führt. Bei zusätzlicher Inkubation der Zellen mit Arachidonsäure konnte eine weitere Konzentrationszunahme der produzierten Prostaglandine nachgewiesen werden (137). Im Modell der isoliert perfundierten Lunge wurde in Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen gezeigt, dass sowohl die Zugabe von Endotoxin als auch erhöhte Arachidonsäurekonzentrationen im Perfusat (30 nM) mit gesteigerter Prostaglandinsynthese assoziiert sind (160). Als kausaler Mechanismus konnte die endotoxin-induzierte Expression der Zyklooxigenase-2 (COX-2) in Endothelzellen der pulmonalen Mikrozirkulation nachgewiesen werden (44,46). Neben der Enzymaktivität konstitutiver Endoperoxidasen ist die Eicosanoidproduktion folglich abhängig von der Expression induzierbarer Enzyme (COX-2) aber auch von der intrazellulären Konzentration freier Arachidonsäure, die wiederum Abhängigkeit von der exogenen Zufuhr zeigt.

Als intrazellulärer „second messenger“ kann Arachidonsäure unabhängig von der Metabolisierung zu Prostagalandinen und Leukotrienen durch Interaktion mit Proteinkinase C (23,81) (142)oder GTP-bindenden Proteinen (3) intrazelluläre Signaltransduktionswege aktivieren.

Eine Vielzahl von intrazellulären Mechanismen werden im Rahmen einer Stimulus-Antwort-Reaktion durch die Serin/Threonin-Phosphorylase Proteinkinase C moduliert: Es ist bekannt, dass die Transkription der mRNA der inflamatorischen Zytokine IL-1 und

TNF-α unter anderem durch Proteinkinase C reguliert wird (83,141). Mit Hilfe selektiver Proteinkinase C-Inhibitoren konnten Huwiler *et al*. zeigen, daß die Prostaglandin- und Leukotrien-Produktion in Zymosan-stimulierten Makrophagen in Abhängigkeit von der Aktivität der Proteinkinase C zeigt (80). Durch Phosphorylierung der Untereinheiten $p47^{phox}$ und $p67^{phox}$ der NADPH-Oxidase bewirkt Proteinkinase C die Translokation der zytosolischen Enzymuntereinheiten zur Zellmembran und initiiert damit die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen durch die aktivierte NADPH-Oxidase (13,143). Sellmayer *et al*. konnten nachweisen, dass auch Arachachidonsäure per se, Proteinkinase C unabhängig, bis zu einem gewissen Grad die Aktivität der NADPH-Oxidase zu steigern vermag (143). Dieser Mechanismus liefert eine plausible Erklärung für die Ergebnisse zahlreicher Untersuchungen, die eine Steigerung bzw. Aktivierung des Respiratory Burst von neutrophilen Granulozyten durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren, insbesondere Arachidonsäure, zeigen (6,129,158,159).

In Übereinstimmung mit diesen Resultaten konnte auch in der vorliegenden Arbeit eine Aktivierung des Respiratory Burst humaner Granulozyten durch Inkubation mit Arachidonsäure in durchflußzytometrischen Untersuchungen nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass Arachidonsäurekonzentrationen, die annähernd auch in alten Erythrozytenkonzentraten (3µg/ml = 9,88µM) gemessen wurden, nach 30 minütiger Inkubationszeit zu einem signifikanten Anstieg der Hydrogenperoxid-Produktion führen. Diese Wirkung ist sowohl Zeit- als auch Konzentrationsabhängig. Nach einer Inkubationszeit von nur 15 Minuten konnte lediglich ein tendenzieller Anstieg beobachtet werden, die Inkubation mit der 10-fachen Arachidonsäurekonzentration (30µg/ml = 98,8 µM) dagegen führt bereits zu diesem Zeitpunkt zu einer weiteren signifikanten Steigerung der Produktion reaktiver Sauerstoffradikale. Bates *et al*. konnten entsprechend zeigen, dass die Inkubation von neutrophilen Granulozyten mit Arachidonsäure in einer Konzentration von 10µM die Zelladhäsion steigert (10) und in einer Konzentration von 20µM den durch neutrophile Granulozyten mediierten Endothelschaden *in vitro* signifikant aggraviert (11).

Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass die proinflammatorische ω-6 Fettsäure Arachidonsäure in Abhängigkeit von der Konservierungszeit in Erythrozytenkonzentraten akkummuliert und die gemessenen Konzentrationen ausreichend sind, um *in vitro* entscheidende Funktionen der Granulozyten im Sinne einer Stimulus-Antwort-Reaktion zu aktivieren. Hierbei handelt es sich um Wirkungen, die über einen Primingeffekt hinausreichen, da bereits ohne sekundären Stimulus *in vitro* eine Zellaktivierung durch Inkubation der Granulozyten mit Arachidonsäure erfolgt. Jedoch verbietet sich die

zwangsläufige Übertragung dieser in *vitro* gewonnenen Ergebnisse auf die Situation *in vivo*. Komplexe Interaktionsmechanismen zwischen Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen in der mikrovaskulären Strombahn und den zusätzlich wirkenden pro- und antiinflammatorischen Regulationsmechanismen bedürfen einer detaillierten Untersuchung in einem aussagekräftigen in *vivo Modell*, um potentielle Wirkungen der Arachidonsäure auf mögliche Organkomplikation, insbesondere den akuten Lungenschaden zu identifizieren.

2. Untersuchung der Arachidonsäurewirkung in vivo

In der vorliegenden Arbeit wurde in den Studien II und III erstmals in vivo die Wirkung freier Arachidonsäure auf die Entwicklung eines akuten Lungenschadens mit besondere Fokussierung auf Veränderungen der pulmonalen Mikrohämodynamik sowie Leukozyten-Endothel Interaktion untersucht. Hierbei wurde zwischen möglichen Effekten der Arachidonsäure per se (Studie II), sowie den Wirkungen während zusätzlicher systemischer Inflammation, d.h. während Endotoxinämie (Studie III), unterschieden. Die erzielten Resultate müssen in Hinblick auf das experimentelle Modell sowie die möglichen zugrundeliegende Mechanismen diskutiert werden.

2.1 Experimentelles Modell

Während der unmittelbaren Initialphase des akuten Lugenschadens im Rahmen einer Endotoxinämie stehen pathophysiologisch primär vor allem Veränderungen der pulmonalen Mikrozirkulation und Leukozyten-Endothelzellinteraktion im Vordergrund, die mittels Intravitalmikroskopie sowohl analysiert als auch quantifiziert werden können.

2.1.1 Intravitalmikroskopie der Lungenmikrozirkulation

Erste intravitalmikroskopische Untersuchungen der Lungenmikrostrombahn finden sind nicht etwa erst in der Literatur des 20. Jahrhunderts, sondern gehen bis in das Jahr 1661 zurück: Marcello Malpighi, italienischer Naturforscher und Anatom, sowie Professor für theoretische und praktische Medizin in Bologna, Pisa und Messina, Leibarzt von Papst Innozenz XII., untersuchte damals mit einem der ersten Mikroskope und einer Kerze als Lichtquelle das Mikrozirkulationsbett der Froschlunge. Er entdeckte das kapillare Netzwerk als Verbindungsglied zwischen den zuführenden und abführenden Gefäßen (103).

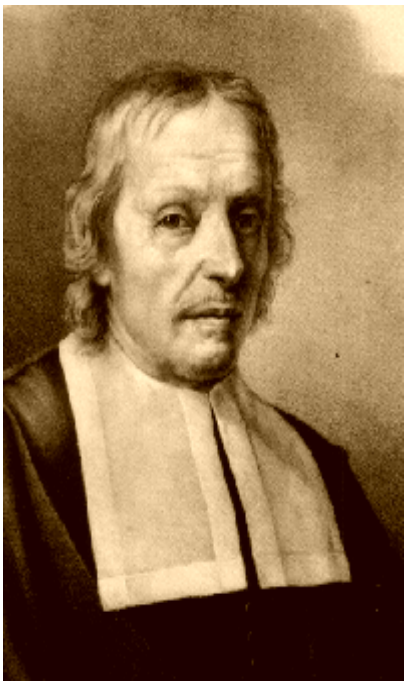

Abb 42: Marcello Malpighi (1628-1694) italienischer Naturforscher und Pionier der pulmonalen Intravitalmikroskopie.

Die ersten Untersuchungen am geschlossenen Thorax wurden erst rund 270 Jahre später durch Wearn *et al*. 1934 durchgeführt, der die Lunge durch die geschlossene Pleura parietalis mikroskopierte (178).

Das erste Thoraxfenster wurde 1939 von Terry bei einer Katze implantiert (167) eine exakte Quantifizierung mikrohämodynamischer Parameter in der pulmonalen Mikrozirkulation ermöglichte jedoch erst das 1965 von Wagner und Filley (175) entwickelte Thoraxfenster am Hund.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Modell der Intravitalmikroskopie am geschlossenen Thorax beatmeter Kaninchen wurde von Kuhnle *et al*. 1993 (93) im Institut für Chirurgische Forschung der LMU München etabliert und stellt eine Weiterentwicklung des 1988 von Goetz *et al*. und Berger *et al*. (17) entwickelten intrathorakalen Fensters an Sprague-Dawley Ratten dar. In den Untersuchungen an der Ratte konnte sowohl in vivo als auch in histologischen Untersuchungen die gute Gewebeverträglichkeit der auch in diesem Modell verwendeten Teflonmembran nachgewiesen werden. Die Untersuchungen an der Rattenlunge wurden jedoch häufig durch Luftpolster, die sich bei längerer Versuchsdauer zwischen Lungenoberfläche und Teflonmembran bildeten, limitiert. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete starre Metallfenster saugt dagegen über integrierte Bohrlöcher intrathorakale Luftpolster ab, fixiert zugleich die Lungenoberfläche an der Membran und minimiert hierdurch kardiorespiratorische Bewegungsartefakte. Damit werden Untersuchungen über einen Zeitraum von mehreren Stunden ermöglicht. Die Traumatisierung der Lungenoberfläche durch den Unterdruck bleibt dabei streng auf die Punkte der Bohrlöcher begrenzt, die jeweils mindestens 1 cm vom Beobachtungsareal entfernt liegen. Eine Verfälschung der Messergebnisse aufgrund der lokalen Gewebetraumatisierung kann somit ausgeschlossen werden. Durch das in der Studie verwendete Thorax-Fenster mit einem Durchmesser von 3 cm wird außerdem das Beobachtungsareal im Vergleich zum Rattenmodell deutlich vergrößert. Das fest in die Thoraxwand mittels

Schraubmechanismus implantierte Fenster in Kombination mit der zirkulären Tabaksbeutelnaht verschließt den während der Präparationsphase eröffneten Pleuralraum luftdicht und ermöglicht somit Untersuchungen am geschlossenen Thorax.

Austrocknung und Auskühlung der mikroskopierten Lungenoberfläche und damit verbunden Einflüsse auf die untersuchten mikrozirkulatorischen Parameter wurden effektiv durch die kontinuierliche Superfusion des Fensters mit 37°C warmen Thyrodepuffer verhindert.

Im Gegensatz zum Rattenmodell gestattet das Modell am Kaninchen darüber hinaus ein ausführliches makrohämodynamisches Monitoring, insbesondere die Quantifizierung von pulmonalarteriellem Blutdruck und Herzzeitvolumen, die für die Interpretation der erhobenen mikrohämodynamischen Parameter von großer Bedeutung sind.

Die untersuchten subpleural gelegenen pulmonalen Arteriolen und Venolen (91,93) wurden von McLaughlin *et al*. (111) und Defouw *et al*. (34) als der pulmonalen Zirkulation zugehörig identifiziert.

Die mikroskopierten kapillaren Netzwerke an der Lungenoberfläche besitzen zwar im Vergleich zu zentralen Arealen eine geringere Kapillardichte und im Mittel größere Kapillardurchmesser, die mikrovaskulären Drucke in den subpleuralen Gefäßen unterscheiden sich jedoch nicht von denen in Gefäßen tiefer gelegener Lungenabschnitte. Es ist folglich davon auszugehen, dass Untersuchungen der Mikrohämodynamik in den oberflächlichen Mikrogefäßen auch für tiefer bzw. zentraler gelegene Gewebeareale repräsentativ sind. Hierbei gilt es jedoch den von West et al. beschriebenen vertikalen Perfusionsgradienten zu berücksichtigen (180): Am aufrecht stehenden Menschen ist die Durchblutung in apikalen Lungenabschnitten aufgrund hydrostatischer Druckgradienten geringer als in basalen Lungenarealen. Dieses Gradientenmodell gilt entsprechend auch in Linksseitenlage des Kaninchens. Hieraus resultiert, dass die Perfusion der oben gelagerten, mikroskopierten rechten Lungenoberfläche geringer ist als die der Gefäße der hypostatischen linken Lunge. Aufgrund der geringen Thoraxbreite des Kaninchens von 5-7 cm, und damit verbunden in Linkseitenlage geringe hydrostatische Druckdifferenzen kommt dem Gradientenmodell beim Kaninchen deutlich geringere Bedeutung zu als beim Menschen. Die Beatmung der Versuchtiere mit positivem Beatmungsdruck verstärkt allerdings den vertikalen Perfusionsgradienten und begünstigt eine Umverteilung der Lungenperfusion zugunsten hypostatischer Areale (93). Goetz *et al*. und Kuhnle *et al*. ordneten die untersuchten Gefäße an der apikalen Lungenoberfläche des Kaninchens in

Linksseitenlage mit Hilfe der Mikrossphärentechnik der Zone 2 des Drei-Zonen Modells nach West zu (60,93).

Gemäß Benumhof und Alfery (14) konnten auch Kuhnle *et al*. für das verwendete Modell mittels radioaktiv markierter Mikrosphären nachweisen, dass weder die Eröffnung des Thorax noch die Implantation des Thoraxfensters Änderungen der lokalen Perfusion im Mikroskopierareal bewirken (93).

Allein die für die Implantation des Thoraxfensters notwendige chirurgische Präparation könnte jedoch insbesondere die ebenfalls untersuchte Leukozyten/-Endothelzell-Interaktion im Rahmen einer systemischen Stimulation verstärken (51). Mit Hilfe des Myeloperoxidaseassays konnte Kübler nachweisen, dass die chirurgischen Präparation in dem hier verwendeten Modell weder im mikroskopierten Areal, noch in der Gesamtlunge zu einer verstärkten Akkumulation von neutrophielen Granulozyten führt (88). Darüber hinaus kann jedoch die mechanische Beatmung mit positivem Druck zu einer verstärkten Sequestrierung der Leukozyten in der pulmonalen Strombahn führen (21). Ursächlich hierfür ist laut Markos et al. (105) die zusätzliche Kompression der Alveolarkapillaren und die damit verbundene Zunahme des Missverhältnisses zwischen Kapillarlumen und Leukozytendurchmesser. Auch Hyperoxie kann zu einer verstärkten Leukozytensequestrierung und Hochregulation endothelialer Adhäsionsmoleküle führen, wie Untersuchungen von Griffin *et al*. (62) oder Crapo *et al*. (33) zeigen konnten.

Sowohl Überdruckbeatmung als auch die den Versuchstieren applizierte inspiratorische Sauerstoffraktion von 0,4 bewirkt jedoch in dem verwendeten Modell keine zusätzliche quantitativ bedeutsame pulmonale Sequestrierung von Leukozyten, wie der Vergleich der Myeloperoxidaseaktivität im Lungengwebe von beatmeten Versuchstieren im Vergleich zu einer spontan atmenden Kontrollgruppe zeigte (86).

Aufgrund des bereits erwähnten Perfusionsgradienten nach West (180) findet sich in den apikalen Lungenabschnitten eine geringere Perfusion bei langsamerer Erythrozytenfließgeschwindigkeit und reduzierten Scherkräften, die die Retention der Leukozyten begünstigt. Konsekutiv folgt hieraus, wie Untersuchungen von Kübler *et al*. (87), Doerschuk *et al.* (36) und Martin *et. al* (106) zeigen konnten, dass in Linksseitenlage die mikroskopierten apikalen Lungenareale, wenn auch nicht signifikant, dennoch tendenziell höhere Granulozytenkonzentrationen im Vergleich zur Gesamtlunge aufweisen. Die intravitalmikroskopisch an der Lungenoberfläche quantifizierten Leukozytenzahlen liegen deshalb folglich geringfügig höher, als die Leukozyenkonzentrationen in zentralen und basalen Lungenarealen.

2.1.2 Einfluss von Anästhesie und Analgesie

In den durchgeführten Versuchstudien wurde jeweils die Kombination eines synthetischen Opioids (Piritramid) mit dem intravenösen Anästhetikum α-Chloralose eingesetzt. Die zu Versuchsbeginn verabreichten Pharmaka gewährleisteten während des Versuchverlaufs eine ausreichende Analgesie und Anästhesie. Während des gesamten Versuchzeitraums kam zu keinen nennenswerten Anstiegen der Herzfrequenz oder des systemischen Blutdruckes, die auf eine unzureichende Narkosetiefe hingewiesen hätten.

Im Gegensatz zu zahlreichen anderen Narkotika (14,66) zeigt insbesondere α-Chloralose nur geringe Auswirkungen sowohl auf systemische als auch auf die pulmonale Zirkulation (162). Auch inhibitorische Effekte der α-Chloralose bzw. fördernde Effekte synthethischer Opioide auf die Akkumulation neutrophiler Granulozyten werden in der Literatur zwar kontrovers diskutiert, können jedoch in diesem Modell als irrelevant betrachtet werden: Mittels Myeloperoxidase-Assay konnte nachgewiesen werden dass die pulmonale Leukozytenakkumulation bei Anästhesie mit α-Chloralose und Piritramid nicht von den Werten bei Narkose mit Ketamin und Rompun, differiert.

Allgemein kann also davon ausgegangen werden, dass der Einfluss der hier verwendeten Anästhesie auf quantifizierten Parameter der Mikrozirkulation vernachlässigbar ist.

