

Holger Listle

**Die Wirkungen von inhaliertem Lidocain auf die Inflammationsreaktion
der Lunge während experimenteller Endotoxinämie bei Ratten**



Aus der
Klinik für Anästhesiologie
Direktor: Prof. Dr. med. B. Zwißler
und dem
Institut für chirurgische Forschung im Walter Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin
Vorstand: Prof. Dr. med. U. Pohl
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Die Wirkungen von inhaliertem Lidocain auf die Inflammationsreaktion
der Lunge während experimenteller Endotoxinämie bei Ratten**

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

vorgelegt

von

Holger Listle

aus
München

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. med. B. Zwißler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Katja Radon
Prof. Dr. Matthias Siebeck

Betreuung durch die
promovierten Mitarbeitern:
Dr. med. M. Flondor
Dr. med. C. Hofstetter

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACP, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 22.01. 2009

¹HERR, du erforschest mich und kennest mich.
²Ich sitze oder stehe auf, so weißt du es, du verstehst meine Gedanken von ferne.
³Ich gehe oder liege, so bist du um mich und siehst alle meine Wege.
⁴Denn siehe, es ist kein Wort auf meiner Zunge, dass du HERR nicht schon wüßtest.
⁵Von allen Seiten umgibst du mich und hältst deine Hand über mir.
⁶Diese Erkenntnis ist mir zu wunderbar und zu hoch – ich kann sie nicht begreifen.
⁷Wohin soll ich gehen vor deinem Geist und wohin soll ich fliehen vor deinem Angesicht?
⁸Führe ich gen Himmel, so bist du da; bettete ich mich bei den Toten, siehe, so bist du auch da.
⁹Nähme ich Flügel der Morgenröte und bliebe am äußersten Meer, ¹⁰so würde auch dort deine Hand mich führen und deine Rechte mich halten.
¹¹Spräche ich: Finsternis möge mich decken und Nacht statt Licht um mich sein –
¹²So wäre auch Finsternis nicht finster bei dir, und die Nacht leuchtete wie der Tag.
Finsternis ist wie das Licht.
¹³Denn du hast meine Nieren bereitet und hast mich gebildet im Mutterleibe.
¹⁴Ich danke dir dafür, dass ich auf eine erstaunliche, ausgezeichnete Weise gemacht bin. Wunderbar sind deine Werke und meine Seele erkennt es sehr wohl.
¹⁵Es war dir mein Gebein nicht verborgen, als ich im Verborgenen gemacht wurde, als ich gebildet wurde unten in der Erde.
¹⁶Deine Augen sahen mich, als ich noch nicht bereitet war, und alle Tage waren in dein Buch geschrieben, die noch werden sollten und von denen keiner da war.
¹⁷Aber wie schwer sind für mich, Gott, deine Gedanken! Wie ist ihre Summe so groß!
¹⁸Wollte ich sie zählen, so wären sie mehr als der Sand: Am Ende bin ich noch immer bei dir. [...]
²³Erforsche mich, Gott, und erkenne mein Herz; prüfe mich und erkenne, wie ich ´s meine.
²⁴Und sieh, ob ich auf bösem Wege bin, und leite mich auf ewigem Wege.

Psalm 139

(nach Martin Luther)

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG

1.1 Klinische Bedeutung des ALI

1.2 Definition und Pathogenese des ALI

1.3 konventionelle und antiinflammatorische Therapieansätze des ALI

1.4 Struktur und Wirkmechanismen von Lokalanästhetika

1.5 Inhalationstherapie am Kleintier

1.6 Fragestellung

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere

2.2 Versuchsaufbau und Studiendesign

2.3 Experimentelle Endotoxinämie

2.4 Beatmung

2.5 Verneblungssystem

2.6 TDx-System

2.7 Broncho-alveoläre Lavage

2.8 Versuchsdurchführung

2.8.1 Anästhesie und Monitoring

2.8.2 Chirurgische Präparation

2.8.3 Versuchsprotokoll

2.8.4 Parameter

2.8.5 Lidocain Plasmakonzentrationen

2.8.6 Nitritbestimmung

2.8.7 Proteinbestimmung

2.8.8 Zytokinbestimmung in Plasma und BALF

2.9 Datenauswertung und Statistik

3 ERGEBNISSE

3.1 Parameter der Hämodynamik

3.2 Parameter der Lungenfunktion

3.3 Arterielle Blutgasanalyse

- 3.4 Blutbild
- 3.5 Nitritfreisetzung aus Alveolarmakrophagen
- 3.6 Zytokinkonzentrationen im Plasma
- 3.7 Zytokinkonzentrationen in BALF
- 3.8 Lidocainkonzentrationen im Plasma

4 DISKUSSION

4.1 Diskussion der Methodik

- 4.1.1 Tiermodell
- 4.1.2 Vernebelung
- 4.1.3 Experimentelle Endotoxinämie
- 4.1.4 Wirkspektrum von Lidocain

4.2 Diskussion der Ergebnisse

- 4.2.1 Hämodynamik
- 4.2.2 Lungenmechanik und Gasaustausch
- 4.2.3 Blutbild
- 4.2.4 Die Rolle der Alveolarmakrophagen im ALI
- 4.2.5 Nitritfreisetzung aus Alveolarmakrophagen
- 4.2.6 Zytokinkonzentrationen
 - 4.2.6.1 Zytokinkonzentrationen im Plasma
 - 4.2.6.1.1 Kinetik der Zytokinfreisetzung
 - 4.2.6.1.2 systemische Wirksamkeit von inhaliertem und intravenösem Lidocain
 - 4.2.6.2 Zytokinkonzentrationen in BALF
 - 4.2.6.2.1 Tumornekrosefaktor α
 - 4.2.6.2.2 Interleukin-1 β
 - 4.2.6.2.3 Interleukin-6
 - 4.2.6.2.4 Interferon γ
- 4.2.7 Lidocainkonzentrationen im Plasma

4.3 Stellenwert von Studienergebnissen

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

5 ZUSAMMENFASSUNG

6 VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

7 LITERATURVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG

1.1 Klinische Bedeutung des akuten Lungenschadens

Die Krankheitsbilder „*Acute Lung Injury*“ (ALI) und „*Acute Respiratory Distress Syndrome*“ (ARDS) sind zwei klinische Erscheinungsformen des akut einsetzenden Lungenschadens, im folgenden ALI bezeichnet, die sich per definitionem in ihrem Schweregrad unterscheiden. Erstmalig wurde diese akut auftretende, inflammatorische Erkrankung der Lunge 1967 von Ashbaugh et al. beschrieben (15).

Sie ist gekennzeichnet durch ein generalisiertes interstitielles und alveoläres Ödem, welches eine akute Verschlechterung des Gasaustausches und der Lungenmechanik bedingt. Zu den auslösenden Faktoren gehören zum einen direkte Schädigungen der Lunge wie Pneumonien, Aspiration von saurem Mageninhalt, maschinelle Beatmung mit hohen Drücken und Inhalationstraumen durch Inhalation von Rauch oder giftigen Gasen, zum anderen auch indirekte Schädigungen wie z.B. Sepsis, Massentransfusionen oder jede Art von Schock (226). Von den erwähnten Faktoren birgt die Sepsis das höchste Risiko für das Zustandekommen eines ALI (100).

Die Inzidenz des ALI variiert in der Literatur je nach Einschlusskriterien, Land und Studiendesign zwischen 3-80/100 000 pro Jahr (159,233). Auf Intensivstationen sind 16-18% aller beatmeten Patienten davon betroffen (128). Die intensivmedizinische Betreuung dieser Patienten ist zeit- und kostenaufwendig. Die Letalität des ALI variiert zwischen 30-55% (201) und ist damit in den letzten 30 Jahren von ursprünglich 60% nicht zufriedenstellend zurück gegangen (159). An Bedeutung gewonnen hat dieses Krankheitsbild durch die 2002/03 in Asien epidemisch aufgetretenen Fälle von SARS (= ‚*Severe Acute Respiratory Syndrome*‘), eine hoch ansteckende Erkrankung mit erheblicher Morbidität und Letalität. Ausgelöst wird SARS durch einen Coronavirus, der von infizierten Tieren auf den Menschen übertragbar ist und im Endstadium einen rasch fortschreitenden ALI auslösen kann, welcher für die hohe Letalität mitverantwortlich ist (202). Bis zum Ende der Epidemie Mitte Juni 2003 waren weltweit 8.445 Menschen erkrankt und 812 daran verstorben.

Das klinische Vollbild eines ALI äußert sich in einer Beeinträchtigung des Gasaustausches im Sinne einer respiratorischen Globalinsuffizienz. Eine maschinelle Beatmung des Patienten ist meist unumgänglich. Kommt es aufgrund eines schweren Krankheitsverlaufes zu längeren

Beatmungszeiten, erhöht dies zusätzlich das Risiko einer nosokomialen Pneumonie mit allen negativen Folgen bezüglich Morbidität und Letalität für den Patienten.

Ein weiteres Problem stellen die Defektheilungen in der Lunge dar, zu denen es nach Überwinden der akuten Krankheitsphase kommen kann und welche zu erheblichen Einschränkungen der Gesundheit und der Lebensqualität der betroffenen Patienten führen (138). Eine zufriedenstellende Therapie dieses Krankheitsbildes ist bislang noch nicht verfügbar. Diese sollte idealerweise einfach durchzuführen, effektiv, nebenwirkungsarm sowie kostengünstig sein.

1.2 Definition und Pathogenese des ALI

Gemäß der Definition der Amerikanisch-Europäischen Konsensus Konferenz aus dem Jahr 2000 (7) liegt ein ALI/ARDS vor, wenn der Krankheitsbeginn akut einsetzt, im Röntgen-Thorax bilaterale Infiltrate der Lunge nachweisbar sind, der Verschlussdruck der Pulmonalarterie nicht über 18 mmHg liegt und keine klinischen Anhaltspunkte für eine linksventrikuläre Hypertension vorliegen. Beide Krankheitsbilder unterscheiden sich klinisch per definitionem lediglich im Verhältnis von arterieller Sauerstoffsättigung (paO_2) zu inspiratorischer Sauerstoff Konzentration (FIO_2), dem Horowitz-Quotienten: für den ALI gilt ein Quotient kleiner gleich 300 torr, für das ARDS kleiner gleich 200 torr (7).

Der akute Beginn des ALI ist gekennzeichnet durch ein proteinreiches, hämorrhagisches Ödem, welches sich sowohl interstitiell als auch alveolär manifestiert. Die Ursache liegt in der Schädigung der alveolar-kapillären Barriere, welche vom Endothel der Lungenkapillaren und dem Epithel der Alveolen gebildet wird (225).

Durch den Untergang von Pneumozyten des Typ I nimmt der von ihnen gebildete Surfactantgehalt in den Alveolen ab, der Elektrolytaustausch ist beeinträchtigt und das Übertreten proteinreicher Flüssigkeit in die Alveolen wird begünstigt. Durch Präzipitation von Proteinen aus der Ödemflüssigkeit bilden sich intraalveolär sogenannte hyaline Membranen aus (225). An dem geschädigten Kapillarendothel adhären neutrophile Granulozyten und wandern in die Alveolen ein. Ortsständige Alveolarmakrophagen werden aktiviert und unterhalten die aufflammende Entzündungsreaktion ihrerseits durch die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine.

Schreitet der Krankheitsprozess weiter fort, kommt es durch einwandernde Fibroblasten zu kollagenhaltigen Umbauprozessen, die zu einer Verdickung von Intima, Endothel und Epithel führen. Dies bedingt eine starke Verengung der Alveolen bis hin zur totalen Obliteration

(209). Der Gasaustausch in den betroffenen Arealen ist stark behindert und als Konsequenz daraus entwickelt sich beim Patienten eine schwere arterielle Hypoxämie.

Der Genese des ALI liegt eine pathologische überschüssige Entzündungsreaktion der Lunge zugrunde. Dabei spielen in der Lunge selbst synthetisierte Entzündungsmediatoren, sogenannte pro-inflammatorische Zytokine eine Schlüsselrolle. In der Broncho-alveolären Lavage (BAL) von ALI-Patienten konnten erhöhte Konzentrationen dieser Zytokine (wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (9,133,141,142), Interleukin-1 β (IL-1 β) (205,215) und Interleukin-6 (IL-6) (134,142) nachgewiesen werden. Parallel dazu sind die physiologischen Gegenspieler dieser Zytokine mit anti-inflammatorischer Wirkung (wie Interleukin-10 (IL-10), löslicher TNF- α -Rezeptor (TNFsRP) (215) und Interleukin-1-Rezeptorantagonist (IRAP) (54,73)) erniedrigt.

Unter den pro-inflammatorischen Zytokinen, welche für die überschüssige Entzündungsreaktion des ALI verantwortlich sind, nehmen die genannten Zytokine eine Schlüsselrolle ein und sind daher im folgenden Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen.