2.1.3 Doppelmarkierung autologer Blutzellen mit Fluorochromen

Erst durch die *ex-vivo* FITC-Markierung autologer Erythrozyten mit anschließender Reinjektion wird die quantitative Analyse mikrohämodynamischer Parameter möglich. Die *ex-vivo* Markierung wurde nach dem von Zimmerhackel etablierten (186) und von und Berger (16) modifizierten Verfahren durchgeführt. *In vitro* Untersuchungen konnten zeigen, dass die Fluoreszenzmarkierung die Verformbarkeit und damit die rheologischen Eigenschaften eines Teils der markierten Erythrozyten ändert (16). Die alterierten Zellen werden jedoch rasch nach der Reinjektion in der Milz abgebaut. Nach der in jedem Versuch eingehaltenen 30 minütigen. Rezirkulationsphase und damit verbundener Elimination nahezu aller alterierter Erythrozyten, bleibt die Rezirkulationsquote der markierten Zellen über mehrere Stunden annähernd konstant. Die Halbwertszeit der in der Zirkulation verbleibenden markierten Erythroyten beträgt etwa 20 Tage und unterscheidet sich damit nicht von nativen Erythroyzten (165).

Die durchgeführte *in vivo* Fluoreszenzmarkierung der Leukozyten mit dem Farbstoff Rhodamin 6G wird in zahlreichen Untersuchungen der Gehirn-, Leber-, Pankreas- oder Darmmikrozirkulation eingesetzt. Auch in vorangegangenen Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe hat sich der Einsatz von Rhodamin 6G zur Fluoreszenzmarkierung der Leukozyten bewährt (86,88,89,92,94). Aufgrund selektiver Akkumulation des Farbstoffes in den Mitochondrien (5) werden zwar alle Subpopulationen der Leukozyten markiert, Erythrozyten verbleiben dagegen aufgrund nicht vorhandener Mitochondrien ungefärbt. Die spezifische Anreicherung beruht entweder auf der negativen Ladung der mitochondrialen Matrix (29) oder auf der Bildung unlöslicher Salze zwischen dem kationischen Farbstoff einerseits und negativ geladenen Cardiolipinmolekülen der inneren Mitochondrienmembran andererseits (132). Die verwendete Dosis von 0,3ml/kg KG einer 0,2 mM Rhodamin-6G-Lösung bewirkt, wie durchflusszytometrische Untersuchungen von Kübler (86) zeigen konnten, 60 Minuten nach i.v. Injektion eine Fluoresenzmarkierung von 99,6 % aller Granulozyten. Eine Verfälschung der Messergebnisse aufgrund eines veränderten prozentualen Anteils fluoreszenzmarkierter Leukozyten kann folglich ausgeschlossen werden.

Rhodamin-6G besitzt bei intravenöser Injektion keine systemischen Kreislaufwirkungen (82,88). Erst bei einer 100fach höheren als der hier verwendeten Farbstoffkonzentration kann die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien inhibiert werden (56).

Die Markierung von Erythrozyten und Leukozyten mit den unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen FITC bzw. Rhodamin 6G in Kombination mit den unter I-2.6 beschriebenen Filterblöcken ermöglicht eine sichere Differenzierung zwischen Erythrozyten und Leukozyten und die simultane Quantifizierung von Mikrohämodynamik und Leukozytenadhärenz in identischen Mikrogefäßen. Darüber hinaus bieten die verwendeten Flurochrome gegenüber anderen Farbstoffkombinationen entscheidende Vorteile: Acridinrot und Acridinorange führen zu starken Hintergrundfluoreszenzen und hemmen konzentrationsabhängig die CD-18 vermittelte Adhärenz der Granulozyten. Unter pathophysiologischen Bedingungen wird außerdem die Produktion von Superoxidanionen durch Acridin inhibiert. Aufgrund ähnlicher Emissionsspektren wären mit Acridin markierte Leukozyten darüber hinaus nur schlecht von den FITC-markierten Erythrozyten zu differenzieren. Der Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceindiacetat effluiert aufgrund seiner physikochemischen Eigenschaften äußerst schnell aus der Zelle und ist deshalb für intravitalmikroskopische Untersuchungen ungeeignet.

Die Kombination aus FITC und Rhodamin stellt damit unter den derzeitig verfügbaren, *in vivo* einsetzbaren Flurochromen die geeignetste Kombination zur differenzierten fluoreszenzmikroskopischen Visualisierung von Erythroyzten und Leukozyten dar.

2.1.4 Phototoxizität

Lange und intensive Lichtexposition von Gewebe in Kombination mit der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, kann aufgrund photodynamischer und phototoxischer Effekte sowohl zu intrazellulären Schäden (15) als auch zu intravasaler Thrombenbildung führen. Gawloski berichtet über eine verstärkte Leukozytenadhärenz am venolären Endothel der Hamsterbackentasche nach Epi-Illumination in Kombination mit der Verwendung von FITC-Dextran als Plasmamarker. Lehr *et. al*. (98) konnten dagegen keine Auswirkung der Fluoreszenzmikroskopie auf die Leukozyten-Endothelzellinteraktion im Rückenkammermodell der Maus nach Applikation von FITC nachweisen. Auch Steinbauer *et al*. (157) konnten keine phototoxischen Wirkung nach Applikation von Rhodamin 6G oder FITC bei Lichtdosen von 1333,5-2099,4 J/cm^2 an der Rückenhautkammer der Hamsters beobachten. Der in der vorliegenden Arbeit beschriebene experimentelle Aufbau bietet durch die Verwendung einer Silikon-intensivierten (SIT) Kamera optimale Voraussetzungen für äußerst geringe phototoxische Effekte, da zur Darstellung der fluorezenz-markierten Zellen auf Beleuchtungsintensitäten > 2500 J/cm^2 verzichtet werden kann. Darüber hinaus liegt einerseits die applizierte Rhodamin 6G Dosis bei nur rund 1/10 der von Baatz *et al*. (5) für die Spezies Ratte, Maus und Hamster empfohlenen Menge, anderseits wurde das Lungengewebe stets nur während der kurzen Mikroskopierphasen dem Auflicht exponiert. Auch die von Kübler für das Modell nachgewiesene Konstanz sämtlicher intravitalmikroskopisch erhobenen Parameter über eine Zeitraum von 60 min belegt (86), dass die auftretenden phototoxischen Effekte als vernachlässigbar gering einzuschätzen sind.

2.1.5 Quantifizierung der Mikrohämodynamik

Eine umfassende Analyse und Quantifizierung der Mikrohämodynamik in pulmonalen Arteriolen und Venolen gelang Goetz (60), Berger (17), und Kuhnle et al. (93) unter Verwendung der mikrozirkulatorischen Parameter nach Sarelius und Duling bzw. Sarelius und McKinlay (140).

Mit Hilfe des Bildverarbeitungssystems Optimas und einer eigens programmierten Software gelang es Kübler erstmals auch in den Alveolokapillaren Parameter der

Mikrohämodynamik unter physiologischen Bedingungen zu quantifizieren (86). Die selbe Methodik bewährte sich darüber hinaus auch bei intravitalmikroskopischen Untersuchungen unter pathophysiologischen Verhältnissen (82,94). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die Erythrozytenfließgeschwindigkeit nach der Methode von Sarelius (140) und Duling (42) bestimmt und anschließend unter Berücksichtigung des Verhältnisses zwischen Erythrozytenfließgeschwindigkeit und Blutfließgschwindigkeit sowohl Blutvolumenfluß als auch Wandscherrate nach Pries et al. (130) berechnet. Der funktionelle kapillare Perfusionsindex wurde nach Wagner und Latham (174) bestimmt und auf eine durchschnittliche Oberfläche der Einzelalveole von 10000 μm^2 bezogen.

2.1.6 Quantifizierung der Leukozytenkinetik

Analyse und Quantifizierung der Leukozyten-Endothelzellinteraktion beschränken sich in vielen Studien auf postkapillare Venolen (121,122), in denen vor allem in der Mikrostrombahn des großen Kreislaufs die Sequestrierung der Leukozyten erfolgt. Insbesondere in der pulmonalen Strombahn sequestrieren jedoch bereits unter physiologischen Bedingungen Leukozyten in Arteriolen, Kapillaren und Venolen. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Leukozytenkinetik in allen Abschnitten der pulmonalen Strombahn quantifiziert.

Gemäß dem auf der Adhäsionskaskade basierenden Stufenmodell nach Springer (156) können die Leukozyten in Arteriolen und Venolen 3 unterschiedlichen Klassen zugeordnet werden:

1. frei fließende Leukozyten
2. am Endothel rollende Leukozyten
3. endothel-adhärente Leukozyten

Während Kübler unter physiologischen Bedingungen sowohl Fließgeschwindigkeit als auch Flux der freifließenden Leukoyzyten und den prozentualen Anteil rollender Leukozyten bestimmte (88), wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich die Anzahl Endothel-adhärenter Leukozyten quantifiziert. Unter pathophysiologischen Bedingungen sinkt der Leukozytenflux in den untersuchten Gefäßen stark ab, so dass lange intravitalmikroskopische Aufnahmezeiten für eine repräsentative Auswertung des Rollens, Fluxes und Fließgeschwidigkeit notwendig wären. Eine hiermit verbundene Zunahme phototoxischer Effekte sowie möglicher Verzögerungen des Versuchsprotokolls waren nicht zu akzeptieren. Darüber hinaus ist vor allem die Anzahl Endothel-adhärenter Leukozyten pathophysiologisch bedeutsam, da erst Leukozytenadhärenz und damit

verbunden die Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren, Sauerstoffradikalen oder auch proteolytischen Enzymen zur lokalen Endothelzellschädigung führt.
Als Endothel-adhärente Leukozyten wurden alle Zellen definiert, die länger als 5s Dauer ihre Lokalisation am arteriolären bzw. venolären Endothel nicht änderten. Zwar werden an anderen Organsystemen für die Definition zumeist längere Adhärenzzeiten gewählt (12,49,109,121), aufgrund der respiratorischen Bewegungen ist jedoch die Beobachtungsdauer an der Lunge auf die 5s langen inspiratorischen Plateauphasen beschränkt. Längere Untersuchugszeiträume könnten zwar durch Prolongation der inspiratorischen Plateauphasen erreicht werden, würden jedoch aufgrund veränderter Ventilation und Perfusion zu Veränderungen der Mikrohämodynamik und Leukozytenadhärenz führen. Die Anzahl Endothel-adhärenter Leukozyten wurde jeweils auf die innere Gefäßwandoberfläche des untersuchten Segmentes bezogen, wodurch ein direkter Vergleich von Gefäßen unterschiedlicher Durchmesser und damit unterschiedlichen Kaliber möglich wird.
Entsprechend den Endothel-adhärenten Leukozyten in pulmonalen Arteriolen und Venolen, wurden diejenigen Leukozyten in Alveolarkapillaren als permanent retiniert definiert, deren Retentioszeit 5s überschritt. Lien et al. (99) beobachteten im Rahmen intravitalmikroskopischer Untersuchungen an Hundelungen vereinzelte Leukozyten die auch nach Retentionszeiten von bis zu 1200s ihre Passage durch das Kapillarnetzwerk wieder fortsetzten. Die absolute Anzahl permanent retinierter Leukozyten wird daher bei einer definierten Retentionszeit von >5s möglicherweise leicht überschätzt.

2.1.7 Intravenöse Infusion freier Arachidonsäure

Um das Angebot an Arachidonsäure innerhalb kurzer Zeit im Versuchtier zu steigern, wurde freie Arachidonsäure gelöst in mittelkettigen Triglyceriden (MCT) mittels Perfusor kontinuierlich über die marginale Ohrvene des Kaninchens infundiert. Mittelkettige Triglyceride stellen als amphiphile Verbindung ein geeignetes Lösungsmittel der unpolaren Arachidonsäure dar und können gemäß des Herstellers (B.Braun-Melsungen) in ihrer Wirkung im Bereich der verwendeten Dosierung als inert betrachtet werden. Dennoch finden sich in der Literatur zahlreiche Untersuchungen, die sich insbesondere mit möglichen protektiven Einflüssen von Triglyceriden während Endotoxinämie bzw. gram-negativer Sepsis befassen (61,70,133,134,170,176). Untersuchungen von Read (134) zufolge verbesserte sich die Überlebensrate septischer Ratten nach intravenöser Infusion von triglyceridhaltigen Chylomikronen (1g Triglyceride/kg) signifikant nach 96 stündiger

Beobachtungszeit von 27% auf 80%. Die Verbesserung der Überlebensrate war assoziiert mit einer signifikanten Reduktion der Serum LPS- und TNF-α Konzentrationen (71,134). Mittels ^{125}I markiertem Endotoxin konnte eine erhöhte Clearance des LPS aufgrund verstärkter hepatischer Aufnahme sowie biliärer Sekretion durch die Triglyceridinfusion nachgewiesen werden (133). Allerdings liegen die durch die intravenöse Infusion erreichten Plasmatriglyceridspiegel mit 1500 – 5000 mg/dl bei der rund 5 bis 15fachen Konzentration der in der vorliegenden Studie gemessenen Plasmatriglyceridkonzentration.
Zum Ausschluss möglicher Wirkungen des MCT-Trägers führten wir in Studie III die NaCl-Gruppe als weitere Kontrollgruppe mit. Der Vergleich zwischen den Ergebnissen der NaCl-Gruppe und MCT-Gruppe lässt darauf schließen, dass der infundierte Träger MCT in der angegeben Dosierung auf die von uns untersuchten Parameter innerhalb des gewählten Untersuchungszeitraumes keinen Einfluss hatte und Wirkungen des Infusionsgemisches auf die infundierte freie Arachidonsäure zurückzuführen sind.

2.1.8 Endotoxin als proinflammatorischer Stimulus

In rund 30% der Fälle entwickelt sich in der Klinik im Verlauf einer gramnegativen Sepsis ein akuter Lugenschaden. Die gramnegative Sepsis stellt damit die häufigste Ursache für die Entwicklung eines akuten Lungenschadens dar (18,168). Endotoxine sind wissenschaftlich gut untersuchte und tierexperimentell häufig verwendete pathologische Stimuli. Insbesondere die intravenöse Injektion bzw. Infusion von Escherichia Coli-Endotoxin wird in einer Vielzahl tierexperimenteller Untersuchungen in unterschiedlichen Spezies zur Induktion eines akuten Lungenschadens eingesetzt (113,116,118-120,138,144).
In der vorliegenden Studie III wurde den Versuchstieren intravenös 20µg/kg KG E. Coli Endotoxin vom Typ 0111:B4 einmalig als Bolus intravenös appliziert.
Gemäß den Zielkriterien der Vorversuche führt die Bolusinjektion bei konstanten makrohämodynamischen Verhältnissen im Pulmonaliskreislauf zu einem reproduzierbaren Abfall der peripheren Leukozytenzahl auf 50% der Ausgangswerte innerhalb von 5 min nach Injektion. Hiermit verbunden sind unter anderem eine Aktivierung des Komplementsystems und eine gesteigerte Leukozytenakkumulation (87) und Leukozytenaktivierung in der pulmonalen Mikrostrombahn. Aufgrund seiner Halbwertszeit von ca. 30 min sinkt die Endotoxinkonzentration über den Versuchsverlauf wieder kontinuierlich ab. Die einmalige intravenöse Bolusinjektion des Endotoxins führt damit zu einer temporären Endotoxinämie, stellt jedoch kein Modell einer gram-negativen Sepsis im

klinischen Sinn dar. Hierfür wäre unter anderem sowohl ein wesentlich längerer Untersuchungszeitraum als auch eine kontinuierliche Endotoxininfusion (27) mit einem zeitlichen Vorspann von rund 4 Halbwertszeiten notwendig, um annähernd konstante Endotoxinspiegel im Blut zu erreichen.

Die in der vorliegenden Studie verwendete Endotoxindosierung von 20µg/kg KG liegt im Vergleich zu anderen in der Literatur ebenfalls am Kaninchen angewandten Dosierungen zur Induktion eines Lungenschadens (113,120) vergleichsweise niedrig. Da es jedoch Ziel der Studie war, einen möglichen triggernden, bzw. aggravierenden Einfluss eines erhöhten Arachidonsäureangebots auf die Initialphase des Endotoxin-induzierten Lungenschadens zu untersuchen, war die Wahl eines geringen Endotoxinstimulus nicht nur sinnvoll sondern notwendig, um eine zusätzliche Aggravierung des Lungenschadens weiterhin anhand der gewählten Parameter quantifizieren zu können.

2.1.9 Konstanz der Rahmenbedingungen

Grundvoraussetzung experimenteller Untersuchungen ist die Gewährleitung der Wertekonstanz im Meßsystem über den Untersuchungszeitraum bei konstanten Rahmenbedingungen. In zahlreichen am vorliegenden Modell durchgeführten Studien (82,86,93,94) konnte die Konstanz sowohl der makrohämodynamischen als auch mikrozirkulatorischen Parameter im unstimulierten Modell über einen Zeitraum von 60 Minuten bestätigt werden. Auch für die vorliegende Studie konnte somit eine Konstanz der Messgrößen über einen Untersuchungszeitraum von 60 Minuten bei konstanten Rahmenbedingungen, d.h. ohne weitere Stimulation angenommen werden. Änderungen der Parameter sind somit den Interventionen gemäß der Versuchsprotokolle und -gruppen und nicht modellimmanenten Veränderungen zuzuschreiben.

2.2 Diskussion der Ergebnisse

Während in Studie II die Arachidonsäureinfusion ohne weitere inflammatorische Stimulation keine wesentlichen Änderungen der quantifizierten Parameter bewirkte, wurden in Studie III bei zusätzlich induzierter experimenteller Endotoxinämie signifikante Auswirkungen auf makrohämodynamische, mikrozirkulatorische und blutchemische Parameter festgestellt, die im Folgenden diskutiert werden.