Abb. 1 Pathogenese des ALI

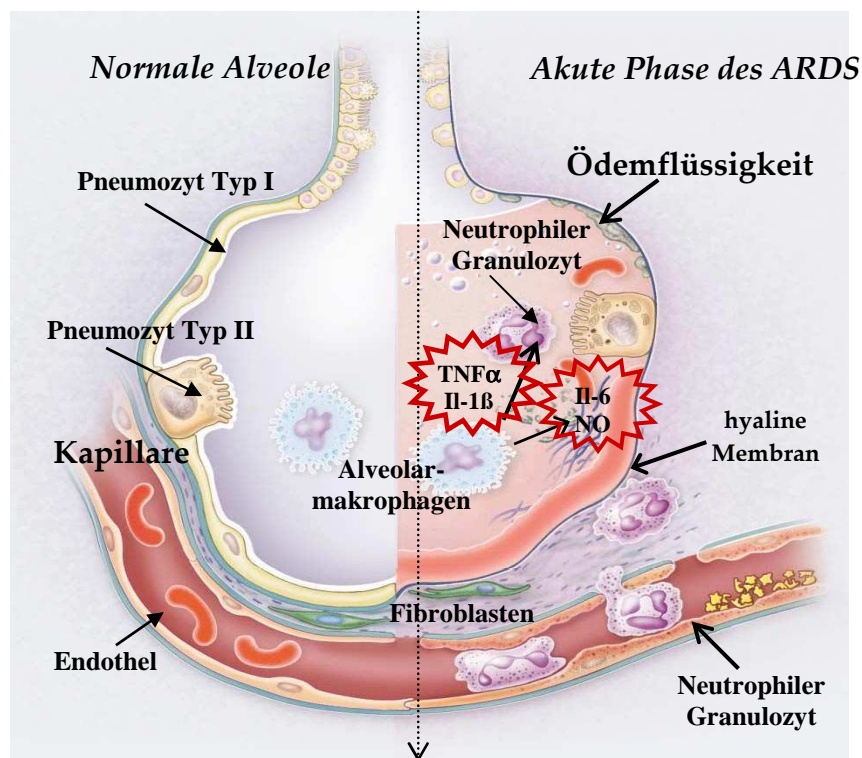


Abb.1 In der akuten Phase des ALI kommt es zum Untergang von Endothelzellen und Pneumozyten mit Ausbildung hyaliner Membranen entlang der bloßliegenden Basalmembran der Alveole. Neutrophile Granulozyten adhären an der durchlässigen Kapillarmembran, wandern durch das Interstitium in die Alveole ein, welche mit Ödemflüssigkeit gefüllt ist. Die dort befindlichen Alveolar-makrophagen setzen Zytokine frei, wodurch sie neutrophile Granulozyten lokal aktivieren oder diese chemotaktisch anlocken. Neutrophile Granulozyten ihrerseits setzen Sauerstoffradikale, Proteasen, Leukotriene und andere proinflammatorische Mediatoren frei. Fibroblasten werden ebenfalls über Zytokine zur Produktion extrazellulärer Matrix stimuliert (Fibrosierung). (modifiziert nach Ware et al. NEJM, 2000)

1.3 Konventionelle und antiinflammatorische Therapieansätze des ALI

Während innovative Ansätze zur Behandlung des ALI Gegenstand intensiver Forschung sind, beschränkt sich die klinische Behandlung der ALI-Patienten derzeit immer noch auf konventionelle Therapieformen:

Dazu gehört eine lungenprotektive Beatmung mit hohen Frequenzen und niedrigen Tidalvolumina (6 ml/kg KG), wodurch die Letalitätsrate der ALI-Patienten im Vergleich zu einem herkömmlichen Beatmungskonzept mit niedrigen Frequenzen und hohen Tidalvolumina (12-15 ml/kg KG) signifikant gesenkt werden konnte (2). Neben dem etablierten Konzept der inneren Schienung der Atemwege durch eine Beatmung mittels „*Positive End-Expiratory Pressure*“ (PEEP) zur Prophylaxe von Atelektasenbildung, wurde auch eine Substitution von Surfactant untersucht, die jedoch nur bei Säuglingen und Kindern zur Senkung der Letalität des ALI führte (126,232), nicht jedoch bei Erwachsenen (8,12). Eine zusätzliche supportive Maßnahme stellt die Umlagerung der ALI-Patienten von Rücken- in Bauchlage dar, welche in manchen Studien eine Verbesserung des Gasaustausches bewirkte (69,132) und in einer Vielzahl von Kliniken zum Einsatz kommt.

Bei den aktuellen experimentellen Therapieansätzen zur Behandlung des ALI handelte es sich vor allem um antiinflammatorische und vasodilatatorische Substanzen, die zur Erprobung kamen. Zu den getesteten Vasodilatoren gehören Prostaglandin E1 (4), Prostazyklin (184), Hydralazin (25) und Nitroprussid-Natrium (180) sowie inhalativ verabreichtes Stickstoffmonoxid (45). Trotz Teilerfolgen brachte bislang keine dieser Substanzen einen durchschlagenden klinischen Erfolg. Lediglich durch die intravenöse Gabe von aktiviertem Protein-C (APC) konnte eine Senkung der Letalität septischer Patienten erzielt werden (23), was Eingang in die klinische Praxis gefunden hat und auch Patienten zugute kommt, die aufgrund einer Sepsis einen ALI entwickeln.

Neben den erwähnten Therapieansätzen bemühte man sich bei der Behandlung des ALI schon frühzeitig um eine wirkungsvolle Hemmung der überschießenden Inflammationsreaktion der Lunge. Interessanterweise konnte durch den systemischen Einsatz der gebräuchlichsten antiinflammatorischen Medikamentengruppe, den Glukokortikoiden, keine Verbesserung des Krankheitsverlaufs erzielt werden. Weder die präventive Gabe noch der Einsatz in der akuten Phase des ALI konnte das Überleben der Patienten verbessern (22,127).

Die zentrale Rolle der proinflammatorischen Zytokine im Entstehungsprozess des ALI erkennend, galten viele Bemühungen der selektiven Blockade dieser Faktoren. Klinische

Erprobung fand die Antagonisierung von IL-1 β (63,64) und TNF- α (6,62). Diese Zytokine gelten neben IL-6 und IL-8 als Hauptfaktoren der pulmonalen Entzündungsreaktion des ALI (17,71,182,205,234). Viele dieser Ansätze lieferten im Tierexperiment vielversprechende Ergebnisse, konnten bei klinischer Erprobung die Prognose der ALI-Patienten jedoch nicht verbessern (8,58). Gründe für das Versagen der bisherigen Therapieansätze liegen womöglich in der Schwierigkeit, das Krankheitsbild ausreichend früh zu diagnostizieren, sowie in der komplexen, multifaktoriellen Pathogenese der zugrunde liegenden Inflammationsreaktion (78).

Auf der Suche nach innovativen Therapieansätzen zur Behandlung dieses Krankheitsbildes fanden auch Lokalanästhetika (LA) Berücksichtigung. Seit den 90er Jahren ist ihre hemmende Wirkung auf aktivierte humane Leukozyten und Makrophagen bekannt. Dies zeigte sich in *in vitro* Untersuchungen an mit LA inkubierten immunkompetenten Zellen (97,146), als auch in tierexperimentellen Modellen des ALI, in denen es durch intravenös gegebenes Lidocain zu einer Abschwächung des Krankheitsausmaßes kam (163,217). In dem Maße, in dem man die anti-inflammatorischen Wirkungen von LA zu verstehen begann, fanden diese zunehmend Eingang in die experimentelle Erprobung zur Behandlung des ALI (96,147,161).

1.4 Struktur und Wirkmechanismen von Lokalanästhetika

Die Substanzklasse der LA ist seit Ende des vorletzten Jahrhunderts im klinischen Gebrauch und wird vorzugsweise in der Lokal- und Regionalanästhesie sowie in der antiarrhythmischen Therapie eingesetzt. Sie werden Lokalanästhetika genannt, weil sie „lokal“, d.h. vor Ort die Entstehung und Fortleitung des Aktionspotentials in Nervenfasern (z.B. schmerzleitende C-Fasern) unterbinden. Dies geschieht durch eine reversible Blockade spannungsabhängiger Natriumkanäle.

Neben dieser Eigenschaft üben LA noch eine Vielzahl weiterer Effekte aus, welche durch die alleinige Blockade spannungsabhängiger Natriumkanäle nicht erklärbar sind. Zu den alternativen Wirkungen von LA gehören neben antiinflammatorischen Effekten auch neuroprotektive, antibakterielle (229), antivirale (43) und antithrombotische Effekte (173), sowie eine Reduzierung des Reperfusionsschaden an Gehirn, Herz und Lunge (94). Es ist belegt, dass LA *in vitro* und *in vivo* das Priming und die Aktivierung neutrophiler Granulozyten hemmen, obwohl diese keine Natriumkanäle von der Art exprimieren, die durch LA blockiert werden (119). Lidocain, ein LA vom Amidtyp, entfaltet von den untersuchten LA die ausgeprägteste Wirkung (61,97,198). Lidocain vermag *in vitro* den Signalweg von

Makrophagen und neutrophilen Granulozyten (94) und *in vivo* den der natürliche Killerzellen zu hemmen (186,197).

Auf der Suche nach dem Wirkmechanismus der LA ergaben neuere Untersuchungen, dass diese in G-Protein vermittelte Signalwege eingreifen und einen Teil ihrer inhibitorischen Wirkungen durch Interaktion mit spezifischen Untereinheiten ($G\alpha_i$, G_q) der G-Proteine entfalten (21,97). Beispiele hierfür sind das Thromboxansystem (98,99), Plättchen-aktivierender-Faktor (97), Prostaglandin E2 und die Muscarin-Rezeptoren m1 und m3. Zu den G-Proteinen, mit deren Untereinheiten LA interagieren, gehören u.a. choleratoxinsensitive und pertussistoxinsensitive G-Proteine (21).

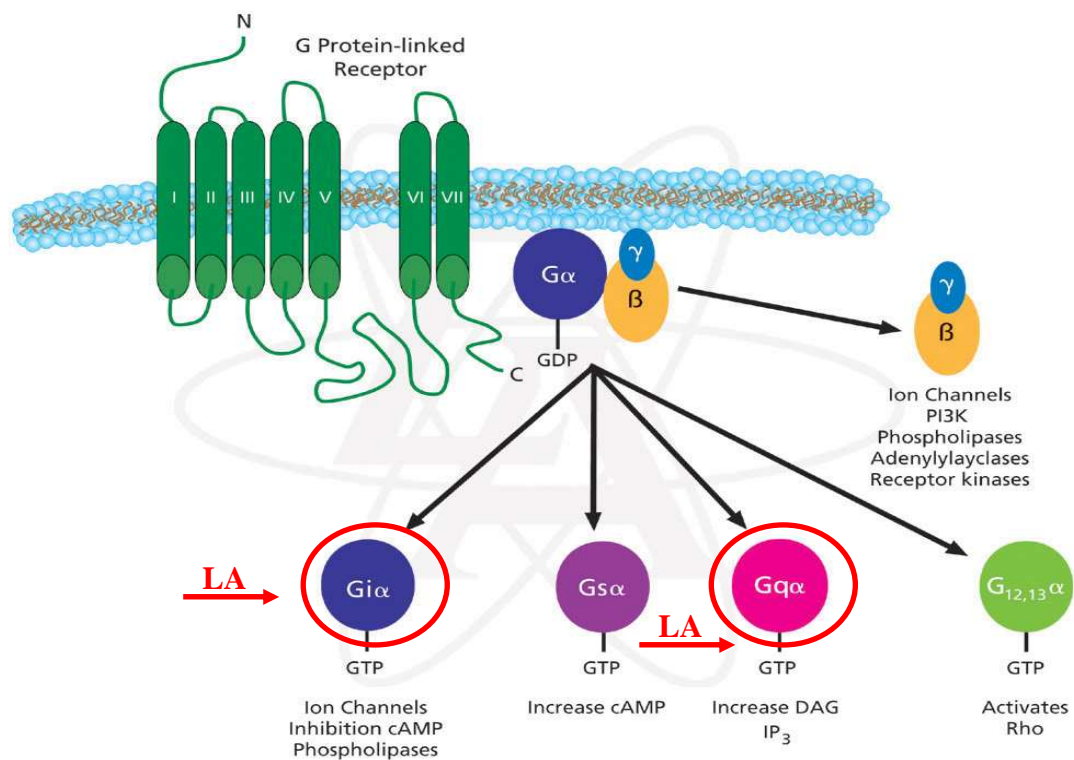


Abb.2 Wirkmechanismen der Lokalanästhetika (LA)

Darstellung eines transmembranären, G-Protein-gekoppelten Rezeptors, Pfeile deuten auf verschiedene Untereinheiten der G-Proteine ($G\alpha_i$, $G\alpha_s$, $G\alpha_q$ und $G_{12,13\alpha}$), Lokalanästhetika (LA) interagieren mit der $G\alpha_i$ - und $G\alpha_q$ -Untereinheit von G-Proteinen (Graphik modifiziert nach LeVine, 1999 (122))

Von großer Bedeutung für die klinische Praxis ist zudem die Beobachtung, dass LA ihre anti-inflammatorischen Effekte schon in Konzentrationen entfalten, die deutlich unter denen liegen, die für die Blockade spannungsabhängiger Natriumkanäle notwendig sind (96).

Neben G-Proteinen haben LA noch einen weiteren Wirkmechanismus, über den sie ihre alternativen Effekte ausüben können: in einer kürzlich veröffentlichten Studie von Hahnenkamp et al. (81) konnte der N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor als weiterer Angriffspunkt für LA identifiziert werden. Vermutlich ist die Hemmung der postoperativen Hyperalgesie durch LA auf die Interaktion mit diesem Rezeptortyp zurückzuführen.

Über welche Mechanismen LA im Einzelnen ihre Wirkungen entfalten, ist noch nicht abschließend geklärt. Auf der Suche nach innovativen Therapieoptionen zur Behandlung der pulmonalen Inflammationsreaktion rückten LA aufgrund ihrer antiinflammatorischen Eigenschaften jedoch schon vor einigen Jahren in das Blickfeld der Forschung.

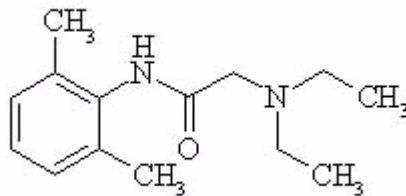


Abb.3 Strukturformel von Lidocain (Amidtyp-LA)

1.5 Inhalationstherapie am Kleintier

Die Inhalation von Pharmaka zur Behandlung verschiedener pulmonaler und bronchialer Erkrankungen ist ein etabliertes Verfahren. Für die Behandlung einer pulmonalen Inflammationsreaktion bietet es gegenüber einer systemischen Therapie verschiedene Vorteile: *via inhalationem* wird das Pharmakon direkt pulmonal deponiert und gelangt ohne Umwege an den Ort, an dem es seine maximale Wirkung entfalten soll. Durch die Inhalation werden zuerst lokal hohe Konzentrationen erreicht, bevor es zu einer Verstoffwechslung in der Leber und einem daraus möglicherweise resultierendem Wirkungsverlust kommen kann (**pulmonale Selektivität**). Zudem sind die Plasmaspiegel des eingesetzten Pharmakons nach Vernebelung vermutlich deutlich geringer, als nach derjenigen Dosis, die systemisch gegeben werden müsste, um pulmonal die gleichen Konzentrationsspiegel zu erreichen. Durch eine Inhalation lässt sich die Menge des eingesetzten Pharmakons gering halten, was die Kosten der Therapie senkt und die Wahrscheinlichkeit unerwünschter systemischer Nebenwirkungen auf ein Minimum reduziert.

Ein etabliertes Verfahren für die Inhalation löslicher Substanzen ist die Vernebelung mittels Druckluft (sog. Jet-Vernebelung) (1,153). Die Besonderheiten einer Vernebelung am Kleintier Ratte liegen an den sehr kleinen Atemzugvolumina. Hohe Spitzendrücke während der Beatmung und zu große Atemzugvolumina schädigen die Kapillaren und das Endothel, überdehnen die Alveolen und können eine pulmonale Inflammation zusätzlich verstärken (207). Weitere gefürchtete Komplikationen einer zu aggressiven Beatmung sind Barotrauma mit Ruptur der Alveolen, Pneumothorax oder Pneumomediastinum (131). Eine differenzierte Beatmung mit kleinen Atemzugvolumina, PEEP, niedrigen Spitzendrücken und permissiver Hyperkapnie gilt als *'state of the art'* in der Behandlung von Patienten mit ALI und soll die oben genannten Komplikationen vermeiden.