2.2.1 Makrohämodynamik

Sowohl die in Studie II als auch in Studie III unter Ausgangsbedingungen gemessenen Werte der Makrohämodynamik entsprechen früheren in diesem Modell quantifizierten Werten (86,88,89,91,92). Während in Studie II ohne weitere inflammatorische Stimulation alle gemessenen und berechneten Parameter der Makrohämodynamik über den weiteren Untersuchungszeitraum von 60 min konstant bleiben, entwickelt sich in Studie III 60 Minuten nach Endotoxininjektion bei tendenziell erniedrigtem systemisch vaskulärem Widerstand in allen drei Versuchsgruppen eine mäßige arterielle Hypotension, die in der AA-Gruppe im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant verstärkt ist. Eine Erhöhung des pulmonalarteriellen Blutdruckes bei reduziertem Herzzeitvolumen kann in der AA-Gruppe als Erhöhung des pulonalvaskulären Widerstandes interpretiert werden. Der Vergleich der Versuchsgruppen in Studie III zeigt, dass die makrohämodynamischen Veränderungen Abhängigkeit von der Infusion der Arachidonsäure zeigen, da alle Versuchstiere die intravenöse Injektion von Endotoxin erhielten. Der Vergleich der Studien II und III belegt dagegen, dass der Anstieg des pulmonalvaskulären Widerstandes sowie die Entwicklung einer verstärkten arteriellen Hypotension nur bei simultaner zusätzlicher inflammatorischer Stimulation und erhöhtem Angebot an Arachidonsäure erfolgt. Als Ursache der Widerstandserhöhung im Pulmonalkreislauf kann die Produktion des potent vasokonstriktorisch wirkenden Prostaglandins Thromboxan A_2 angenommen werden, da nur im Plasma der Tiere, die mit Endotoxin und Arachidonsäure behandelt wurden, als Nachweis einer gesteigerten Thromboxan A_2 Synthese signifikant erhöhte Konzentrationen von Thromboxan B_2 gemessen werden konnten. Diese Ergebnisse können erstmals *in vivo* ähnliche Resultate am Modell der isoliert perfundierten Lunge bestätigen. Untersuchungen von Steudel *et. al.* haben gezeigt, dass die Bolusapplikation von Arachidonsäure bereits bei einer Konzentration von 30nM bei wiederholten Injektionen kurzzeitige Anstiege des pulmonalarteriellen Druckes bewirkt (160). Nach zusätzlichem

Priming der isoliert perfundierten Lungen mittels Endotoxin erfolgt dagegen ein signifikant stärkerer sowie zeitlich prolongierter Druckanstieg. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte auch in den Untersuchungen an der isoliert perfundierten Lunge (160) ein signifikanter Konzentrationsanstieg von Thromboxan B_2 im Perfusat gemessen werden, wenn Arachidonsäure und Lipopolysacharid in Kombination appliziert wurden. Durch Zugabe des unspezifischen Zyklooxygenase Inhibitors Acetylsalicylsäure konnten diese Effekte nahezu vollständig inhibiert werden. Es wurde daher gefolgert, dass eine durch Lipopolysacharid gesteigerte Zyklooxygenaseaktivität mit konsekutiv verstärkter Produktion von Thromboxanen als kausaler Mechanismus dem Anstieg des pulmonalvaskulären Widerstandes zugrunde liegt. Zwar wurde gezeigt, dass hierdurch neben Thromboxan A_2 die Bildung von vasodilatatorischem Prostaglandin I_2 im Perfusat ansteigt, aus dem pulmonalarteriellen Druckanstieg kann jedoch gefolgert werden, dass die vasokonstriktive Wirkung des Thromboxan A_2 die vasodilatierende Wirkung von PGI_2 in den pulmonalen Widerstandsgefäßen deutlich übertrifft. In Untersuchungen von Ermert *et al.* wurde anschließend durch Verwendung selektiver strukturell unterschiedlicher Zykloogxigenase-2 (COX-2) Inhibitoren nachgewiesen, dass der gesteigerte Arachidonsäuremetabolismus in erster Linie auf eine erhöhte COX-2 Aktivität zurückzuführen ist (43,46). COX-2 ist bereits in bronchialen Epithelzellen, bronchialen glatten Muskelzellen, Makrophagen und den glatten Muskelzellen der Widerstandsgefäße konstitutiv exprimiert (44). Dagegen findet sich keine konstitutive COX-2 Expression im pulmonalvaskulären Endothelzellen (45). Nach Stimulation mit Endotoxin konnte gezeigt werden, dass sich weder die mRNA Konzentration von COX-1 noch deren Verteilung in verschiedenen pulmonalen Zelltypen ändert, während COX-2 in pulmonalvaskulären Endothelzellen de novo exprimiert wird bzw. in den Zellen, die bereits unter Ausgangsbedingungen COX-2 exprimieren, hochreguliert wird (45). Im Gegensatz zu den Versuchsprotokollen der vorliegenden Arbeit erfolgte jedoch in den Studien an der isoliert perfundierten Lunge (46) ein zweistündiges Priming der Lungen mit Endotoxin und nicht mit Arachidonsäure. In der vorliegenden Arbeit muss es für eher unwahrscheinlich erachtet werden, dass bereits 30 Minuten nach Endotoxininjektion sowohl Transkription als auch Translation der Zyklooxygenase erfolgt sind. Eine potentielle Hochregulation der COX-2 könnte jedoch durch die Wirkung der 4-stündigen Arachidonsäureinfusion vor Endotoxininjektion erfolgt sein. Es ist bekannt, dass die Expression von COX-2 entscheidend durch den Transkriptionsfaktor Nuclear factor- κ-b (NFκb) reguliert wird (7,97). NFκb wird wiederum im Zytosol der Zellen durch Phosphorylierung und damit

verbundener Abspaltung des NFκb-inhibiting Faktors (IκB) aktiviert. Die Phosphorylierung kann durch Proteinkinase C erfolgen (7), die wiederum durch Arachidonsäure als intrazellulären Botenstoff aktiviert werden kann (23,81,142).

Neben den Veränderungen der Hämodynamik im Pulmonalkreislauf konnte in allen drei Versuchsgruppen der Studie III eine Reduktion des arteriellen Blutdruckes 60 Minuten nach Endotoxininjektion gemessen werden. Die arterielle Hypotension wurde darüber hinaus durch intravenöse Infusion der Arachidonsäure signifikant verstärkt. Zu den bekannten Wirkungen von Endotoxin gehört die Induktion von Bradykinin als Folge einer Konversion von Prekallikrein zu Kallikrein durch den Hagemannfaktor (30). Bradykinin ist einer der stärksten Vasodilatatoren und kann damit auch eine wesentliche Ursache für die Entwicklung der arteriellen Hypotension der Versuchstiere nach intravenöser Injektion von Endotoxin darstellen. Als möglicher Hinweis auf eine Vasodilatation im Körperkreislauf kann der tendenziell reduzierte systemisch vaskuläre Widerstand 60 Minuten nach Endotoxininjektion interpretiert werden. Fisher *et al*. konnten zeigen, dass Bradykinin anders als in der systemischen Zirkulation in mit Endotoxin behandelten Ratten eine pulmonale Vasokonstriktion hervorrufen kann (52,53) und damit neben der Thromboxanproduktion einen potentiellen Mediator darstellt, der an der Entwicklung der pulmonalen Hypertonie in den mit Arachidonsäure und Endotoxin behandelten Tieren kausal beteiligt ist.

Die verstärkte Produktion von Prostaglandin I_2 in der AA-Gruppe, das im Gegensatz zum Pulmonalkreislauf im Körperkreislauf die vasokonstriktorische Wirkung des gebildeten Thromboxans A_2 übertrifft, kann aufgrund einer zusätzlichen Reduktion des systemisch vaskulären Widerstandes in einer Verstärkung der Hypotension resultieren. Ferner könnte zudem die gesteigerte Druckbelastung des rechten Ventrikels resultierend aus dem erhöhten pulmonalvaskulären Gefäßwiderstand bei nur begrenzten kardialen Kompensationsmechanismen, letztendlich auch zur Beeinträchtigung der linksventrikulären Funktion führen. Dies kann wiederum zur Entwicklung der arteriellen Hypotension als auch zur Reduktion des Herzzeitvolumens in der Arachidonsäuregruppe beitragen.

2.2.2 Gasaustausch

Als funktionelle Parameter des pulmonalen Gasaustausches wurden in allen Versuchstieren der arterielle Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruck gemessen. Die Ausgangswerte in allen Versuchsgruppen sowie die Werte nach 5-stündiger Arachidonsäureinfusion in den

Versuchstieren der Studie II, unterscheiden sich nicht von den Ergebnissen in früheren Studien an diesem Modell, in denen keinerlei inflammatorische Stimulation vorgenommen wurde(65,86,88,91). Die Infusion der Arachidonsäure per se in der gewählten Konzentration führt also zu keiner veränderten Gasaustauschfunktion der Lunge. Nach zusätzlicher inflammatorischer Stimulation mit Endotoxin erfolgt dagegen in der Arachidonsäuregruppe im Vergleich zur alleinigen Injektion von Endotoxin in der NaCl-Gruppe eine Reduktion des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes zum Zeitpunkt 30' sowie eine signifikante Zunahme des Kohlendioxidpartialdruckes. Insbesondere eine starke Reduktion des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks gilt als Marker eines gestörten Gasaustausches bedingt vor allem durch eine Zunahme mangelhaft ventilierter Lungenareale und einer inflammationsbedingten Supprimierung der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion und damit konsekutiv erhöhtem Shuntvolumen.

Innerhalb der Arachidonsäuregruppe kann andererseits über den Versuchsverlauf nur eine tendenzielle Abnahme des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks beobachtet werden. Aus folgenden Gründen lässt sich jedoch trotzdem die Entwicklung eines pathophysiologisch bedeutsamen Endothelschadens und damit verbunden die Entwicklung eines interstitiellen Lungenödems nicht ausschließen: durch die Modell-bedingt notwendige Beatmung mit positiv-endexspiratorischen Beatmungsdrücken sowie der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration von 40%, wird sowohl der Bildung von Mikroatelektasen entgegengewirkt sowie optimale Vorraussetzung für eine bestmögliche Oxygenierung bei möglicherweise auch schon bestehendem interstitiellen Ödem gewährleistet. Eine weitere Diskrepanz liegt ferner zwischen der nur tendenziellen Reduktion des Sauerstoffpartialdruckes und der signifikanten Kohlendioxidretention nach Endotoxininjektion in der Arachidonsäuregruppe. Kohlendioxid kann als unpolares Gas weitaus schneller die Diffusionsbariere zwischen Alveolar-und Intravasalraum passieren, eine diffusionsbedingte Kohlendioxidretention müsste sich daher immer erst nach einer deutlichen Reduktion der pulmonalen Oxygenierung manifestieren.

Diese Diskrepanz findet jedoch ihre Erklärung bei genauere Betrachtung des verwendeten Beatmungsverfahren. Um Veränderungen der Mikrohämodynamik durch unterschiedliche intraalveoläre Drücke ausschließen zu können, wurde bei der Etablierung des Modells ein druckkontrolliertes Beatmungsverfahren gewählt. Nach Abschluss der Präparation wird zudem die Beatmungsfrequenz konstant gehalten. Ändert sich folglich während der Beobachtungsphase der Atemwegswiderstand, so muss bei konstanten Beatmungsdrücken gemäß dem Ohm`schen Gesetz eine Reduktion des Atemzugvolumes resultieren. Bei

konstanter Ventilationsfrequenz erfolgt konsekutiv die Reduktion des Atemminutenvolumens und damit verbunden bei gleichbleibender Kohlendioxidproduktion im Organismus ein Anstieg des Kohlendioxidpartialdruckes im arteriellen Blut. Zur Erhöhung des Atemwegwiderstandes könnten in der Arachidonsäuregruppe zum einen eine reduzierte Lungencompliance aufgrund der Entwicklung eines interstitiellen Ödems, zum anderen eine z.B. Leukotrien vermittelte Bronchkonstriktion beitragen. Ermert *et al.* konnten nachweisen, dass in Endotoxin-geprimenten isoliert perfundierten Lungen sich der Beatmungsdruck bei volumenkontrollierter Beatmung nach Zugabe von Arachidonsäure zum Perfusat annähernd verdoppelt (46). Durch die Analyse statischer Druck-Volumen Kurven konnte gezeigt werden, dass vorwiegend der Anstieg der bronchialen Resistance der Erhöhung des Atemwegswiderstandes zugrunde liegt. Ermert *et al*. (46) postulieren als Mechanismus eine COX-2 mediierte gesteigerte Produktion von Thromboxan A_2 in den glatten bronchialen Muskelzellen. Andererseits konnten Grimminger *et al*. im Modell der isoliert perfundierten Lunge zeigen, dass ebenso die Produktion von Leukotrienen in der pulmonalen Mikrostrombahn Abhängigkeit von der exogenen Zufuhr von Endotoxin und Arachidonsäure zeigt (63). Es ist bekannt, dass insbesondere Leukotrien C_4 starke bronchokonstriktorische Wirkung zeigt.

2.2.3 Pulmonale Mikrohämodynamik und Leukozyten-Edothelinteraktion

Neben makrohämodynamischen Parametern sowie der Gasaustauschfunktion können insbesondere mikrohämodynamische Parameter sowie die Untersuchung der Leukozyten-Endothelinteraktion in der pulmonalen Mikrostrombahn als frühe, sensitive Parameter Hinweise über Ausmaß und Mechanismen eines dem Organschaden zugrundeliegenden pathophysiologischen Prozesses liefern. Zusätzlich zu den bereits diskutierten Ergebnissen der Makrohämodynamik und der Gasaustauschfunktion wurden deshalb wichtige Parameter der Mikrohämodynamik und Leukozyten-Endothel Interaktion in pulmonalen Arteriolen, Alveolarkapillaren und Venolen mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie quantitativ analysiert.

2.2.3.1 Gefäßmorphologie und Mikrohämodynamik

Alterationen der pulmonalen Mikrohämodynamik spielen sowohl im Rahmen physiologischer Regulationsmechanismen, insbesondere jedoch während pathophysiologischer Prozesse innerhalb der Lunge eine entscheidende Rolle, da gravierende Veränderungen des mikrovaskulären Blutflusses per se, vor allem aber in Kombination mit Ventilationsinhomogenitäten zu Missverhältnissen zwischen Ventilation und Perfusion führen, die die Gasaustauschfunktion der Lunge erheblich beeinträchtigen können. Als wesentliche Parameter der pulmonalen Mikrohämodynamik gelten die mittlere Erythrozytenfließgeschwindigkeit in Arteriolen, Alveolarkapillaren und Venolen, der Blutvolumenfluss, sowie die funktionelle Kapillardichte. Diese Parameter verändern sich jedoch nicht nur im Rahmen pathophysiologischer Prozesse innerhalb der pulmonalen Mikrostrombahn, sondern zeigen ebenso Abhängigkeit von physiologischen oder pathophysiologischen Veränderungen der Makrohämodynamik sowie der Ventilation. Grundlage dieses Zusammenhanges bildet das von West 1964 beschriebene Zonenmodell (180): Entlang des vertikalen hydrostatischen Gradienten wird die Lunge in drei Zonen unterteilt. In Zone 1 übertrifft der intraalveoläre Druck den arteriellen Blutdruck. Es erfolgt keine Durchblutung der Alveolen. In Zone 2 übersteigt der arterielle Druck den Alveolardruck, die Perfusion ist abhängig vom arterio-alveolären Druckgradienten. In der basalen Zone 3 liegt der venöse Druck höher als der alveoläre. Die Perfusion wird durch die arterio-venöse Druckdifferenz reguliert. Wie bereits erwähnt, konnten die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Regionen mittels Microspherentechnik der Zone 2 nach West zugeordnet werden (60,93). Bei konstanten intraalveolären Druckverhältnissen, die durch die druckkontrollierte Beatmung garantiert werden, ist die Perfusion im

Beobachtungsareal damit abhängig vom pulmonalarteriellen Blutdruck. Intravitalmikroskopisch kann daher ein Anstieg des Blutvolumenflusses, der Erythrozytenfließgeschwindigkeit sowie der funktionellen Kapillarperfusion bei erhöhtem pulmonalarteriellem Blutdruck beobachtet werden (93). Zusätzlich führen Variationen des Herzzeitvolumens zu gleichgerichteten Veränderungen der Mikrohämodynamik in Arteriolen und Venolen; in alveolären Kapillararealen der Zone 2 nach West erfolgt das charakterische Phänomen der Kapillarrekrutierung- und Derekrutierung in Abhängigkeit des Herzzeitvolumens (59,68). Das intravitalmikroskopische Korrelat stellen signifikante Änderungen der funktionellen Kapillarperfusion bei variiertem Herzzeitvolumen dar (93). Die Kenntnis der makrohämodynamischen Parameter ist daher für die Interpretation der mikrohämodynamischen Ergebnisse von elementarer Bedeutung, um zwischen einer Alteration der Mikrohämodynamik bedingt durch pathophysiologische Prozesse innerhalb der pulmonalen Mikrostrombahn selbst und Veränderungen aufgrund unterschiedlicher makrohämodynamischer Bedingungen im Pulmonalkreislauf unterscheiden zu können.