Mit Hilfe eines modernen neonatologischen Respirators ist dies auch für minimale Tidalvolumina (4-7ml) möglich, was für die physiologische Beatmung eines Versuchstieres von der Größe einer Ratte notwendig ist. Für die Durchführung der Versuche in der vorliegenden Studie musste allerdings parallel zu einer kontrollierten, physiologischen Beatmung der Tiere gleichzeitig auch eine Aerosolapplikation durchführbar sein. Die technische Realisierung dieser Anforderungen gelangen Hofstetter et al. (93) im Rahmen ihrer Versuche zur Erprobung des Einflusses von vernebeltem IL-10 auf die LPS-induzierte Inflamationsreaktion der Lunge in Ratten (92).

In tierexperimentellen Ansätzen des akuten Lungenschadens wurde Lidocain bisher nur systemisch verabreicht (116,147,161,163,217). Die Inhalation dieses Pharmakons stellt jedoch eine interessante Option in der Therapie des ALI dar. Der antizipierte Vorteil einer Vernebelung gegenüber der intravenösen Gabe besteht in der erhofften **pulmonalen Selektivität**: Lidocain könnte in hohen Dosen lokal appliziert werden ohne das es zu relevanten Konzentrationen im systemischen Kreislauf käme. Der erhoffte Effekt wäre ein Maximum an lokaler antiinflammatorischer Wirkung, bei einem minimalen Risiko für unerwünschte systemische Nebenwirkungen.

1.6 Fragestellung

Lidocain verfügt über potente antiinflammatorische Effekte (96,97,173). In bisher veröffentlichten Studien konnte der positive Effekt systemisch verabreichten Lidocains zur Behandlung der septischen Inflammationsreaktion der Lunge nachgewiesen werden (116,147,161,163,217). Eine Vernebelung von Lidocain zur Behandlung der LPS-induzierten pulmonalen Inflammationsreaktion bietet gegenüber der systemischen Gabe von Lidocain theoretisch mehrere Vorteile. Folgenden **Fragestellungen** wurde nachgegangen:

- Wird durch vernebeltes Lidocain die Inflammationsreaktion der Lunge nach systemischer Gabe von Endotoxin gehemmt?
- Liegen bei gleicher eingesetzter Dosis die Plasmakonzentrationen von Lidocain nach Vernebelung signifikant unter denen nach intravenöser Gabe?

Unsere **Hypothesen** lauteten:

- Eine Vernebelung von Lidocain wirkt pulmonal-selektiv auf die endotoxinbedingte Inflammationsreaktion der Lunge und senkt die Konzentration proinflammatorischer Zytokine in der BALF.
- Im Gegensatz zu einer systemischen Gabe resultieren aus der Vernebelung der gleichen Menge von Lidocain signifikant niedrigere Plasmakonzentrationen

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere

Die Studie wurde an 45 männlichen Sprague-Dawley Ratten (Charles River Zuchtanstalt/Sulzbach, Deutschland) durchgeführt. Der Median des Gewichtes betrug 630 g (Q1/Q3 = 590/660). Alle Tiere wurden gemäß den Vorgaben der gültigen Tierschutzbestimmungen im Tierstall des Institutes für Chirurgische Forschung der LMU München betreut. Die vorliegenden Untersuchungen waren zuvor von der zuständigen Kommission der Regierung von Oberbayern unter dem Geschäftszeichen 274 genehmigt worden.

2.2 Versuchsaufbau und Studiendesign

Die vorliegenden Untersuchungen waren als kontrollierte, prospektive und randomisierte Studie angelegt und wurden am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Es sollte die Wirkung der inhalativen Applikation von Lidocain auf die Inflammationsreaktion der Lunge während experimenteller Endotoxinämie in Ratten untersucht werden.

Die Tiere wurden zufällig einer von fünf Versuchsgruppen (je n = 9) zugeordnet. Zur Induktion des experimentellen Lungenschadens wurde den Tieren 5 mg/kg Endotoxin von *E. coli* (LPS, Stamm 055:B5) intravenös injiziert.

Die Therapiegruppen erhielten vernebeltes Lidocain in niedriger und hoher Dosis (geschätzte alveoläre Deposition 0,4 mg/kg und 4 mg/kg) vor und zwei Stunden nach LPS-Gabe (Lid ae 0.4 und Lid ae 4). Eine weitere Therapiegruppe erhielt Lidocain intravenös im Bolus (4 mg/kg) unmittelbar vor und zwei Stunden nach LPS-Gabe (Lid i.v. 4). Die Kontrollgruppe (Control) erhielt lediglich eine Placebo-Vernebelung mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) zu Beginn des Versuchsprotokolls und erneut im Abstand von zwei Stunden. Eine weitere Gruppe erhielt LPS 5 mg/kg nach Vernebelung von Kochsalzlösung gefolgt von einer zweiten Vernebelung im Abstand von zwei Stunden (LPS-only). Der Beobachtungszeitraum betrug fünf Stunden. Anschließend wurden die Tiere exsanguiniert und thorakotomiert.

Serumproben und Proben des BAL Überstandes (BALF) wurden bei -70°C asserviert. Aus der BAL gewonnene Alveolarmakrophagen wurden unmittelbar nach Versuchsende aufbereitet und bei 37°C bei 5% CO_2 - sowie 18% O_2 -Atmosphäre über 24 h in Nährlösung inkubiert. Anschließend wurde die NO-Produktion nach einer Methode von Ding et al. (52)

gemessen. Die Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α wurden mittels 'Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay' (ELISA) im Plasma und in der BALF gemessen.

2.3 Experimentelle Endotoxinämie

Die intravenöse Verabreichung von E. coli Endotoxin löst im Tiermodell eine akute pulmonale Inflammationsreaktion aus, die qualitativ dem ALI beim Menschen entspricht (28,92,147). Zu den im Verlauf auftretenden, laborchemisch messbaren Veränderungen zählen ein Anstieg der NO-Produktion in AM (227) sowie erhöhte Zytokinkonzentrationen in Plasma und BALF (92,147). Weitere Zeichen des ALI sind histologisch sichtbare Veränderungen der Lungenarchitektur und Beeinträchtigungen im Gasaustausch. In zahlreichen Studien wurde eine akute pulmonale Inflammationsreaktion mittels intravenöser Injektion von LPS in Ratten induziert (38,53,92,238). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind unter 4.1.3 detailliert dargestellt. In der vorliegenden Arbeit wurde die akute pulmonale Inflammationsreaktion durch intravenöse Injektion von 5 mg/kg E. coli Endotoxin (LPS; Stamm 055:B5) in männlichen Sprague-Dawley Ratten ausgelöst. Dies erfolgte nach chirurgischer Präparation über einen in der V. femoralis liegenden Katheter (Portex Non Sterile, Polythene Tubing, ID 0.42mm, SIMS Portex, England).

2.4 Beatmung

Für die Beatmung der Tiere wurde ein neonatologischer Respirator vom Typ Stephanie® (Stephan Medizintechnik, Gackebach, Deutschland) verwendet. Die Beatmung erfolgte in einem druckkontrollierten Modus mit einem Beatmungsspitzenruck von 18 cm H₂O bei einer Frequenz von 28 (IQR = 4) Atemzügen/min, einem PEEP von 4 cm H₂O und einer inspiratorischen Sauerstoffkonzentration (FiO₂) von 50%. Das Verhältnis von Inspiration zu Expiration betrug 1:2. Der Respirator verfügt über einen Lungenmessplatz zur kontinuierlichen Bestimmung der Compliance und Resistance. Die Compliance (C) ist ein Maß für die Elastizität des Atemapparates und beschreibt das Verhältnis von Volumenänderung zu der damit verbundenen Druckänderung in ml/mbar.

Die Resistance (R) ist ein Maß für den Atemwegwiderstand und beschreibt das Verhältnis der Druckdifferenz zwischen Atmosphäre und Alveole und dem pro Zeiteinheit durchströmenden Gasfluß in mbar/l/s.

2.5 Verneblungssystem

Für die Durchführung der Versuche musste eine Aerosolapplikation während kontrollierter, physiologischer Beatmung am Kleintier Ratte möglich sein. Um ein Aerosol mit optimalem Partikelspektrum zu erzeugen, sind in der Verneblungskammer bestimmte Gasströme erforderlich. Diese bewirken in einem herkömmlichen Beatmungssystem zusammen mit dem Inspirationsvolumen Spitzendrücke bzw. Volumina, die in der Lunge eines Kleintieres ein Barotrauma auslösen würden. 2004 veröffentlichten Hofstetter et al. (93) ein System zur Aerosolapplikation während kontrollierter Beatmung am Kleintier. Hierfür wurde ein Respirator verwendet, der über ein anschließbares elektronisches Gasventil verfügt, das synchron zu den Inspirationsphasen Druckluft an eine Verneblungskammer leitet. Dieses System wurde unter anderem durch den Einbau von Ventilen und weiteren Applikationen so modifiziert, dass damit die Druckluftvernebelung im Kleintier möglich ist.

Der mittlere geometrische Durchmesser der erzeugten Partikel betrug $1.96 \mu\text{m}$. Der qualitative Nachweis der intrapulmonalen Deposition des Testaerosols erfolgte durch Vernebelung fluoreszierender Mikrosphären und anschließender Fluoreszenzmikroskopie. Zur quantitativen Bestimmung der alveolären Deposition des Testaerosols (Mikrosphären) wurden nach Entnahme der Lungen die leitenden Luftwege entfernt, um ausschließlich die periphere Deposition zu erfassen (175). Nach Herauslösen des Fluoreszenzfarbstoffes durch Lösungsmittel aus den Mikrosphären wurde Fluoreszenzspektrometrisch (70) die spezifische Emission gemessen und die deponierte Menge an Mikrosphären ermittelt.

Die Analyse ergab, dass 3.8% (1,3%) der vernebelten Mikrosphären in alveolären Lungenarealen nachweisbar sind (Median (IQR)). Diese Größenordnung entspricht klinischen Befunden, denen zufolge etwa 1-3% einer mittels Druckluftvernebler applizierten Substanz am intubiert beatmeten Menschen alveoläre Bereiche erreichen (67,130). Damit kann die einzusetzende Substanzmenge zur Applikation einer bestimmten Dosis relativ präzise abgeschätzt werden.

An histologischen Präparaten der Lungen von 8 Tieren wurde nachgewiesen, dass die Vernebelung keine Schädigung im Sinne eines Barotraumas am Lungengewebe verursacht. Auch wurden Herzfrequenz, mittlerer arterieller Blutdruck, arterielle Blutgase (PaO_2 , PaCO_2) unmittelbar vor, während und 15 Minuten nach Einsatz des konstruierten Verneblers bestimmt. Die Parameter lagen dabei stets innerhalb des Normbereichs. Die Tiere wurden für die Dauer des Versuches (mit Ausnahme der Vernebelungsphase) mit einem neonatologischen Respirator druckkontrolliert beatmet, was die fortlaufende Registrierung lungenmechanischer Parameter erlaubt. Hofstetter et al. konnten nachweisen, dass das von

ihnen entwickelte Druckluftverneblersystem erstens ein suffizientes Partikelspektrum produziert, zweitens ein Testaerosol reproduzierbar alveolär deponiert, drittens keinen akuten, pulmonalen Gewebeschaden hervorruft, viertens eine suffiziente Ventilation zulässt und fünftens keinen Einfluss auf Herzfrequenz und mittleren arteriellen Blutdruck hat (93).

Für die Vernebelung des in der vorliegenden Studie verwendeten Aerosols wurde ein Jet-Vernebler mit angeschlossenem elektronischen Gasventil, gekoppelt mit einem mechanischen Respirator (Servo 900B, Siemens-Elema, Solna, Schweden) verwendet. Durch den Einbau von Ventilen und weiteren Applikationen wurde die Vernebelung am Kleintier in der oben beschriebenen Art und Weise ermöglicht.

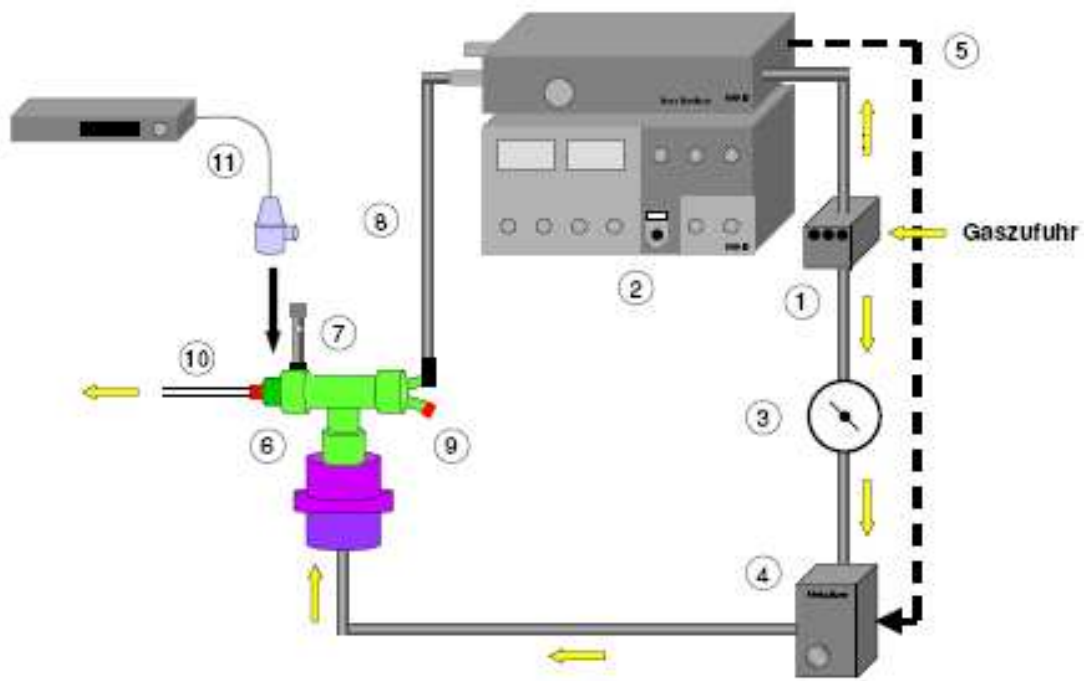


Abb.4 Schematische Darstellung des von Hofstetter et al. entwickelten Verneblersystems

(1) Gasverteiler, (2) Respirator (Siemens-Servo 900 B[®]), (3) Druckminderer (Kuhnke), (4) Nebulizer (Siemens-Nebulizer-945[®]), (5) inspiratorische Triggerung des Nebulizers, (6) T-Stück mit Vernebler-Kammer (Micro CirrusTM), (7) regelbares, mechanisches Ventil, (8) Expirationsschenkel, (9) abgekoppelter Inspirationsschenkel, (10) Trachealkanüle, (11) Atemgasanalysator (PM 8030, Dräger) (aus „Die Wirkung von inhaliertem Interleukin-10 während experimenteller Endotoxinämie der Ratte“ mit freundlicher Genehmigung von Dr. S. Högl)

In der vorliegenden Studie wurde durch Wiegen der Verneblerkammer vor und nach der Vernebelungsphase aus der Massendifferenz die Menge an vernebelter Substanz errechnet. In einer Zeit von 30 min konnte eine Menge von 0,7-0,8 ml des verwendeten Aerosols vernebelt werden.