In der Studie II und III zeigten die in pulmonalen Arteriolen, Kapillararealen und Venolen quantifizierten Parameter der Mikrohämodynamik nach 4-stündiger Infusion der Arachidonsäure keine wesentlichen Unterschiede zu den unter physiologischen Bedingungen quantifizierten Werten (65,89,93). Während in Studie II keine Änderungen über den weiteren Versuchsverlauf von 60 Minuten zu beobachten waren, treten in Studie III Veränderungen der Mikrohämodynamik nach Endotoxininjektion ein, deren Ausmaß Abhängigkeit von der Infusion der Arachidonsäure zeigt. In pulmonalen Arteriolen und Venolen war die Reduktion sowohl der Erythrozytenfließgeschwindigkeit als auch des Blutvolumenflusses der Tiere, die mit einer Kombination aus Arachidonsäure und Endotoxin behandelt wurden, am stärksten ausgeprägt. Zusätzlich war ebenso bei diesen Tieren die funktionelle Kapillarperfusion 60 Minuten nach Endotoxin-Injektion signifikant auf 19% des Ausgangswertes reduziert. Diese Veränderungen dürfen jedoch, vor allem in der Arachidonsäuregruppe, zunächst nicht ausnahmslos als Folge eines „Mikrozirkulationsschadens“ interpretiert werden. In der Arachidonsäuregruppe ist das Herzzeitvolumen 60 Minuten nach Endotoxininjektion im Vergleich zum Ausgangswert signifikant reduziert und trägt damit an der Reduktion des Blutvolumenflusses sowie der Kapillarderekrutierung bei. Allerdings ist die Reduktion der Kapillarperfusion im Vergleich zu den Ergebnissen von Kübler et al. (86,92) überproportional stark ausgeprägt und kann deshalb nicht alleine auf die Veränderung des Herzzeitvolumens zurückgeführt werden. Darüber hinaus ist davon auszugehen, dass der gesteigerte pulmonalarterielle

Blutdruck in gewissem Umfang die Auswirkungen des reduzierten Herzzeitvolumens auf die hier untersuchten Größen kompensiert. Dennoch sinken bereits 30 Minuten nach Endotoxininjektion bei erhöhtem pulmonalem Perfusionsdruck und noch unverändertem Herzzeitvolumen sowohl die Erythroyzenfließgeschwindigkeit als auch Blutvolumenfluß und die funktionelle Kapillarperfusion in der Arachidonsäuregruppe deutlich ab. Hieraus muss gefolgert werden, dass als Ursache der alterierten Mikrohämodynamik weniger die Veränderungen der Makrohämodynamik sondern vielmehr pathophysiologische Prozesse in der pulmonalen Mikrostrombahn selbst im Vordergrund stehen.

Eine Diskrepanz zwischen den makrohämodynamisch quantifizierten Parametern des Pulmonalkreislaufs und intravitalmikroskopisch erhobenen Größen der Gefäßmorphologie ergibt sich bei der Betrachtung des pulmonalvaskulären Widerstands und den Gefäßdurchmessern der untersuchten Arteriolen. In der Arachidonsäuregruppe in Studie II steigt der pulmonalvaskuläre Widerstand im Versuchsverlauf an, es kann jedoch keine signifikante Vasokonstriktion in den untersuchten pulmonalen Arteriolen beobachtet werden. Die Kenntnis der Morphologie pulmonaler Gefäße ist notwendig, um diese Diskrepanz zu erklären. Meyrick et al. (112), sowie Reid und Meyerick (135,136) beschrieben in Studien zur Lungenhistologie, die an erwachsenen Sprague-Dawley Ratten durchgeführt wurden, dass Arteriolen unter einem Gefäßdurchmesser von 100µm meist keinen kompletten Muskelmantel mehr besitzen, sondern sich die Muskelzellen zum Kapillarbett hin in weiter werdenden Spiralen um diese Gefäße schlingen. Die größte Arteriole mit einem partiellen Muskelmantel war in diesen Untersuchungen 150µm stark, die kleinste Arteriole mit vollständigem Muskelmantel 30µm. Es ist also davon auszugehen, dass die von uns untersuchten Arteriolen mit mittlerem Durchmesser unter 30 µm wahrscheinlich keinen oder zumindest nur einen sehr partiellen Muskelmantel besitzen, und deshalb in diesem Bereich des arteriolären Gefäßbaums keine aktive Vasokonstriktion der Gefäße mehr beobachtet werden kann. Die tendenzielle Reduktion der Gefäßdurchmesser resultiert deshalb aufgrund passiver Mechanismen, die vorwiegend auf einen erhöhten interstitiellen Flüssigkeitsdruck zurückzuführen sind, der seine Ursache in der Entwicklung eines interstitiellen Lungenödems haben kann.

Durch die Messung der Breite der Alveolarsepten als Zeichen einer interstitiellen Ödementwicklung konnte in der Studie III nachgewiesen werden, dass nach Endotoxininjektion, die intrapulmonale Flüssigkeitsretention durch die zusätzliche Infusion der Arachidonsäure verstärkt wird. Die alleinige Infusion der Arachidonsäure ohne zusätzlichen inflammatorischen Stimulus bewirkt dagegen auch nach 5-stündiger Infusion

keine Zunahme der Breite der Alveolarsepten. Diese Ergebnisse wurden durch die histologischen Untersuchungen post mortem bestätigt und lassen schlussfolgern, dass ein erhöhtes Angebot von Arachidonsäure während systemischer Inflammation die Entwicklung des *„Capillary leak syndroms"* in der pulmonalen Mikrostrombahn erheblich aggraviert.

In Übereinstimmung mit diesen Resultaten konnten Grimminger *et al.* am Modell der isoliert perfundierten Lunge zeigen, dass der Anstieg des funktionellen Kapillarfiltrationskoeffizienten als Maß des *„Capillary leakages*" in mit Eschericia Coli Hemolysin stimulierten Lungen in Abhängigkeit der Arachidonsäurekonzentration im Perfusat massiv ansteigt (64). Das gesteigerte Kapillarleakage war assoziiert mit einer erhöhten Konzentration der Lipoxygenase Produkte im Perfusat (63,64). Es ist bekannt, dass die Leukotriene LTB_4 sowie LTC_4 nicht nur zur Degranulation und Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale durch die bereits unter physiologischen Bedingungen in der pulmonalen Mikrozirkulation marginierten Granulozyten (36,37) führen, sondern auch per se eine Steigerung der Endothelpermeabilität bewirken (35). Im Gegensatz zu Untersuchungen *in vitro*, in denen bereits durch die alleinige Inkubation von Granulozyten mit Arachidonsäure ohne zusätzliche inflammatorische Stimulation, der Granulozyten-mediierte Endothelschaden signifikant verstärkt wird (11), zeigen die Resultate der Versuchsstudie I, dass die Arachidonsäureinfusion ohne weiteren inflammatorischen Stimulus *in vivo* zu keinem wesentlichen Endothelschaden führt.

Insbesondere im Rahmen des Endotoxin-induzierten akuten Lungenschadens wird den Leukozyten, und darunter vor allem den neutrophilen Granulozyten eine zentrale pathophysiologische Bedeutung beigemessen (57,169,179). Gleichzeitig ist bekannt, dass Arachidonsäure *in vitro* die adhäsiven Zelleigenschaften der Granulozyten steigert (10) und deshalb möglicherweise auch während Endotoxinämie *in vivo* die Aggravierung des Endothelschadens bei gesteigertem Angebot von Arachidonsäure aufgrund einer vermehrten Margination und Adhäsion der Leukozyten in der pulmonalen Mikrostrombahn erklärt werden kann. Um diesen hypotetischen Mechanismus *in vivo* zu untersuchen, wurde die Leukozyten-Endothelinteraktion in allen Segmenten der pulmonalen Mikrozirkulation quantitativ analysiert.

2.2.3.2 Leukozyten-Endothel Interaktion

Vor der Interpretation und Diskussion der Ergebnisse der Leukozyten-Endothel-Interaktion sollen zunächst die entscheidenden pathophysiologischen Mechanismen und Konsequenzen zusammenfassend erläutert werden, die während einer Endotoxinämie zur Margination und Adhäsion neutrophiler Granulozyten in der pulmonalen Mikrozirkulation führen.

Gelangt Endotoxin in die systemische Zirkulation erfolgt einerseits über die Aktivierung des Komplemetsystems und die Bildung der Komplementspaltprodukte C3a und C5a zum anderen aber auch direkt eine Aktivierung von polymorphkernigen Granulozyten (179). Andererseits kommt es nach Bindung des Lipopolysacharides mit dem LPS-Bindungsprotein CD-14 vermittelt zur Aktivierung von Makrophagen (164). Neueste Untersuchungen konnten zeigen, dass neben CD 14 in wahrscheinlich wichtigerem Ausmaß der Toll-like Rezeptor 2 die Signaltransduktion vermittelt (181,182). Aktivierte Makrophagen setzen darauf hin verschiedene Zytokine wie etwa Tumornekrosefaktor α oder Interleukin 1 frei, welche die Aktivierung des Endothels, aber gleichzeitig ebenso die Aktivierung der Granulozyten bewirken.

Die Stimulation der Granulozyten führt initial zur Veränderung ihrer mechanischen Zelleigenschaften. Dieses als „ Stiffening“ bezeichnete Phänomen ist gekennzeichnet durch eine reduzierte Verformbarkeit, einen Anstieg des Zellvolumens sowie eine veränderte Zellform. Hierdurch resultiert eine Verlängerung der Passage bzw. Verhinderung der Passage der Zellen vor allem durch die pulmonalen Kapillarsegmente aufgrund der Diskrepanz von Granulozyten- und Kapillardurchmesser bei erhöhter Zellrigidität und die damit verbundene initiale Sequestrierung aktivierter neutrophiler Granulozyten in der pulmonalen Endstrombahn (35). Anders als in vielen anderen Organen des Organismus sind nach derzeitigem wissenschaftlichen Stand bekannte Adhäsionsmoleküle, wie beispielsweise die Selektine CD 62P und CD 62L sowie die Integrine CD11/CD18 für die initiale Sequestrierung der Granulozyten in den Alveolarkapillaren von geringer Bedeutung (35,39,85). Erst nach der initial mechanisch bedingten Sequestration der Zellen ist für eine länger als 4-7 Minuten prolongierte Retention der Granulozyten die vorwiegend L-Selectin und CD11/CD18 vermittelte Adhäsion der Granuloztyen am kapillaren Gefäßendothel erforderlich (35,39,85).

Eine Adhäsionsmolekül-mediierte prolongierte Retention bildet jedoch die wesentliche Voraussetzung für die Interaktion von Granulozyten, Endothelzellen und Thrombozyten innerhalb der pulmonalen Mikrostrombahn, da insbesondere nach der L-Selectin bzw.

CD11/CD18-ICAM-1 vermittelten Zelladhärenz entscheidende Signalkaskaden der Zellaktivierung initiiert werden (153,172,173,177). Die konsekutive Freisetzung proteolytischer Enzyme, die Bildung freier Sauerstoffradikale und die Produktion zahlreicher proinflammatorischer Mediatoren (Eicosanoide, NO, Interleukine, Radikale etc.) sind für die anschließende Entwicklung des „Capillary leak syndroms“ essentiell.

In vitro Studien konnten zeigen, dass die Adhärenz humaner neutrophiler Granulozyten an mit autologem Plasma beschichteten Mikrotiterplatten nach Inkubation mit Arachidonsäure in Konzentrationen ab 10µM signifikant ansteigt (11). Diese Arachidonsäurekonzentration konnte sowohl in alten Erythrozytenkonzentraten gemessen werden, sowie zumindest annähernd im Plasma der Tiere, die die intravenöse Infusion freier Arachidonsäure erhalten hatten, nachgewiesen werden.

Als Ursache der veränderten adhäsiven Zelleigenschaften werden einerseits eine verstärkte Expression der β_2-Integrine nach Inkubation mit Arachidonsäure diskutiert (10,74), andererseits konnte gezeigt werden, dass vor allem strukturelle Konformationsänderungen des CD11b/CD18 Rezeptors die Zelladhäsion begünstigen (55). Hierzu ist die Proteinkinase C abhängige intrazelluläre Phosphorylierung der β_2 Kette notwendig. Proteinkinase C wiederum kann entscheidend durch Arachidonsäure aktiviert werden (23,81,142). Hypothetisch konnte deshalb angenommen werden, dass im Rahmen des gesteigerten Angebotes von Arachidonsäure auch *in vivo* eine gesteigerte Margination und Adhäsion von neutrophilen Granulozyten in der pulmonalen Mikrozirkulation erfolgt, die als wesentlicher kausaler Mechanismus zur Aggravierung des Capillary leak Syndroms führt.

Sowohl in Studie II als auch Studie III lag nach 4-stündiger Infusion der Arachidonsäure jedoch die Zahl Endothel-adhärenter Leukozyten nicht höher als in früheren an diesem Modell durchgeführten Studien unter physiologischen Bedingungen (86,88,89,92). Während in Studie II ohne zusätzliche inflammatorische Stimulation sowohl periphere Leukozytenzahl sowie die Anzahl adhärenter Leukozyten in Arteriolen, Alveolarkapillaren und Venolen keine Veränderungen über den weiteren Infusionszeitraum von 60 Minuten zeigten, waren in Versuchsstudie II nach Endotoxininjektion signifikante Veränderungen der Leukozytenkinetik zu beobachten. Unabhängig von der Infusion der Arachidonsäure trat in allen drei Versuchsgruppen bereits 5 Minuten nach Endotoxininjektion ein signifikanter Abfall der peripheren Leukozytenzahl auf annährend 50% des Ausgangswertes ein, intravitalmikroskopisch konnte in allen Gruppen eine Zunahme der adhärenten bzw. retinierten Leukozyten in Arteriolen, Alveolarkapillaren und Venolen

beobachtet werden. In Alveolarkapillaren nahm innerhalb der ersten 5 Minuten nach intravenöser Endotoxininjektion die Anzahl permanent retinierter Leukozyten in der Arachidonsäuregruppe signifikant stärker zu als in den Kontrollgruppen, am Ende des Beobachtungszeitraumes lag jedoch die Anzahl adhärenter Leukozyten in allen untersuchten Gefäßsegmenten nur noch tendenziell höher als in den beiden weiteren untersuchten Gruppen.

Bei der Interpretation der Resultate gilt es jedoch zu berücksichtigen, dass neben adhäsionsmolekül-vermittelten Mechanismen ebenso Variationen der intravasalen Scherkräfte das Interaktionsverhalten der Leukozyten mit dem Endothel beeinflussen. So konnten Kübler *et. al.* durch Modulation des Herzzeitvolumes und damit verbunden unterschiedlichen Erythrozytenfließgeschwindigkeiten und konsekutiv veränderten intravasalen Scherraten einen linearen Zusammenhang zwischen der Anzahl Endothel-adhärenter bzw. in Kapillaren permanent retinierten Leukozyten und den Scherraten am Gefäßendothel nachweisen (86,92). Diese Untersuchungen konnten die Ergebnisse von Martin *et al.* bestätigen, die mittels Indikator-Verdünnungsmethode zeigen konnten, dass sich die pulmonalen Leukozytensequestrierung umgekehrt proportional zum regionalen Blutfluß verhält (107). Bei der Betrachtung der quantifizierten Scherraten in den Untersuchungen der Studie III wird deutlich, dass in der Arachidonsäuregruppe in Arteriolen und Venolen eine tendenziell stärkere Reduktion der Scherrate nach Endotoxininjektion erfolgt. Es muss also davon ausgegangen werden, dass die größere Zahl adhärenter Leukozyten in der frühen Phase teilweise auch auf die Reduktion der intravasalen Scherraten und nicht nur auf adhäsionsmolekül-abhängige Mechanismen zurückzuführen ist.

Die nur verhältnismäßig geringen Unterschiede der intravitalmikroskopisch quantifizierten Anzahl endothel-adhärenter Leukozyten am Ende des Beobachtungszeitraumes werden durch die Ergebnisse der quantifizierten Myeloperoxidaseaktivitäten im Lungengewebe bestätigt. Auch hier zeigt sich lediglich eine tendenzielle Zunahme der Myeloperoxidasaktivität in Abhängigkeit von der Arachidonsäureinfusion bei zusätzlicher inflammatorischer Stimulation mittels Endotoxin, während die alleinige Arachidonsäureinfusion in Studie II keine Zunahme der Myeloperoxidaseaktivität und damit der Anzahl von Granulozyten im pulmonalen Gewebe bewirkt. Dies kann Aufgrund des Vergleichs der gemessenen Aktivitäten und Angaben in der Literatur (87) gefolgert werden.

Zusammenfassend lässt sich aus der Analyse der Leukozyten-Endothelinteraktion sowie der Messung der Myeloperoxidaseaktivität ableiten, dass entgegen den Untersuchungsergebnissen *in vitro*, die Arachidonsäureinfusion in der gewählten Konzentration nur zu einer sehr geringen Modulation der adhäsiven Zelleigenschaften führt und auch nach zusätzlicher inflammatorischer Stimulation nur eine geringe Zunahme der Anzahl sequestrierter Leukozyten im Vergleich zur endotoxin-induzierten Leukozytensequestration stattfindet. Andererseits konnte, wie unter 2.2.3.1 erläutert, nachgewiesen werden, dass Arachidonsäure den endotoxin-induzierten mikrovaskulären Schaden erheblich aggraviert. Da die Anzahl der sequestrierten Granulozyten nur unwesentlich verändert ist, müssen andere Mechanismen wirksam sein, die im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

2.2.4 Pathophyiologische Mechanismen der Schadensaggravierung

Zwar besitzen die polymorphkernigen Granulozyten eine zentrale Bedeutung insbesondere in der Initialphase des endotoxin-induzierten akuten Lungenschadens (169,179), jedoch ist nicht einzig und alleine, wie die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen konnten, die Anzahl der in der pulmonalen Mikrostrombahn sequestrierten Leukozyten entscheidend für das Ausmaß des resultierenden mikrovaskulären Endothelschadens. Es kann daher angenommen werden, dass insbesondere in der pulmonalen Strombahn nicht nur die Anzahl der Granulozyten, sondern vielmehr der Aktivität der einzelnen Zellen selbst und der damit verbundenen Qualität und Quantität der produzierten proinflammatorischen Mediatoren eine möglicherweise noch größere Bedeutung beigemessen werden muss. Grundlage dieser Hypothese, bildet der bereits unter physiologischen Bedingungen große Pool marginierter Leukozyten in der pulmonalen Strombahn. Bereits 1894 konnte Bruce(28) zeigen, dass die Lunge eine weitaus größere Anzahl an Leukozyten als jedes andere Organ des Körpers beherbergt. Dass es sich bei den in der Lunge sequestrierten Leukozyten in erster Linie um neutrophile Granulozyten handelt, haben Martin *et al*. mittels radioaktiver Isotopenmarkierung der Zellen nachgewiesen (107). Hierbei wurde zwischen einem zirkulierenden Neutrophilen-Pool und einem marginierten Neutrophilen-Pool differenziert. Doerschuk *et al.* (36) errechneten 1987 wiederum nach Isotopenmarkierung von Granulozyten, dass der marginierte Pool dem zirkulierenden an Größe gleichkommt und bestätigten somit ähnliche Resultate früherer Untersuchungen von Peters *et al.* (125) und Martin *et al.* (107). Auch Kübler konnte durch Bestimmung der Myeloperoxidaseaktivität im Lungengewebe zeigen, dass

die Größe des in der Lunge marginierten Granulozyten-Pools in etwa der Anzahl der zirkulierenden Granulozyten entspricht (87).

Anders als in den übrigen Organen des Körpers befinden sich damit, wenn auch in zunächst inaktivem Zustand in hoher Anzahl Zellen mit großem inflammatorischem Potential bereits am Ort, an dem sie unter pathophysiologischen Bedingungen die Entwicklung des mikrovaskulären Endothelschadens bewirken. Es kann daher angenommen werden, dass Substanzen mit primender Aktivität diese bereits physiologisch sequestrierten Granulozyten stimulieren, die dann infolge eines weiteren inflammatorischen Stimulus, wie z.B. Endotoxin mit wesentlich gesteigerter Produktion proinflammatorischer Mediatoren, sowie der verstärkten Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen und proteolytischen Enzymen reagieren. Dass Arachidonsäure zu den Substanzen mit primender Aktivität gehört, wurde durch zahlreiche Untersuchungen *in vitro* gezeigt und bereits in der vorliegenden Arbeit sowohl in der Einleitung als auch in der Dikussion unter Punkt 1.3 ausführlich erläutert. Als wohl wichtigste Wirkungen soll nochmals die Steigerung der Respiratory Burst Aktivität (69) sowie die Arachidonsäure-abhängigige verstärkte Eicosanoidproduktion hervorgehoben werden. Auch in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ist als Hinweis auf einen gesteigerten Eicosaniodstoffwechsel und damit verbunden auf die verstärkter Produktion von potent wirksamen Prostaglandinen und Leukotrienen eine signifikant erhöhte Thromboxan B_2 Konzentration im Plasma der Versuchstiere gefunden worden. Es ist bekannt, dass insbesondere Thromboxan A_2 neben vasomotorischen Effekten ebenso eine starke Aktivierung von Thrombozyten bewirkt. Andererseits ist die Produktion von Eicosanoiden nicht nur abhängig von der Stoffwechselaktivität der Granulozyten selbst, sondern die Konzentration der gebildeten Leukotriene und Prostaglandine zeigt eine Abhängigkeit vom sogenannten transzellulären Eicosanoidstoffwechsel, für den die Interaktion von Granulozyten, Thrombozyten und Endothelzellen notwendig ist. Pfister *et al*. konnte nachweisen, dass für die Metacholin-induzierte Thromboxansynthese und Vasokonstriktion in der pulmonalen Mikrozirkulation sowohl Endothelzellen als auch Thrombozyten notwendig sind (126).

Es wurde postuliert, dass Arachidonsäure von den Endothelzellen als Folge der Zellaktivierung freigesetzt wird, zu Endothel-adhärenten Thrombozyten gelangt und in den Thrombozyten durch Zyklooxygenase und Thromboxansynthase zu Thromboxan A_2 metabolisiert wird (126). Darüber hinaus konnten weitere Studien zeigen, dass stimulierte Thrombozyten Arachidonsäure und 12-Hydroxysäuren freisetzen, die von Granulozyten

absorbiert und entlang dem 5-Lipoxygenasestoffwechselweg weiter metabolisiert werden (73,104). Diese kombinierte Biokonversion von Arachidonsäure resultiert in weit höheren Leukotrienkonzentrationen als mit der Produktion der Leukotriene durch neutrophile Granulozyten alleine erreicht werden kann.

Neben der Produktion von Eicosanoiden sind Thrombozyten ebenso an der Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen beteiligt und beeinflussen durch die Freisetzung verschiedener Mediatoren, wie z.B. Serotonin oder Plättchenfaktor 4 die Eigenschaften der neutrophilen Granulozyten, d.h. Chemotaxis, Adhärenz und Phagozytose. Elektronenmikroskopische Untersuchungen konnten ausserdem nachweisen, dass aktivierte Thrombozyten sogar noch vor Neutrophilen Granulozyten in den Alveolarkapillaren retiniert werden und hierdurch ebenso auf die Lokalisation der Granulozytenretention in den Alveolarkapillaren Einfluß nehmen (8).

Aufgrund dieser Zusmammenhänge konnte angenommen werden, dass neben der Aktivität der Granulozyten und der damit verbundenen Freisetzung inflammatorischer Mediatoren auch Thrombozyten an der Aggravierung des mikrovaskulären Endothelschades nicht unerheblich beteiligt waren.

Die Rolle der Thrombozyten in der Pathophysiologie des akuten Lungenschades wird derzeit kontrovers diskutiert (73). Bislang war es nicht möglich, die Thrombozytenkinetik sowie die Interaktion der Blutplättchen mit Leukozyten und Endothelzellen als essentielle Vorrausetzung der erläutertern kombinierten Produktion inflammatorischer Mediatoren, *in vivo* direkt zu untersuchen.

3. Thrombozytenkinetik in der pulmonalen Mikrozirkulation

Aufgrund der unter 2.2.4 erläuterten pathophysiologischen Zusammenhänge ergab sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Motivation, ein neues experimentelles Modell zu etablieren, um neben Leukozyten ebenso die Kinetik von Thrombozyten sowie die Thrombozyten-Endothelinteraktion in allen Segmenten der pulmonalen Mikrozirkulation erstmals quantitativ analysieren zu können. In der Literatur liegen diesbezüglich auch während physiologischen Bedingungen keine Ergebnisse vor, so dass zunächst die Kinetik der Bluplättchen im unstimulierten Modell untersucht und grundsätzliche Unterschiede zwischen der Kinetik unstimulierter und aktivierter Thrombozyten in Arteriolen, Alveolarkapillaren und Venolen charakterisiert werden mußten.

3.1.1.1 Kinetik unstimulierter Thrombozyten

In Versuchsstudie IV wurde eine detaillierte Analyse der Thrombozytenkinetik in allen Abschnitten der pulmonalen Mikrostrombahn durchgeführt und dabei unter Berücksichtigung der Mikrohämodynamik die Fließgeschwindigkeit und das Interaktionsverhalten der Thrombozyten mit dem mikrovaskulären Endothel direkt quantitativ erfasst.

Wegen der größeren Durchmesser der untersuchten Gefäße in Studie IV im Vergleich zu den Studien II und III liegen auch die quantifizierten Parameter der Mikrohämodynamik, d.h. Erythrozytenfließgeschwindigkeit sowie Blutvolumenfluß, in Arteriolen und Venolen höher als in den Studien II und III. Bezüglich der Kinetik von Thrombozyten finden sich in der derzeitigen Literatur keine vergleichbaren Ergebnisse der Fließgeschwindigkeit sowie des Interaktionsverhaltens. Bisherige Untersuchungen der Thrombozytenkinetik in der pulmonalen Strombahn verwendeten radioaktive Zellmarkierungsverfahren (38) der Blutplättchen oder elektronenmikroskopische morphometrische Analysen (75). Beide Verfahren ermöglichen im Gegensatz zur intravitalen Fluoreszenzmikroskopie keine direkte Visualisierung und quantitative Analyse der Thrombozytenfließgeschwindigkeit sowie eine Beobachtung der Dynamik des Interaktionsverhaltens der Thrombozyten mit dem mikrovaskulären Endothel.

Sowohl in Arteriolen, Alveolarkapillaren und Venolen war die in der vorliegenden Arbeit gemessene mittlere Fließgeschwindigkeit der unstimulierten Thromboyzten nahezu identisch mit der quantifizierten mittleren Erythrozytenfließgeschwindigkeit. Entlang aller mikrovaskulärer Segmente konnte eine signifikante Korrelation zwischen Erythrozyten- und Thrombozytenfließgeschwindigkeit nachgewiesen werden. Aus der Steigung der Korrelationsgeraden (Abb. 35) von annährend 1 sowie der relativen Thrombozytenfließgeschwindigkeit von 1 kann gefolgert werden, dass sich die Geschwindigkeitsprofile von Thrombozyten und Erythrozyten in pulmonalen Arteriolen, Alveolarkapillaren und Venolen unter physiologischen Bedingungen nicht unterscheiden. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen hatten auch Tangelder *et al*. gezeigt (166), dass die Geschwindigkeitsprofile von Thrombozyten und Erythrozyten in mesenterialen Arteriolen des Kaninchens mit einem Durchmesser zwischen 17 und 32µm nicht differieren.

Den Untersuchungen von Tangelder et al. zu Folge ist die Konzentration von Thrombozyten nahe der Gefäßwand in Arteriolen signifikant höher als in Venolen. Entsprechend konnte gezeigt werden, dass in Venolen die mittlere

Thrombozytenkonzentration im Zentralstrom höher ist als im Randstrom (166). Bei Annahme eines parabolischen Geschwindigkeitprofils innerhalb eines Mikrogefäßes muß als Konequenz dieser Ergebnisse eine langsamere Thrombozytenfließgeschwindigkeit in Arteriolen im Vergleich zu Venolen angenommen werden. In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnte dies nicht bestätigt werden, da sich die Thrombozytenfließgeschwindigkeiten in Arteriolen und Venolen nicht voneinander unterschieden.

Durch Verwendung von *ex vivo* radioaktiv-markierten Thrombozyten untersuchten Doerschuk *et al.* das Verhalten von Thrombozyten während ihrer Passage durch den Pulmonalkreislauf. Bei zentralvenöser Injektion lag nach 10 minütiger Zirkulation der Anteil der in der pulmonalen Strombahn retinierten Blutplättchen in diesen Untersuchungen bei 3% (38). Aus den Ergebnissen kann gefolgert werden, dass in der Lunge nur eine sehr geringe Retention unstimulierter Thrombozyten erfolgt. In Übereinstimmung mit diesen Resultaten konnte auch in der vorliegenden Arbeit keine wesentliche Margination von Thrombozyten in der pulmonalen Mikrozirkulation beobachtet werden. Nach Injektion unstimulierter Thrombozyten konnten in Arteriolen keine adhärenten Thrombozyten am mikrovaskulären Endothel beobachtet werden, während in Alveolarkapillaren und Venolen eine sehr geringe Anzahl der Thrombozyten mit dem Endothel interagierte. Das Verhalten von Thrombozyten in der pulmonalen Mikrostrombahn unterscheidet sich damit grundlegend von Leukozyten, die bereits unter physiologischen Bedingungen in Arteriolen, Alveolarkapillaren und Venolen marginieren (35,36,77,86,87). Im Gegensatz zu Thrombozyten resultiert hieraus der bereits unter physiologischen Bedingungen große Pool marginierter Leukozyten innerhalb der Lunge. Es wäre daher nicht nur eine Interaktion der Thrombozyten mit Endothelzellen, sondern ebenso eine Interaktion der Thrombozyten mit den sequestrierten Leukozyten vorstellbar. Dennoch passieren unstimulierte Thrombozyten, vergleichbar den Erythrozyten alle Segmente der pulmonalen Mikrostrombahn ohne wesentliche Interaktion mit Leukozyten oder Endothelzellen und damit verbundener Margination.

3.1.1.2 Kinetik thrombin-aktivierter Thrombozyten

Um grundlegende Unterschiede zwischen der Kinetik unstimulierter Thrombozyten und aktivierten Thrombozyten in dem erstmals verwendten Modell zu charakterisieren, sowie die Lokalisation der Thrombozytensequestrierung zu klären, wurden fluoreszenz-markierte

Thrombozyten ex vivo mittels Thrombin stimuliert und die Kinetik der Zellen nach Reinjektion untersucht.

Thrombin gilt als eine multifunktionelle Protease, die an Lokalisationen eines Gefäßschadens produziert wird und als potenter Stimulus für Thrombozyten gilt. Werden Thrombozyten mit Thrombin aktiviert resultiert eine Veränderung der Plättchenform, eine Thrombozytenaggregation sowie eine Freisetzung der thrombozytären Granula (24). Die intrazelluläre Signaltransduktion nach Thrombinstimulation umfasst die Aktivierung des Thrombin-Rezeptor assoziierten GTP-bindenden Proteins und die nachfolgende Stimulation von Phospholipase C und Phospholipase A_2 (96). Phospholipase C bewirkt die hydrolytische Spaltung von Inositolphospholipiden. Als entscheidende Produkte entstehen 1,2-Diacylglycerol und Inositol 1,4,5-Triphosphat, die zu einer raschen Mobilisation von Calzium aus den Plättchentubuli in das Zytosol der Zellen führen. Als Konsequenz resultiert ein Verschmelzen der α-Granula mit der Plasmamembran und damit verbunden die Freisetzung diverser Proteine und verschiedener Koagulationsfaktoren (Fibrinogen, von Willebrandfaktor, Faktor V, Fibronectin). Wird darüber hinaus die innere Oberfläche der Granula nach außen präsentiert, erfolgt eine schnelle Mobilisation des Selektins GMP 140 (CD 62), das als integrales Membranprotein die Interaktion von Thrombozyten mit Leukozyten und Endothelzellen ermöglichen kann (25). Ferner bewirkt Thrombin eine strukturelle Veränderung der thrombozytären Membranintegrine wie beispielsweise von Glykoprotein IIb-IIIa. Die Konformationsänderung des Rezeptors bewirkt die Bindung von löslichem Fibrinogen, Vitronectin oder von Willebrandfaktor und ermöglicht die Aggregation der Thrombozyten (25).

In der vorliegenden Arbeit konnten sowohl wesentlich verstärkte Thrombozyten-Endothelinteraktionen als auch Thrombozytenaggregation innerhalb der pulmonalen Mikrostrombahn nach der Injektion thrombin-aktivierter Thrombozyten beobachtet werden. Sowohl die gemessenen Parameter der Makrohämodynamik als auch der Mikrohämodynamik und die berechneten intravasalen Scherraten blieben nach Injektion der aktivierten Thrombozyten unverändert. Scherkraftabhängige Mechanismen als mögliche Ursache der verstärkten Thrombozyten-Endothelinteraktion können daher ausgeschlossen werden. Als Ursache sind adhäsionsmolekül-abhängige Mechanismen wahrscheinlicher, die eher auf strukturelle Veränderungen sowie eine quantitativ gesteigerte Präsentation der thrombozyten Adhäsionsmoleküle zurückgeführt werden müssen, da die Thrombozytenaktivierung *in vitro* erfolgte und das pulmonalvaskuläre Endothel damit keiner zusätzlichen proaggregatorischen Stimulation ausgesetzt war.

Die Adhärenz der Thrombozyten am Endothel war in den vorliegenden Untersuchungen in Venolen stärker ausgeprägt als in Arteriolen, während die in Arteriolen und Venolen quantifizierten Scherraten annährend identisch waren. Eine Erklärung für das unterschiedliche Adhärenzverhalten in Arteriolen und Venolen könnte deshalb in unterschiedlichen Eigenschaften der Endotheloberfläche -insbesondere der Glycokalyx - liegen. Perry und Granger (124) konnten eine niedrigere Dichte von Immunglobulin-Adhäsionsmolekülen auf dem arteriolären Endothel im Vergleich zu venolärem Endothel in 25-35µm großen Mikrogefäßen des Katzenmesenteriums nachweisen. In einigen Organen des systemischen Kreislaufs wird zudem P-Selektin insbesondere vom venulären Endothel exprimiert. Massberg *et al*. konnten nachweisen, dass das endotheliale P-Selektin eine entscheidende Rolle bei der Thrombozytenadhärenz in postischämischen Mikrogefäßen des Mesenteriums der Maus spielt (108), jedoch findet nach Ischämie/Reperfusion in diesen Untersuchungen eine stärkere Thrombozytenadhärenz in Arteriolen als in Veolen statt. In der Endothelzelle wird P-Selektin gemeinsam mit dem von Willebrand-Faktor gespeichert (110). In der pulmonalen Mikrostrombahn wurde von Willebrand-Faktor insbesondere in pulmonalen Venolen und nur in geringem Ausmaß in Arteriolen, nicht dagegen in Alveolarkapillaren nachgewiesen (152). Hieraus kann auch in der Lunge auf eine bevorzugte venoläre Expression von P-Selektin geschlossen werden und damit die mögliche Ursache für eine gesteigerte Thrombozytenadhärenz in Venolen darstellen.

Andererseits muss in diesem Zusammenhang auch der pulmonal marginierte Leukzytenpool diskutiert werden. Kübler *et al*. (88) konnten durch den Vergleich von Arteriolen und Venolen mit einem Durchmesser zwischen 14 und 33µm bzw. 11 und 29µm zeigen, dass die Anzahl Endothel-adhärenter Leukozyten in Venolen die Anzahl der Endothel-adhärenten Leukozyten in Arteriolen annähernd um den Faktor 3,5 übersteigt. Es wäre daher vorstellbar, dass ebenso die verstärkte Interaktion zwischen Leukozyten und aktivierten Thrombozyten, beispielsweise P-Selektin vermittelt, zunächst die Geschwindigkeit der Thrombozyten reduziert und hierdurch die Margination und Adhäsion aktivierter Thrombozyten vor allem am venolären Endothel begünstigt wird.

Der größte Teil der Thrombozytensequestrierung erfolgt jedoch innerhalb der Alveolarkapillaren, insbesondere deshalb, weil die gesamte Gefäßoberfläche der Kapillaren die Gesamtoberfläche der Arteriolen und Venolen ca. um das 45-fache übertrifft (76,154).