In der Hochdosisgruppe wurde Lidocain 20% (Astra-Zeneca, Wedel, Deutschland) mit NaCl 0,9% (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) im Verhältnis von 1:1 verwendet, was bei 30 minütiger Vernebelung und 0,7-0,8 ml vernebelter Substanz einer geschätzten alveolären Deposition von 4 mg/kg KG entspricht. In der Niedrigdosisgruppe wurde Lidocain 1% (Xylocain 1%, Astra Zeneca GmbH, Wedel, Deutschland) eingesetzt, um eine alveoläre Deposition von 0,4 mg/kg zu erzielen.



Abb.5 Vernebelungsphase des Versuchs

Im Bild: narkotisiertes und mit roter Trachealkanüle intubiertes Versuchstier, grünes T-Stück mit Frischgaszuleitung (li), regelbarem, mechanischen Ventil (oben) und Verneblerkammer (lila) mit Druckluftzufuhr (von unten),

2.6 Fluoreszenzpolarisations-Immunoassay

Das TDx-System ist ein Reagenziensystem zur quantitativen Bestimmung von Lidocain in Serum oder Plasma. In der vorliegenden Studie wurde für die Messungen von Lidocain im Plasma ein kommerziell verfügbares, halbautomatisches System der Firma Abbott Diagnostics, Illinois, USA verwendet.

Die Durchführung von klinisch-chemischen Analysen mit dem TDx System basiert auf der Technik der Strahlenenergieabschwächung (REA) und den Grundprinzipien des Lambert-

Beer-Gesetzes. Das Prinzip der REA besagt, dass die gemessene Fluoreszenzintensität einer beliebigen Lösung, die einen Fluoreszenzfarbstoff enthält, zur Extinktion der Lösung proportional ist. Besitzt die Lösung eine Extinktion größer als Null, kommt es zur Abschwächung der Fluoreszenzintensität. Diese ist zur Extinktion der Lösung direkt proportional.

Durch die Verwendung von Kalibrierungsstandards besteht ein Bezug für den Vergleich der Extinktionswerte und die Berechnung der Konzentration der Testsubstanz in einer Patientenprobe. Die Fluoreszenzintensität wird vom Detektor des TDx Analyzers gemessen und mittels vorher gespeicherter Kalibrierungskurven in entsprechenden Einheiten wiedergegeben.

Eine weitere Technik, die das TDx System benutzt, ist der Fluoreszenzpolarisations-Immunoassays (FPIA). Monochromatisches Licht der Wellenlänge 485 nm wird durch einen Flüssigkristall-Polarisator geleitet und so auf einer einzigen Ebene polarisiert. Ist der Fluoreszenzfarbstoff des TDx-Ansatzes an ein sehr großes Antikörpermolekül (zu messende Substanz) gebunden bleibt die Polarisation erhalten. Bei Bindung an kleine Moleküle geht die Polarisation verloren. Der Grad der Polarisation verhält sich direkt proportional zur Molekülgröße: sie nimmt mit der Molekülgröße zu. Mittels Kalibrierungsstandards bekannter Konzentrationen des zu messenden Stoffes können genaue Beziehungen zwischen Polarisation und Konzentration in der zu analysierenden Probe hergestellt werden.

Das TDx System benutzt zudem einen Immunoassay mit kompetitiver Bindungsreaktion deren Bestandteile mit Tracer markiertes Antigen, Antigen der Patientenprobe und der Antikörper sind. Je mehr Tracer-Antigen-Komplex bei der kompetitiven Bindung an das Antikörpermolekül gebunden wird, desto weniger bleibt in der Lösung zurück. Dies ist bei Proben mit geringer Menge an Patientenantigen der Fall. Die hohe Konzentration an gebundenem Tracer in der Reaktionsmischung bewirkt eine hohe Polarisation. Für Patientenproben mit hohen Antigenkonzentrationen gilt der umgekehrte Fall. Aus den ermittelten Polarisationswerten werden die Konzentrationen des zu messenden Agens ermittelt, wobei die gespeicherte Kalibrierungskurve als Bezugspunkt dient. Diesen physikalischen Grundsätzen zufolge wurden die Messungen zur Bestimmung der Lidocainkonzentrationen im Plasma mit dem TDx (Abbott Laboratories, Illinois, USA) gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt.

2.7 Broncho-alveoläre Lavage

Für die Durchführung der Broncho-alveolären Lavage wurden die Tiere nach Versuchsende in Narkose durch Exsanguination getötet, thorakotomiert und die Lungen vorsichtig mobilisiert. Anschließend wurden die Lungen in situ mit 10 ml steriler, pyrogenfreier, phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS; Serva, Heidelberg, Deutschland) über die Trachealkanüle 10 mal gespült. Die Recovery wurde gepoolt und betrug aus 100 ml eingesetzter Lavageflüssigkeit im Median 97 ml (IQR = 1,8). Nach 10 min Zentrifugation (Hettich, Rotanta/S Zentrifuge, Wagner & Munz, München) bei 1500 U/min wurde der zellfreie BAL-Überstand (BALF) von dem Pellet getrennt und nach erneuter Zentrifugation (10 min bei 3000 U/min) für die Zytokinbestimmung bei -70°C (Hera freeze, HFC 586, Kendro, Hanau, Deutschland) asserviert. Zu dem zellhaltigen Pellet wurden vorsichtig 2 ml Kulturmedium RPMI (VLE RPMI 1640, Biochrom KG, Berlin) mit 2 mM L-Glutamin (Seromed, Berlin), 0,16 mg/ml Gentamycin (Merck, Deutschland) und 10% fetalem Rinderserum (FCS, Greiner Labortechnik, Frickenhausen) gegeben und durch vorsichtiges Schwenken eine Zellsuspension hergestellt.

Die Gesamtzellzahl dieser Suspension wurde mit Hilfe des Hemocytometers bestimmt. Aus einem Teil der Zellsuspension wurde durch Zentrifugation auf einem Objektträger (5 min bei 500 U/min, Shandon, Cytospin 2, Frankfurt) und anschließender Färbung nach Pappenheim (MayGrünwald- und Giemsalösung, Aqua dest., pH 7,2, Shandon, Varistain 4, Frankfurt) ein Zytopräparat angefertigt. Anhand morphologischer Kriterien wurde die Zahl der Alveolarmakrophagen bestimmt. Der Anteil vitaler Zellen an der Gesamtzellzahl (=Viability) wurde mittels der Trypanblaumethode (165) (1% Trypanblaulösung, Fluka AG, Neu Ulm) bestimmt. Da der Farbstoff in intakte Zellen nicht eindringen kann, entspricht die Anzahl ungefärbter Zellen/100 der Viabilität in Prozent. Für die weiteren Bestimmungen wurde die Zellsuspension auf 1×10^6 vitale Zellen/ml eingestellt.