Die kausalen Mechanismen, die der Akkumulation von aktivierten Thrombozyten in den kapillaren Netzwerken der Alveolen zugrunde liegen, sind nach wie vor unbekannt. Während Leukozyten in den Alveolarkapillaren sowohl mechanisch aufgrund der Diskrepanz von Zell- und Kapillardurchmesser sowie möglicherweise zusätzlich durch Fucoidin-sensitive Interaktionen der Leukozyten mit dem Kapillarendothel retiniert werden (35,37,89), verbietet sich die Übertragung dieser Mechanismen auf die Thrombozyten. Während Thrombozyten kleine, diskoide Zellen mit einem mittleren Durchmesser von 2-3µm darstellen, können für einen mittleren Kapillardurchmesser in der pulmonalen Mikrostrombahn 5,78 µm (67) angenommen werden. Im Gegensatz zur Retention von Leukozyten erscheinen mechanische Ursachen als Grund der Thrombozytensequestrierung in den Kapillaren daher unwahrscheinlich und es müssen für die Thrombozytenretention in den Alveolarkapillaren adhäsionsmolekül-mediierte Mechanismen postuliert werden.

Mit Hilfe des im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierten Modells erscheint es möglich -insbesondere unter pathophysiologischen Bedingungen- die Rolle der Thrombozyten sowie die Mechanismen der Thrombozyten/Endothel-Interaktion sowie der Thrombozyten/Leukozyten-Interaktion zu untersuchen. Ferner kann in nachfolgenden Studien geklärt werden, in wie weit die Infusion freier Arachidonsäure und die damit verbundene verstärkte Produktion von Thromboxan B_2 mit einer gesteigerten Adhäsion von Thrombozyten in der pulmonalen Strombahn einhergeht und dadurch neben Granulozyten möglicherweise auch Thrombozyten an der Aggravierung des endotoxin-induzierten Schadens durch Arachidonsäure beteiligt sind.

4. Konsequenzen der Untersuchungsergebnisse

Abschließend muß diskutiert werden, welche Rückschlüsse und mögliche Konsequenzen aus den Untersuchungsergebnissen der vorliegenden Arbeit in Bezug auf die eingans erläuterte klinische Problematik gezogen werden können. In ca. 5% der Fälle treten im Rahmen einer Bluttransfusion unerwünschte Nebenwirkungen auf, die aufgrund anaphylaktischer Reaktionen aber auch durch induziertes Organversagen lebensbedrohliche Ausmaße annehmen können.

Insbesondere bei der Behandlung kritisch kranker Patienten mit Blutprodukten bestehen des weiteren kontroverse Diskussionen bezüglich der bestmöglichen und risikoärmsten Transfusionsstrategie. Die Transfusion von Blut gilt als unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung eines Multiorganversganes nach schwerem Trauma (114), klinische Studien konnten darüber hinaus zeigen, dass das Alter der transfundierten Blutprodukte möglicherweise Einfluß auf die Mortalität septischer Patienten (131) sowie die Entwicklung eines posttraumatischen Multiorganversagens (184) besitzt. Als Kausalfaktor insbesondere des transfuionsassoziierten akuten Lungenversagens postulierten frühere Studien vor allem HLA- bzw. gegen Granulozyten gerichtete Antikörper, die auch komplement-vermittelt zur Aktivierung und Sequestrierung von Leukozyten in der pulmonalen Strombahn und damit zur Entwicklung *eines „Capillary leak syndroms“* führen können. Obwohl diese Organkomplikationen mit der Transfusion dieser Antikörper zumindest teilweise assoziiert werden können, bleiben die pathophysiologischen Zusammenhänge dennoch weiterhin ungeklärt, da in zahlreichen Fällen keine dieser Antikörper nachgewiesen werden können oder keine Kreuzreaktivität mit den Antigenen des Empfängers besteht.

Durch die quantitative Analyse mehrfach ungesättigter Fettsäuren in Erythrozytenkonzentraten wurde in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen, dass die stark proinflammatorische mehrfach ungesättigte freie Fettsäure Arachidonsäure in Erythrozytenkonzentraten in Abhängigkeit der Konservierungszeit akkumuliert. Da Arachidonsäure *in vitro* die Respiratory burst Aktivität der Granulozyten steigert und im tierexperimentellen Modell eine Aggravierung des akuten Lungenschadens durch Infusion freier Arachidonsäure während systemischer Inflammation hervorruft, muß Arachidonsäure als potentieller Mediator betrachtet werden, der an der Entwicklung eines Transfusions-assozierten Lungenversagens beteilgt ist.

Es kann derzeit nicht ausgeschlossen werden, dass ein Organschaden erheblich aggraviert oder induziert wird, wenn insbesondere alte Erythrozytenkonzentrate in größerer Anzahl und damit verbunden freie Arachidonsäure in biologisch relevanten Konzentrationen dem Patienten transfundiert werden. Dies scheint jedoch, wie aus dem Vergleich der tierexpermentellen Studien II und III abgeleitet werden kann, gerade dann von hoher Relevanz zu sein, wenn ein zusätzlicher inflammatorischer Stimulus vorliegt. Transfundierte freie Arachidonsäure könnte daher einen der beiden wesentlichen Stimuli im Rahemen eines „Two Hit“ Modells darstellen, dass die Induktion eines Organschadens bei Patienten mit systemischer Inflammation erklären kann. Dennoch muss zum jetzigen Zeitpunkt gefordert werden, insbesondere bei der Transfusionsstrategie zur Behandlung kritisch kranker Patienten auch das Alter der Blutkonserven zu berücksichtigen. Vor allem bei Patienten mit systemischer Inflammation sollte auf die Transfusion alter Erythrozytenkonzentrate unbedingt verzichtet werden und vorwiegend so frisch wie mögliche Konzentrate zur Therapie verwendet werden.

Unabhängig von der Bluttransfusion und damit verbundenen möglichen Organkomplikationen, können darüber hinaus pathophysiologische Überlegungen zur Entwicklung eines endotoxin-induzierten akuten Lungenschadens insbesondere aus den Ergebnissen der Studie III abgeleitet werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass freie Arachidonsäure gewisseremaßen eine „Katalysatorfunktion“ bei der Entwicklung des Endotoxin-induzierten Lungenschadens darstellt. Arachidonsäure wird auch unabhängig von einer möglichen exogenen Zufuhr endogen im Rahmen kataboler Stoffwechselvorgänge im Organismus während systemischer Inflammation freigesetzt. Hohe Arachidonsäurekonzentrationen im Plasma kritisch kranker Pantienten könnten einen prädisponierenden Faktor für die Entwicklung eines akuten Lungschandens während gramnegativer Sepsis darstellen. Die quantitative Bestimmung freier Arachidonsäure würde damit - neben anderen Parametern - eine mögliche prognostische Aussagekraft bezüglich der Entwicklung von Organkomplikationen besitzen. Die Relevanz dieser hypotetischen Überlegungen sollte in weiterführenden klinischen Studien überprüft werden.

V. Zusammenfassung

In klinischen Studien konnte eine Assoziation zwischen dem Alter transfundierter Erythrozytenkonzentrate und der Mortalität septischer Patienten sowie der Entwicklung eines posttraumatischen Multiorganversagens nachgewiesen werden. Eine pathophysiologische Schlüsselstellung nimmt hierbei der transfusions-assozierte Lungenschaden ein, dessen Pathophogenese nach wie vor nur völlig unzureichend geklärt ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, systematisch experimentell zu untersuchen, ob in diesem Zusammenhang mehrfach ungesättigte freie Fettsäuren als Mediatoren von pathophysiologischer Bedeutung sind. Zunächst wurden deshalb im zellfreien Überstand von Erythrozytenkonzentraten, die nach klinischen Routineverfahren hergestellt wurden, sowohl nach 1,5-tägiger als auch nach 35-tägiger Konservierungszeit die Konzentrationen von gesättigten sowie von einfach- und mehrfachungesättigten freien Fettsäuren mittels gaschromatographischem Analyseverfahren quantitativ gemessen. Die wesentlichen Ergebnisse waren:

1. Die Konzentration freier Fettsäuren steigt in Erythrozytenkonzentraten in Abhängigkeit der Konservierungszeit signifikant an.
2. Die proinflammatorische ϖ6-Fettsäure Arachidonsäure zeigt im Vergleich zu allen andern Fettsäuren den stärksten Konzentrationsanstieg; ihre Konzentration übertrifft die physiologische humane Plasmakonzentration um den Faktor 3,2.
3. Die Arachidonsäurekonzentration ist ausreichend, um *in vitro* die Produktion von Sauerstoffradikalen durch humane Granulozyten zu stimulieren.

Anschließend wurde eine mögliche pathophysiologische Bedeutung von Arachidonsäure hinsichtlich der Manifestation eines akuten Lungenschadens *in vivo* in Weissen Neuseeländer Kaninchen untersucht. Hierbei wurden neben Parametern der Makrohämodynamik sowie des Gasaustausches durch Implantation eines Thoraxfensters in Kombination mit intravitaler Fluoreszenzmikroskopie ebenso Veränderungen der pulmonalen Mikrohämodynamik sowie der pulmonalen Leukozyten-Endothelinteraktion analysiert.

In zwei experimentellen Studien wurden die Wirkung der Arachidonsäure per se und Effekte der Arachidonsäure während zusätzlicher experimenteller Endotoxinämie untersucht. Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefasst werden:

1. Ein erhöhtes Angebot von Arachidonsäure alleine bewirkt keine Veränderungen der Makrohämodynamik, des Gasaustausches, der pulmonalen Mikrohämodynamik sowie der Leukozytensequestrierung in der pulmonalen Mikrostrombahn.
2. Ein gesteigertes Angebot von Arachidonsäure während einer zusätzlichen proinflammatorischen Stimulation durch Endotoxin führt dagegen zu:
   - Verstärkung der arteriellen Hypotension
   - Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie
   - Steigerung der Produktion von Thromboxan A_2
   - Aggravierung des mikrovaskulären pulmonalen Endothelschadens
   - Verstärkung der interstitiellen Ödementwicklung
   - nur geringgradige Zunahme der endotoxin-induzierten pulmonalen Leukozytensequestrierung.

In der vorliegenden Arbeit wurde damit erstmals gezeigt, dass freie Arachidonsäure in Abhängigkeit der Konservierungszeit in Erythrozytenkonzentraten akkumuliert. Im Rahmen einer Massivtransfusion unter Verwendung alter Erythrozytenkonzentrate, kann dies zu einem gesteigerten Angebot an Arachidonsäure im Organsimus führen, das, wie in den tierexperimentellen Studien gezeigt werden konnte, zur Entwicklung eines akuten Lungenschadens während systemischer Inflammation prädestiniert.

Um die pathophysiologische Bedeutung von Thrombozyten in diesem speziellen Zusammenhang, sowie allgemein während der Initilaphase eines akuten Lungenschadens, detailiert in vivo in weiterführenden Studien untersuchen zu können, wurde das experimentelle Modell erweitert und erstmals *in vivo* eine quantitative Analyse der Thrombozytenkinetik und Thrombozyten/Endothel-Interaktion in allen Segmenten der pulmonalen Mikrozirkulation durchgeführt. Aus den Ergebnissen der Studie können folgende Schlüsse gezogen werden:

1. Unstimulierte Thrombozyten zeigen während ihrer Passage durch die pulmonale Mikrozirkulation in Arteriolen, Alveolarkapillaren und Venolen ein den Erythrozyten ähnliches Fließverhalten. Eine wesentliche Interaktion der Thrombozyten mit dem Gefäßendothel bzw. eine Margination von

Thrombozyten ähnlich den Leukozyten findet ohne inflammatorische Stimulation nicht statt.

2. Als Folge ihrer Margination und Interaktion mit dem Gefäßendothel ist die Fließgeschwindigkeit aktivierter Thrombozyten in allen Segmenten der pulmonalen Strombahn reduziert. Aktivierte Thrombozyten werden vor allem in Alveolarkapillaren retiniert, zeigen jedoch ebenso eine gesteigerte Adhärenz vor allem am venolären in geringerem Ausmass aber auch am arteriolären Gefäßendothel.

Das Fließverhalten unstimulierter Thrombozyten und aktivierter Thrombozyten wurde damit in dieser Arbeit in der pulmonalen Strombahn erstmals direkt in vivo charakterisiert und bildet die Grundlage weiterführender Studien, die die Mechanismen der Thrombozyten/Endothel-Interaktion in der pulmonalen Mikrozirkulation sowie die pathophysiologische Bedeutung von Blutplättchen während der Entwicklung eines akuten Lungenschades untersuchen können.

VI. Literatur

1. Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten. Bundesärtzekammer (Herausg.); Köln: Deutscher Ärzte-Verlag GmbH, 1995.

2. Bericht zur Meldung nach § 21 Transfusionsgesetz für das Jahr 1998. Paul-Ehrlich-Institut 1998.

3. Abramson SB, Leszczynska-Piziak J, Weissmann G. Arachidonic acid as a second messenger. Interactions with a GTP-binding protein of human neutrophils. J Immunol 1991:147: 231-236.

4. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. Lancet 1967:2: 319-323.

5. Baatz H, Steinbauer M, Harris AG, Krombach F. Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of rhodamine 6G. Int J Microcirc Clin Exp 1995:15: 85-91.

6. Badwey JA, Curnutte JT, Robinson JM, Berde CB, Karnovsky MJ, Karnovsky ML. Effects of free fatty acids on release of superoxide and on change of shape by human neutrophils. Reversibility by albumin. J Biol Chem 1984:259: 7870-7877.

7. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. N Engl J Med 1997:336: 1066-1071.

8. Barry BE, Crapo JD. Patterns of accumulation of platelets and neutrophils in rat lungs during exposure to 100% and 85% oxygen. Am Rev Respir Dis 1985:132: 548-555.

9. Bates EJ. Eicosanoids, fatty acids and neutrophils: their relevance to the pathophysiology of disease. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 1995:53: 75-86.

10. Bates EJ, Ferrante A, Harvey DP, Poulos A. Polyunsaturated fatty acids increase neutrophil adherence and integrin receptor expression. J Leukoc Biol 1993:53: 420-426.

11. Bates EJ, Ferrante A, Smithers L, Poulos A, Robinson BS. Effect of fatty acid structure on neutrophil adhesion, degranulation and damage to endothelial cells. Atherosclerosis 1995:116: 247-259.

12. Bayliss LE. The axial drift of the red cells when blood flows in a narrow tube. J Physiol 1959:149: 593-613.

13. Benna JE, Dang PM, Gaudry M et al. Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p67(phox) during human neutrophil activation. Regulation by protein kinase C-dependent and independent pathways. J Biol Chem 1997:272: 17204-17208.

14. Benumof JL, E.A.Wahrenbrock. Local effects of anesthetics on regional hypoxic pulmonary vasoconstriction. Anesthesiology 1975:43: 525-532.

15. Bereiter-Hahn J, K.H.Seipel, M.Voeth, J.S.Ploem. Fluorimetry of mitochondria in cells vitally stained with DASPMI or rhodamine 6G. Cell Biochem Funct 19198:1: 147-155.

16. Berger R, Goetz AE, P.Conzen, W.Brendel. FITC-markierte Erythrozyten: Verformbarkeit in-vitro und Rezirkulationin in-vivo. 9. Jahrestagung der Gesellschaft für Mikrozirkulation e.V.; Kurzmanuskripte. 1985: 173-179.

17. Berger R. Quantitative Videomikroskopie der Lungenmikrozirkulation unter positiver Druckbeatmung und alveolärer Hypoxie. Med. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 1989.

18. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. Am J Respir Crit Care Med 1994:149: 818-824.

19. Beutler E, Kuhl W. Volume control of erythrocytes during storage. The role of mannitol. Transfusion 1988:28: 353-357.

20. Bian H, Reed EF. Alloantibody-mediated class I signal transduction in endothelial cells and smooth muscle cells: enhancement by IFN-gamma and TNF-alpha. J Immunol 1999:163: 1010-1018.

21. Bierman HR, K.H.Kelly, F.L.Cordes, N.L.Petrakis, H.Kass, E.L.Shpil. The influence of respiratory movements upon the circulating leukocytes. Blood 1952:7: 533-544.

22. Biffl WL, Moore EE, Zallen G et al. Neutrophils are primed for cytotoxicity and resist apoptosis in injured patients at risk for multiple organ failure. Surgery 1999:126: 198-202.

23. Blobe GC, Khan WA, Hannun YA. Protein kinase C: cellular target of the second messenger arachidonic acid? Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 1995:52: 129-135.

24. Blockmans D, Deckmyn H, Vermylen J. Platelet activation. Blood Rev 1995:9: 143-156.

25. Body SC. Platelet activation and interactions with the microvasculature. J Cardiovasc Pharmacol 1996:27 Suppl 1: S13-25.

26. Bretz U, M.Baggliolini. Biochemical and morphological characterization of azurophilic and specific granules of human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. J Cell Biol 1974:63: 251-269.

27. Brigham KL, Meyrick B. Endotoxin and lung injury. Am Rev Respir Dis 1986:133: 913-927.

28. Bruce D. The disappearance of the leukocytes from the blood after injecton of peptone. J R Soc Med 1894: 294-299.

29. Bunting JR, T.V.Phan, E.Kamali, R.M.Dowben. Fluorescent cationic probes of mitochondria. Metrics and mechanism of interaction. Biophys J 1989:56: 979-993.

30. Burrell R. Human responses to bacterial endotoxin. Circ Shock 1994:43: 137-153.

31. Condliffe AM, Chilvers ER, Haslett C, Dransfield I. Priming differentially regulates neutrophil adhesion molecule expression/function. Immunology 1996:89: 105-111.

32. Condliffe AM, Kitchen E, Chilvers ER. Neutrophil priming: pathophysiological consequences and underlying mechanisms. Clin Sci (Colch) 1998:94: 461-471.

33. Crapo JD, Barry FE, Foscue HA, Shelburne J. Structural and biochemical changes in rat lungs occuring during exposures to lethal and adaptive doses of oxygen. Am Rev Respir Dis 1980:122: 123-143.

34. DeFouw DO, und J.Z.Shumko. Pulmonary microcirculation: Differences in endothelia of subpleural and alveolar capillaries. Microvasc Res 1986:32: 348-358.

35. Doerschuk CM. Mechanisms of leukocyte sequestration in inflamed lungs. Microcirculation 2001:8: 71-88.

36. Doerschuk CM, Allard MF, Martin BA, MacKenzie A, Autor AP, Hogg JC. Marginated pool of neutrophils in rabbit lungs. J Appl Physiol 1987:63: 1806-1815.

37. Doerschuk CM, Beyers N, Coxson HO, Wiggs B, Hogg JC. Comparison of neutrophil and capillary diameters and their relation to neutrophil sequestration in the lung. J Appl Physiol 1993:74: 3040-3045.

38. Doerschuk CM, Downey GP, Doherty DE et al. Leukocyte and platelet margination within microvasculature of rabbit lungs. J Appl Physiol 1990:68: 1956-1961.

39. Doerschuk CM, Mizgerd JP, Kubo H, Qin L, Kumasaka T. Adhesion molecules and cellular biomechanical changes in acute lung injury: Giles F. Filley Lecture. Chest 1999:116: 37S-43S.

40. Dole VP, Meinertz H. Microdetermination of long chain fatty acids in plasma and tissue. J Biol Chem 1960:235: 2995-2999.

41. Dry SM, Bechard KM, Milford EL, Churchill WH, Benjamin RJ. The pathology of transfusion-related acute lung injury. Am J Clin Pathol 1999:112: 216-221.

42. Duling BR, Damon DH. An Examination of the Measurement of Flow Heterogeneity in Striated Muscle. Circ Res 1987:60: 1-13.

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

44. Ermert L, Ermert M, Goppelt-Struebe M et al. Cyclooxygenase isoenzyme localization and mRNA expression in rat lungs. Am J Respir Cell Mol Biol 1998:18: 479-488.

45. Ermert L, Ermert M, Merkle M et al. Rat pulmonary cyclooxygenase-2 expression in response to endotoxin challenge: differential regulation in the various types of cells in the lung. Am J Pathol 2000:156: 1275-1287.

46. Ermert M, Merkle M, Mootz R, Grimminger F, Seeger W, Ermert L. Endotoxin priming of the cyclooxygenase-2-thromboxane axis in isolated rat lungs. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2000:278: L1195-L1203.

47. Evangelista V, Celardo A, Dell'Elba G et al. Platelet contribution to leukotriene production in inflammation: in vivo evidence in the rabbit. Thromb Haemost 1999:81: 442-448.

48. Fahraeus R. Die Strömungsverhältnisse und die Verteilung der Blutzellen im Gefäßsystem. Klin Wschr 1928:7: 100-106.

49. Ferguson MK, Seifert FC, Replogle RL. Leukocyte adherence in venules of rat skeletal muscle following thermal injury. Microvasc Res 1982:24: 34-41.

50. Fernandez A, Sanchez-Yague J, Martin-Valmaseda EM, Felipe A, Cabezas JA, Llanillo M. Changes in the fatty acid composition of stored erythrocytes from sheep of different ages. Mech Ageing Dev 1993:71: 189-198.

51. Fiebig E, K.Ley, K.E.Arfors. Rapid leukocyte accumulation by "spontaneous" rolling and adhesion in the exteriorized rabbit mesentery. Intensive Care Med 1991:10: 127-144.

52. Fischer LG, Hollmann MW, Horstman DJ, Rich GF. Cyclooxygenase inhibitors attenuate bradykinin-induced vasoconstriction in septic isolated rat lungs. Anesth Analg 2000:90: 625-631.

53. Fischer LG, Horstman DJ, Hahnenkamp K, Kechner NE, Rich GF. Selective iNOS inhibition attenuates acetylcholine- and bradykinin-induced vasoconstriction in lipopolysaccharide-exposed rat lungs. Anesthesiology 1999:91: 1724-1732.

54. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J Biol Chem 1957:226: 497-509.

55. Gahmberg CG, Tolvanen M, Kotovuori P. Leukocyte adhesion--structure and function of human leukocyte beta2-integrins and their cellular ligands. Eur J Biochem 1997:245: 215-232.

56. Gear ARL. Rhodamin 6G. A potent inhibitor of mitochondrial oxidative phosphorylation. J Biol Chem 1974:249: 3628-3637.

57. Ghosh S, Latimer RD, Gray BM, Harwood RJ, Oduro A. Endotoxin-induced organ injury. Crit Care Med 1993:21: S19-24.

58. Glatz JF, Borchers T, Spener F, van der Vusse GJ. Fatty acids in cell signalling: modulation by lipid binding proteins. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 1995:52: 121-127.

59. Glazier JB, Hughes JMB, Maloney JE, West JB. Measurements of capillary dimensions and blood volume in rapidly frozen lungs. J Appl Physiol 1969:26: 65.

60. Goetz AE. Quantitative Analyse der pulmonalen Mikrozirkulation. Med.Habilitationsschrift. Ludwig-Maximilians-Universität München, 1995.

61. Gogos CA, Zoumbos N, Makri M, Kalfarentzos F. Medium- and long-chain triglycerides have different effects on the synthesis of tumor necrosis factor by human mononuclear cells in patients under total parenteral nutrition. J Am Coll Nutr 1994:13: 40-44.

62. Griffin RL, Krzesicki RF, Fidler SF et al. Attenuation of oxidant-induced lung injury by 21-aminosteroids (lazaroids): correlation with the mRNA expression for E-selectin, P-selectin, ICAM-1, and VCAM-1. Environ Health Perspect 1994:102 Suppl 10: 193-200.

63. Grimminger F, Mayer K, Kiss L, Wahn H, Walmrath D, Seeger W. Synthesis of 4- and 5-series leukotrienes in the lung microvasculature challenged with Escherichia coli hemolysin: critical dependence on exogenous free fatty acid supply. Am J Respir Cell Mol Biol 1997:16: 317-324.

64. Grimminger F, Wahn H, Mayer K, Kiss L, Walmrath D, Seeger W. Impact of arachidonic versus eicosapentaenoic acid on exotonin- induced lung vascular leakage: relation to 4-series versus 5- series leukotriene generation. Am J Respir Crit Care Med 1997:155: 513-519.

65. Groh J, Kuhnle GE, Kuebler WM, Goetz AE. An experimental model for simultaneous quantitative analysis of pulmonary micro- and macrocirculation during unilateral hypoxia in vivo. Res Exp Med Berl 1992:192: 431-441.

66. Groh J, Kuhnle GE, Sckell A, Ney L, Goetz AE. Isoflurane inhibits hypoxic pulmonary vasoconstriction. An in vivo fluorescence microscopic study in rabbits. Anesthesiology 1994:81: 1436-1444.

67. Guntheroth WG, Luchtel DL, Kawabori I. Pulmonary microcirculation: tubules rather than sheet and post. J Appl Physiol 1982:53: 510-515.

68. Hanson WL, Emhardt JD, Bartek JP et al. Site of recruitment in the pulmonary microcirculation. J Appl Physiol 1989:66: 2079-2083.

69. Hardy SJ, Robinson BS, Poulos A, Harvey DP, Ferrante A, Murray AW. The neutrophil respiratory burst. Responses to fatty acids, N-formylmethionylleucylphenylalanine and phorbol ester suggest divergent signalling mechanisms. Eur J Biochem 1991:198: 801-806.

70. Harris HW, Eichbaum EB, Kane JP, Rapp JH. Detection of endotoxin in triglyceride-rich lipoproteins in vitro. J Lab Clin Med 1991:118: 186-193.

71. Harris HW, Grunfeld C, Feingold KR et al. Chylomicrons alter the fate of endotoxin, decreasing tumor necrosis factor release and preventing death. J Clin Invest 1993:91: 1028-1034.

72. Haslett C, Guthrie LA, Kopaniak MM, Johnston RBJ, Henson PM. Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide. Am J Pathol 1985:119: 101-110.

73. Heffner JE, Sahn SA, Repine JE. The role of platelets in the adult respiratory distress syndrome. Culprits or bystanders? Am Rev Respir Dis 1987:135: 482-492.

74. Heiskanen KM, Münzing S, Krombach F, Savolainen KM. Effect of linoleic acid, linoleic acid anilide, and arachidonic acid on the expression of adhesion molecules on human neutrophils. Arch Toxicol 1997:71: 627-632.

75. Helset E, Lindal S, Olsen R, Myklebust R, Jorgensen L. Endothelin-1 causes sequential trapping of platelets and neutrophils in pulmonary microcirculation in rats. Am J Physiol 1996:271: L538-46.

76. Hogg JC. Neutrophil kinetics and lung injury. Physiol Rev 1987:67: 1249-1295.

77. Hogg JC, Doerschuk CM, Wiggs B, Minshall D. Neutrophil retention during a single transit through the pulmonary circulation. J Appl Physiol 1992:73: 1683-1685.

78. Holtzman MJ. Arachidonic acid metabolism. Implications of biological chemistry for lung function and disease. Am Rev Respir Dis 1991:143: 188-203.

79. Holtzman MJ. Arachidonic acid metabolism in airway epithelial cells. Annu Rev Physiol 1992:54: 303-329.

80. Huwiler A, Pfeilschifter J. A role for protein kinase C-alpha in zymosan-stimulated eicosanoid synthesis in mouse peritoneal macrophages. Eur J Biochem 1993:217: 69-75.

81. Khan WA, Blobe GC, Hannun YA. Arachidonic acid and free fatty acids as second messengers and the role of protein kinase C. Cell Signal 1995:7: 171-184.

82. Kiefman R. In vivo Analyse der Hämodynamik und Leukozytenkinetik in der pulmonalen Mikrozirkulation nach Komplementaktivierung mit Cobra Venom Faktor. Med. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 1998.

83. Kovacs EJ. Control of IL-1 and TNFa production at the level of second messenger pathways. In: Cytokines in inflammatory diseases. Kimball E.S. Boca Raton: CRC Press, 1988: 89-107.

84. Krawiz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. Gastroenterology 1984:87: 1344-1350.

85. Kubo H, Doyle NA, Graham L, Bhagwan SD, Quinlan WM, Doerschuk CM. L- and P-selectin and CD11/CD18 in intracapillary neutrophil sequestration in rabbit lungs. Am J Respir Crit Care Med 1999:159: 267-274.

86. Kuebler WM. In-vivo Analyse der Leukozyten-Kinetik in der pulmonalen Mikrozirkulation. Med. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 1997.

87. Kuebler WM, Abels C, Schuerer L, Goetz AE. Measurement of neutrophil content in brain and lung tissue by a modified myeloperoxidase assay. Int J Microcirc Clin Exp 1996:16: 89-97.

88. Kuebler WM, Kuhnle GE, Groh J, Goetz AE. Leukocyte kinetics in pulmonary microcirculation: intravital fluorescence microscopic study. J Appl Physiol 1994:76: 65-71.

89. Kuebler WM, Kuhnle GE, Groh J, Goetz AE. Contribution of selectins to leucocyte sequestration in pulmonary microvessels by intravital microscopy in rabbits. J Physiol Lond 1997:501: 375-386.

90. Kuhnle GE. Das Mikrogefäßsystem der Lunge: Netzwerkarchitektur und Mikrohämodynamik arteriolärer Netzwerke der Kaninchenlunge unter verschiedenen alveolären Drucken. Med. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 1993.

91. Kuhnle GE, Groh J, Leipfinger FH, Kuebler WM, Goetz AE. Quantitative analysis of network architecture, and microhemodynamics in arteriolar vessel trees of the ventilated rabbit lung. Int J Microcirc Clin Exp 1993:12: 313-324.

92. Kuhnle GE, Kuebler WM, Groh J, Goetz AE. Effect of blood flow on the leukocyte-endothelium interaction in pulmonary microvessels. Am J Respir Crit Care Med 1995:152: 1221-1228.

93. Kuhnle GE, Leipfinger FH, Goetz AE. Measurement of microhemodynamics in the ventilated rabbit lung by intravital fluorescence microscopy. J Appl Physiol 1993:74: 1462-1471.

94. Kuhnle GE, Reichenspurner H, Lange T et al. Microhemodynamics and leukocyte sequestration after pulmonary ischemia and reperfusion in rabbits. J Thorac Cardiovasc Surg 1998:115: 937-944.

95. Landsteiner K. Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. Wiener klinische Wochenschrift 1901:14: 1132-1134.

96. Lapetina EG. The signal transduction induced by thrombin in human platelets. FEBS Lett 1990:268: 400-404.

97. Lee JI, Burckart GJ. Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target. J Clin Pharmacol 1998:38: 981-993.

98. Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K. Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. Am J Pathol 1993:143: 1055-1062.

99. Lien DC, Worthen GS, Capen RL et al. Neutrophil kinetics in the pulmonary microcirculation. Effects of pressure and flow in the dependent lung. Am Rev Respir Dis 1990:141: 953-959.

100. Little C, Rumsby MG. Lysis of erythrocytes from stored human blood by phospholipase C (Bacillus cereus). Biochem J 1980:188: 39-46.

101. Llanillo M, Sanchez-Yague J, Checa A, Martin-Valmaseda EM, Felipe A. Phospholipid and fatty acid composition in stored sheep erythrocytes of different densities. Exp Hematol 1995:23: 258-264.

102. Lou J, Donati YR, Juillard P et al. Platelets play an important role in TNF-induced microvascular endothelial cell pathology. Am J Pathol 1997:151: 1397-1405.

103. Malpighi M. De pulmonibus, Epistle II. Bologna, 1661, Translation by J. Young. Proc Roy Soc Med 1929:23: 7-62.

104. Marcus AJ, Broekman MJ, Safier LB et al. Formation of leukotrienes and other hydroxy acids during platelet-neutrophil interactions in vitro. Biochem Biophys Res Commun 1982:109: 130-137.

105. Markos J, Hooper RO, Kavanagh-Gray D, Wiggs B, Hogg JC. Effect of raised alveolar pressure on leukocyte retention in the human lung. J Appl Physiol 1990:69(1): 214-221.

106. Martin BA, Wiggs BR, Lee S, Hogg JC. Regional differences in neutrophil margination in dog lungs. J Appl Physiol 1987:63: 1253-1261.

107. Martin BA, Wright JL, Thommasen H, Hogg JC. Effect of pulmonary blood flow on the exchange between the circulating and marginating pool of polymorphonuclear leukocytes in dog lungs. J.Clin.Invest. 69, 1277-1285. 1982.

108. Massberg S, Enders G, Leiderer R et al. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. Blood 1998:92: 507-515.

109. Mayrovitz HN, Kang S-J, Herscovici B, Sampsell RN. Leukocyte adherence initiation in skeletal muscle capillaries and venules. Microvasc Res 1987:33: 22-34.

110. McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. GMP 140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Pallade bodies. J Clin Invest 1989:84: 92-99.

111. McLaughlin RF, W.S.Tyler, und R.O.Canada. A study of subgross pulmonary anatomy in various mammals. J Amer Med Assoc 1961:175: 149-158.

112. Meyrick B, Hislop A, Reid L. Pulmonary arteries of the normal rat: the thick walled oblique muscle segment. J Anat 1978:125: 209-221.

113. Mikawa K, Nishina K, Tamada M, Takao Y, Maekawa N, Obara H. Aminoguanidine attenuates endotoxin-induced acute lung injury in rabbits. Crit Care Med 1998:26: 905-911.

114. Moore FA, Moore EE, Sauaia A. Blood transfusion. An independent risk factor for postinjury multiple organ failure. Arch Surg 1997:132: 620-624.

115. Moroff G, Holme S, Keegan T, Heaton A. Storage of ADSOL-preserved red cells at 2.5 and 5.5 degrees C: comparable retention of in vitro properties. Vox Sang 1990:59: 136-139.

116. Murray MJ, Kumar M, Gregory TJ, Banks PL, Tazelaar HD, DeMichele SJ. Select dietary fatty acids attenuate cardiopulmonary dysfunction during acute lung injury in pigs. Am J Physiol 1995:269: H2090-9.

117. Ninomiya N, Hazeki K, Fukui Y et al. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in Fc gamma receptor signaling. J Biol Chem 1994:269: 22732-22737.

118. Nishina K, Mikawa K, Maekawa N, Takao Y, Obara H. Does early posttreatment with lidocaine attenuate endotoxin-induced acute injury in rabbits? Anesthesiology 1995:83: 169-177.

119. Nishina K, Mikawa K, Takao Y, Maekawa N, Shiga M, Obara H. ONO-5046, an elastase inhibitor, attenuates endotoxin-induced acute lung injury in rabbits. Anesth Analg 1997:84: 1097-1103.

120. Nishina K, Mikawa K, Takao Y, Obara H. Inhaled nitric oxide does not prevent endotoxin-induced lung injury in rabbits. Acta Anaesthesiol Scand 1997:41: 399-407.

121. Nolte D, Hecht R, Schmid P et al. Role of Mac-1 and ICAM-1 in ischemia-reperfusion injury in a microcirculation model of BALB/C mice. Am J Physiol 1994:267: H1320-H1328.

122. Nolte D, Schmid P, Jäger U et al. Leukocyte rolling in venules of striated muscle and skin is mediated by P-selectin, not by L-selectin. Am J Physiol 1994:267: H1637-H1642.

123. Ory PA, Goldstein IM, Kwoh EE, Clarkson SB. Characterization of polymorphic forms of Fc receptor III on human neutrophils. J Clin Invest 1989:83: 1676-1681.

124. Perry MA, Granger DN. Role of CD11/CD18 in shear rate-dependent leukocyte-endothelial cell interactions in cat mesenteric venules. J Clin Invest 1991:87: 1798-1804.

125. Peters AM, Allsop P, Stuttle AWJ, Arnot RN, Gwillian M, Hall GM. Granulocyte margination in the human lung and its response to strenuous exercise. Clin Sci 1992:82: 237-244.

126. Pfister SL, Deinhart DD, Campbell WB. Methacholine-induced contraction of rabbit pulmonary artery: role of platelet-endothelial transcellular thromboxane synthesis. Hypertension 1998:31: 206-212.

127. Popovsky MA, Davenport RD. Transfusion-related acute lung injury: femme fatale? Transfusion 2001:41: 312-315.

128. Popovsky MA, Moore SB. Diagnostic and pathogenetic considerations in transfusion-related acute lung injury. Transfusion 1985:25: 573-577.

129. Poulos A, Robinson BS, Ferrante A, Harvey DP, Hardy SJ, Murray AW. Effect of 22-32 carbon n-3 polyunsaturated fatty acids on superoxide production in human

neutrophils: synergism of docosahexaenoic acid with f-met-leu-phe and phorbol ester. Immunology 1991:73: 102-108.

130. Pries AR, T.W.Secomb, Gaehtgens P, Gross J.F. Blood flow in microvascular networks - experimental and simulation. Circ Res 1990:67: 826-834.

131. Purdy FR, Tweeddale MG, Merrick PM. Association of mortality with age of blood transfused in septic ICU patients. Can J Anaesth 1997:44: 1256-1261.

132. Rashid F, R.W.Horobin. Interaction of molecular probes with living cells and tissues. Histochemistry 1990:94: 303-308.

133. Read TE, Grunfeld C, Kumwenda Z et al. Triglyceride-rich lipoproteins improve survival when given after endotoxin in rats. Surgery 1995:117: 62-67.

134. Read TE, Grunfeld C, Kumwenda ZL et al. Triglyceride-rich lipoproteins prevent septic death in rats. J Exp Med 1995:182: 267-272.

135. Reid L, Meyrick B. Hypoxia and pulmonary vascular endothelium. In: Metabolic activities of the lung. Excerpta Medica (Ciba Foundation Symposium 78) 1980: 37-61.

136. Reid L, Meyrick B. Microcirculation: definition and organization at tissue level. Ann NY Acad Sci 1982:384: 3-20.

137. Renzi PM, Flynn JT. Endotoxin enhances arachidonic acid metabolism by cultured rabbit microvascular endothelial cells. Am J Physiol 1992:263: H1213-21.

138. Rosenthal C, Caronia C, Quinn C, Lugo N, Sagy M. A comparison among animal models of acute lung injury. Crit Care Med 1998:26: 912-916.

139. Sachs L. Angewandte Statistik. Anwendung Statistischer Methoden.Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest: Springer Verlag, 1992.

140. Sarelius IH, S.M.Mckinlay. Statistical constraints on microvascular measurements using fluorescent erythrocytes. Am J Physiol 1985:248: H577-H586.

141. Sayeed MM. Signal transduction mechanisms: pathophysiologic alterations. Host defense dysfunction in trauma schock and sepsis. Faist E, (Herausg.) Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 1993: 49-57.

142. Schachter JB, Lester DS, Alkon DL. Synergistic activation of protein kinase C by arachidonic acid and diacylglycerols in vitro: generation of a stable membrane-bound, cofactor-independent state of protein kinase C activity. Biochim Biophys Acta 1996:1291: 167-176.

143. Sellmayer A, Obermeier H, Danesch U, Aepfelbacher M, Weber PC. Arachidonic acid increases activation of NADPH oxidase in monocytic U937 cells by accelerated translocation of p47-phox and co-stimulation of protein kinase C. Cell Signal 1996:8: 397-402.

144. Sheridan BC, McIntyre RC, Jr., Moore EE, Meldrum DR, Agrafojo J, Fullerton DA. Neutrophils mediate pulmonary vasomotor dysfunction in endotoxin- induced acute lung injury. J Trauma 1997:42: 391-396.

145. Shukla SD, Coleman R, Finean JB, Michell RH. The use of phospholipase c to detect structural changes in the membranes of human erythrocytes aged by storage. Biochim Biophys Acta 1978:512: 341-349.

146. Shukla SD, Hanahan DJ. Membrane alterations in cellular aging: susceptibility of phospholipids in density (age)-separated human erythrocytes to phospholipase A2. Arch Biochem Biophys 1982:214: 335-341.

147. Silliman CC, Clay KL, Thurman GW, Johnson CA, Ambruso DR. Partial characterization of lipids that develop during the routine storage of blood and prime the neutrophil NADPH oxidase. J Lab Clin Med 1999:124: 684-694.

148. Silliman CC, Dickey WO, Paterson AJ et al. Analysis of the priming activity of lipids generated during routine storage of platelet concentrates. Transfusion 1996:36: 133-139.

149. Silliman CC, Paterson AJ, Dickey WO et al. The association of biologically active lipids with the development of transfusion-related acute lung injury: a retrospective study. Transfusion 1997:37: 719-726.

150. Silliman CC, Thurman GW, Ambruso DR. Stored blood components contain agents that prime the neutrophil NADPH oxidase through the platelet-activating-factor receptor. Vox Sang 1992:63: 133-136.

151. Silliman CC, Voelkel NF, Allard JD et al. Plasma and lipids from stored packed red blood cells cause acute lung injury in an animal model. J Clin Invest 1998:101: 1458-1467.

152. Simionescu M. Lung Endothelium: Structure - Function correlates. The Lung: Scientific foundations. Crystal RG, West JB New York: Raven Press, Ltd., 1991: 301-312.

153. Simon SI, Cherapanov V, Nadra I et al. Signaling functions of L-selectin in neutrophils: alterations in the cytoskeleton and colocalization with CD18. J Immunol 1999:163: 2891-2901.

154. Singhal S, Henderson R, Horsfield K, Harding K, Cumming G. Morphometry of the Human Pulmonary Arterial Tree. Circ Res 1973:33: 190-197.

155. Sorrentino D, Robinson RB, Kiang CL, Berk PD. At physiologic albumin/oleate concentrations oleate uptake by isolated hepatocytes, cardiac myocytes, and adipocytes is a saturable function of the unbound oleate concentration. Uptake kinetics are consistent with the conventional theory. J Clin Invest 1989:84: 1325-1333.

156. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. Cell 1994:76: 301-314.

157. Steinbauer M, Harris AG, Abels C, Messmer K. Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. Langenbecks Arch Surg 2000:385: 290-298.

158. Steinbeck MJ, Hegg GG, Karnovsky MJ. Arachidonate activation of the neutrophil NADPH-oxidase. Synergistic effects of protein phosphatase inhibitors compared with protein kinase activators. J Biol Chem 1991:266: 16336-16342.

159. Steinbeck MJ, Robinson JM, Karnovsky MJ. Activation of the neutrophil NADPH-oxidase by free fatty acids requires the ionized carboxyl group and partitioning into membrane lipid. J Leukoc Biol 1991:49: 360-368.

160. Steudel W, Kramer HJ, Degner D et al. Endotoxin priming of thromboxane-related vasoconstrictor responses in perfused rabbit lungs. J Appl Physiol 1997:83: 18-24.

161. Stremmel W, Diede HE. Fatty acid uptake by human hepatoma cell lines represents a carrier-mediated uptake process. Biochim Biophys Acta 1989:1013: 218-222.

162. Strobel GE, Wollman H. Pharmacology of anesthetic agents. Fed Proc 1969:28: 1386-1403.

163. Suchner U, Senftleben U. Immune modulation by polyunsaturated fatty acids during nutritional therapy: interactions with synthesis and effects of eicosanoids. Infusionsther Transfusionsmed 1994:21: 167-182.

164. Sweet MJ, Hume DA. Endotoxin signal transduction in macrophages. J Leukoc Biol 1996:60: 8-26.

165. Tangelder G, J., D.W.Slaaf, and R.S.Reneman. In vivo behavior of fluorescently labeled blood cells. Microcir 1987:6: 314-317.

166. Tangelder GJ, Slaaf DW, Muijtjens AM, Arts T, oude EM, Reneman RS. Velocity profiles of blood platelets and red blood cells flowing in arterioles of the rabbit mesentery. Circ Res 1986:59: 505-514.

167. Terry RJ. A thoracic window for observation of the lung in a livimg animal. Science 1939:90: 43-44.

168. Thiel M, Forst H, Peter K. Pathophysiologic and therapeutic aspects of the adult respiratory distress syndrome (ARDS). Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 1991:26: 3-11.

169. Thiel M, Zourelidis C, Peter K. The role of polymorphonuclear neutrophilic leukocytes in the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome (ARDS). Anaesthesist 1996:45: 113-130.

170. Tufano MA, Rossi F, Rossano F et al. Survival to lipopolysaccharide, cytokine release and phagocyte functions in mice treated with different total parenteral nutrition regimens. Immunopharmacol Immunotoxicol 1995:17: 493-509.

171. Veerkamp JH, Peeters RA, Maatman RG. Structural and functional features of different types of cytoplasmic fatty acid-binding proteins. Biochim Biophys Acta 1991:1081: 1-24.

172. Waddell TK, Fialkow L, Chan CK, Kishimoto TK, Downey GP. Potentiation of the oxidative burst of human neutrophils. A signaling role for L-selectin. J Biol Chem 1994:269: 18485-18491.

173. Waddell TK, Fialkow L, Chan CK, Kishimoto TK, Downey GP. Signaling functions of L-selectin. Enhancement of tyrosine phosphorylation and activation of MAP kinase. J Biol Chem 1995:270: 15403-15411.

174. Wagner WW, Jr.und L.P.Latham. Pulmonary capillary recruitment during airway hypoxia in the dog. J Appl Physiol 1975:39: 900-905.

175. Wagner WW, Jr., Filley GF. Microscopic observation of the lung in vivo. Vasc Dis 1965:2: 229-241.

176. Waitzberg DL, Bellinati Pires R, Salgado MM et al. Effect of total parenteral nutrition with different lipid emulsions of human monocyte and neutrophil functions. Nutrition 1997:13: 128-132.

177. Walzog B, Seifert R, Zakrzewicz A, Gaehtgens P, Ley K. Cross-linking of CD18 in human neutrophils induces an increase of intracellular free Ca2+, exocytosis of azurophilic granules, quantitative up-regulation of CD18, shedding of L-selectin, and actin polymerization. J Leukoc Biol 1994:56: 625-635.

178. Wearn JT, A.C.Ernstene, A.W.Bromer, J.W.Barr, W.J.German, L.J.Zschiesche. The normal behavior of pulmonary blood vessels with observations on the intermittence of the flow of blood in arterioles ans capillaries. Am J Physiol 1934:109: 236-256.

179. Welbourn CR, Young Y. Endotoxin, septic shock and acute lung injury: neutrophils, macrophages and inflammatory mediators [see comments]. Br J Surg 1992:79: 998-1003.

180. West JB, C.T., Dollery, A.Naimark. Distribution of blood flow in isolated lung: relation to vascular and alveolar pressures. J Appl Physiol 1964:19: 713-724.

181. Yang RB, Mark MR, Gray A et al. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. Nature 1998:395: 284-288.

182. Yang RB, Mark MR, Gurney AL, Godowski PJ. Signaling events induced by lipopolysaccharide-activated toll-like receptor 2. J Immunol 1999:163: 639-643.

183. Zallen G, Moore EE, Johnson JL et al. Circulating postinjury neutrophils are primed for the release of proinflammatory cytokines. J Trauma 1999:46: 42-48.

184. Zallen G, Offner PJ, Moore EE et al. Age of transfused blood is an independent risk factor for postinjury multiple organ failure. Am J Surg 1999:178: 570-572.

185. Zamora CA, Baron D, Heffner JE. Washed human platelets prevent ischemia-reperfusion edema in isolated rabbit lungs. J Appl Physiol 1991:70: 1075-1084.

186. Zimmerhackl B, Parekh N, Brinkhus H, Steinhausen M. The use of fluorescent labeled erythrocytes for intravital investigation of flow and local hematocrit in glomerular capillaries in the rat. Int J Microcirc Clin Exp 1983:2: 119-129.

VII. Bislang veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit

Folgende Teile der vorliegenden Arbeit wurden bislang als Originalia, Buchbeiträgen oder Abstracts veröffentlicht:

Originalia

M. Eichhorn, L. Ney, U. Suchner, A.E.Goetz
Einfluß von Arachidonsäure auf Mikrohämodynamik und Leukozytenadhärenz in Alveolarkapillaren während Endotoxinämie
Langenbecks Arch Chir I (Forumsband 1999): 493-497

M.E. Eichhorn, L.Ney, S. Massberg and A.E. Goetz
Platelet kinetics in the pulmonary microcirculation in vivo assessed by intravital microscopy
J Vasc Res 2002, 39:4; 330-339

U. Suchner, M. Thiel, M. Eichhorn, L.Lysenko, L. Ney, U. Senftleben, A. Goetz, K. Peter
Impact of storing time on the availability of unsaturated free fatty acids in packed red blood cells (PRBC): Implications on leukocyte function
Intended for Submission to: Transfusion

Buchbeiträge

M. Eichhorn, L. Ney, U. Suchner, A.E.Goetz
Einfluß von Arachidonsäure auf die Entwicklung des Endotoxin-induzierten akuten Lungenschadens
Research Festival `98 , Th.Demant, D.Seidel, MMV Medien & Medizin Verlag, S.205

M.E. Eichhorn, L. Ney, S. Maßberg, A.E. Goetz
Quantifizierung der Thrombozytenkinetik in der pulmonalen Mikrozirkulation
Langenbecks Arch Chir Forumsband (2000): 557-561

M.E. Eichhorn, L. Ney, S. Massberg, A.E. Goetz:
Kinetics of thrombocytes in the pulmonary microcirculation in vivo
Aktivierung des mikrovaskulären Endothel, Grundlage neuer therapeutischer Ansätze, vmd Verlag München, ISBN 3-9803367-5-1, S.91

Abstracts

M. Eichhorn, L. Ney, U. Suchner, A.E.Goetz
Impact of Arachidonic acid on microhemodynamics and leucocyte adhesion in pulmonary arterioles and venules during endotoxemia
J Vasc Res 1999;36:178

L. Ney, M. Eichhorn, S. Massberg, A.E.Goetz
Kinetics of platelets in the pulmonary microcirculation in vivo: a new model
Anesthesiology; Abstractband 1999; A720

M.E. Eichhorn, L. Ney, S. Massberg, A.E. Goetz:
Kinetics of thrombocytes in the pulmonary microcirculation in vivo
J Vasc Res 2000; 37:332

M.E. Eichhorn, L. Ney, U. Suchner, A.E. Goetz
Impact of storing time on the availability of free fatty acids in packed red blood cells (PRBC): Implications on the development of endotoxin induced acute lung injury in vivo
Int Care Med 2001; 27 Suppl. 2:145

VIII. Abschließende Bemerkung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Messmer) in der Arbeitsgruppe von Herrn Priv.-Doz. Dr. med. A. E. Goetz duchgeführt.

Nach Beendigung der Arbeit gilt mein besonderer Dank:

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Messmer für die freundliche Aufnahme am Institut für Chirurgische Forschung, für seine Anregungen und Ratschläge und seine stets konstruktive Kritik. Sein wissenschaftlicher Anspruch und seine Exaktheit werden mir in Zukunft Vorbild und Ansporn bleiben.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. A. E. Goetz für die Aufnahme in sein Team, die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit und für das in mich gesetzte Vertrauen. Ihm verdanke ich die wesentliche Grundlagen wissenschaftlichen Denken und Handelns, die ich in seiner Arbeitsgruppe in einzigartiger Atmosphäre erlernen durfte. Seine Begeisterungsfähigkeit und sein persönliches Engagement verhalfen nicht selten in aussichtsloser Situation zu neuer Motivation und Freude am experimentellen Arbeiten. Für seine fortwährende Unterstützung weit über die Belange dieser Arbeit hinaus danke ich ihm sehr herzlich.

Herrn Dr. med. L. Ney für seinen persönlichen Einsatz bei der praktischen Durchführung der Versuche, für seine aktive Mithilfe und seine kompetenten fachlichen Ratschläge, die wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Dr. med. U. Suchner für die gute Zusammenarbeit bei der Untersuchung der Erythroyztenkonzentrate sowie für seine zahlreichen Ideen und hilfreichen Anregungen. Herrn Dr. hum. biol. J. Peters für die kompetente Beratung in allen statistischen Fragen, sowie Frau Silvia Münzing und Frau Aike Schropp für alle labortechnischen Arbeiten.

Meinen Teamkollegen Herrn Martin Bürkle, Herrn Kai Heckel und Herrn Dr. med. Sasha Pahernik für ihre stetige Unterstützung und das außergewöhnlich kollegiale Arbeitsklima.

Den Tierpflegern des Instituts für Chirurgische Forschung, insbesonder Herrn Otto Frisch und Frau Brigitte Blount, die sich in vorbildlicher Weise um die Versorgung und Pflege der Versuchstiere kümmerten.

Nicht zuletzt danke ich ganz besonders meinen Eltern und Geschwistern für den Rückhalt in der Familie und die fortwährende Unterstützung während der Zeit des Studiums und der Durchführung der Promotion.

IX. Lebenslauf

Martin E. Eichhorn

Geburtsdatum:	2. September 1974 in Müchen
Eltern:	Ingeborg Eichhorn, geb. Hoheisel Edelbert Eichhorn, Diplomingeniuer
Geschwister:	Dipl.-Inf. Thomas Eichhorn Stefan Eichhorn, Studium des Maschinenbauwesens
Schulausbildung:	1981 – 1985: Grundschule Oberhaching 1985 - 1994: Gymnasium Oberhaching
Schulabschluss:	Abitur Juli 1994
Studium:	1994 – 2001 Studium der der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU). Im letzten Studienjahr Ableistung des Praktischen Jahres an der Chirurgischen Klinik Innenstadt (LMU, Direktor: Prof. Dr. med. Mutschler), Royal Devon & Exeter Hospital, (Departement of Internal Medicine, University of Exeter, England) und an der Klinik für Orthopädische Chirurgie, Inselspital Bern, Schweiz (Direktor: Prof. Dr. med. Ganz).
Studienabschluss:	Mai 2001
Berufliche Tätigkeit:	seit Juli 2001: wissenschaftliche Tätigkeit als Arzt im Praktikum am Institut für Chirurgische Forschung (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Messmer), sowie Nacht-und Wochenenddienste an der Chirurgischen Klinik der LMU-München, Klinikum Großhadern (Direktor: Prof. Dr. med. F.-W. Schildberg).