2.8 Versuchsdurchführung

2.8.1 Anästhesie und Monitoring

Nach dem Wiegen wurde die Narkose der Tiere durch intraperitoneale Gabe von Pentobarbital (Narcoren; Pentobarbital-Natrium, Merial GmbH, Halbergmoos, 50 mg/kg) + Fentanyl (Fentanyl Dihydrogencitrat, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, 0,04 mg/kg) eingeleitet. Anschließend wurden die Tiere mit dem Rücken auf die beheizbare Platte des OP-Tisches

gelegt, welche es ermöglichte die Körpertemperatur über die gesamte Versuchsdauer konstant zwischen 37-38,5°C zu halten. Nach Tracheotomie wurden subkutane EKG Elektroden angelegt und eine geeignete Standardableitung zum Monitoring (Siemens Sirecust 404) der Herzaktivität gewählt. Die Beatmung der Tiere wurde wie unter **2.4 Beatmung** beschrieben mittels eines neonatologischen Respirators (Stephanie®) durchgeführt.

Mittels einer ebenfalls an den Monitor (Siemens Sirecust 404) angeschlossenen Sonde (Checktemp 1, Hanna, VWR international, Ismaning, Deutschland) wurde die Körpertemperatur rektal gemessen. Die Anästhesie wurde nach intraperitonealer Einleitung während der gesamten Versuchszeit über intravenöse Infusion von Pentobarbital (6 mg/kg/h) und Fentanyl (0,03 mg/kg/h) aufrechterhalten. Zusätzlich wurde Vollelektrolytlösung (Tutofusin, Baxter GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) und NaCl 0,9% (B Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) in einem Verhältnis von 1:2 und einer Rate von 10 ml/h infundiert, was dem Flüssigkeitserhaltungsbedarf der Tiere unter gegebenen Versuchsbedingungen entspricht. Die Infusion erfolgte über einen in der V. femoralis liegenden Katheter (Portex Non Sterile, Polythene Tubing, ID 0.42 mm, SIMS Portex, England) mittels Perfusor (Secura, B Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Für die arterielle Blutdruckmessung wurde ein Katheter in die A. femoralis gelegt, der über einen Druckwandler an einen Monitor (Siemens Sirecust 404) angeschlossen wurde, was die kontinuierliche Messung von systolischem, diastolischem und mittlerem arteriellen Blutdruck ermöglichte.

2.8.2 Chirurgische Präparation

Die chirurgische Präparation umfasste die Tracheotomie, sowie das Einbringen zweier flüssigkeitsgefüllter Polyurethankatheter (Portex Non Sterile, Polythene Tubing, ID 0.42 mm, SIMS Portex, England) in die zuvor frei präparierte A. und V. femoralis einer Leiste. Eine Tracheotomie wurde durchgeführt, um eine zuverlässige Beatmung ohne Leckage des zuführenden Systems und ein minimales Totraumvolumen zu garantieren. Hierfür wurde die Trachea nach Freilegung mit der Kunststoffhülle einer 13 G Kanüle intubiert und diese mit einer Ligatur um die Trachea gesichert. Die Kunststoffhülle wurde mit einem Standard Anschlussstück für pädiatrische endotracheale Tuben modifiziert, so dass der Respirator vom Typ Stephanie® und das Vernebelungsgerät problemlos angeschlossen werden konnten.

Der venöse Katheter diente der Infusion von Anästhetika, der Gabe von Volumen, LPS sowie Lidocain i.v. und bot bei Blutdruckabfällen die Möglichkeit der Intervention mittels Volumen

(HES 200/0,5 10%, Hemohep, B Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland, NaCl 0,9%, B Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland im Verhältnis 1:1) - oder der Gabe von Norepinephrin/Noradrenalin (Arterenol, Hoechst AG, Frankfurt a. M.).

Der arterielle Zugang diente der Gewinnung von Blutproben sowie der arteriellen Blutdruckmessung.



Abb. 6 Versuchsaufbau

Im Bild: OP-Tisch mit tracheotomierter und beatmeteter Ratte, subkutane EKG-Elektroden, arterieller und venöser Zugang (rechte Leiste), rektale Temperaturmessung, wärmeisolierte Beatmungsschläuche

2.8.3 Versuchsprotokoll

Alle Versuche begannen nach dem Wiegen mit der intraperitonealen Einleitung der Tiere, anschließender Tracheotomie zur kontrollierten Beatmung (P_{max} : 18 cmH_2O , PEEP: 4 cmH_2O) und Präparation der Femoralgefäße zum Einbringen der venösen und arteriellen Katheter. Nach initialer Blutgasbestimmung und Blutbildanalyse wurden sämtliche für das Versuchsprotokoll entscheidenden Daten protokolliert (Mea 1 = Messung 1). Danach wurde den Tieren der Gruppe Lid ae 4 Lidocain in hoher Dosis (4 mg/kg KG) und den Tieren der Gruppe Lid ae 0.4 Lidocain in niedriger Dosis (0,4 mg/kg KG) über 30 min vernebelt. In der

Mitte der Vernebelungszeit wurde eine weitere Blutgasanalyse durchgeführt, um eine Normoventilation trotz der Umstellung der Ventilatoren zu gewährleisten. Unmittelbar im Anschluß an die Vernebelung wurde den Tieren LPS (5 mg/kg) intravenös injiziert (Zeitpunkt „0“). In stündlichen Intervallen wurden Blutproben für Blutgasanalysen und zur Anfertigung von Differentialblutbildern abgenommen, sowie die oben genannten Vitalparameter und Parameter der Lungenfunktion protokolliert.

Um die Kinetik der Serumkonzentration von Lidocain zu bestimmen, wurden der Niedrigdosis Vernebelungsgruppe 5', 10', 30' und 60 min nach Vernebelungsstopp arterielle Blutproben abgenommen. Der Hochdosis Vernebelungsgruppe (Lid ae 4) wurden zusätzlich 120min nach Vernebelungsstopp Proben entnommen. Der Blutverlust wurde isovolumetrisch durch Hydroxyethyl Stärke (HES; Hemohe 10%, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) ersetzt. Im Falle eines arteriellen Blutdruckabfalls unter 70 mmHg wurden 2 ml HES 10% mit NaCl 0,9% im Verhältnis 1:1 intravenös verabreicht. Blieb diese Intervention zweimal hintereinander in kurzen zeitlichen Abständen (10 min) erfolglos, wurde Norepinephrin (Arterenol, Hoechst AG, Frankfurt a. M.) infundiert, um einen stabilen mittleren arteriellen Blutdruck von >80 mmHg über die gesamte Versuchszeit aufrecht zu erhalten. Kam es während der Versuchszeit zu einer kritischen Abnahme der Tidalvolumina (>1,5 ml des Ausgangswertes), wurde ein Blähmanöver der Lunge nach Lachmann durchgeführt: die Tiere wurden für kurze Zeit (1 min) mit einem stufenweise auf 22 cmH₂O gesteigertem P_{max} beatmet und der PEEP von 4- auf 8 cmH₂O erhöht. Nach einer Minute wurden PEEP und P_{max} wieder auf das Ausgangsniveau (18 cmH₂O) zurück gestellt. Eine zunehmende metabolische Azidose der Tiere wurde mit 1 ml 8,4%igem Natrium-Hydrogenkarbonat (NaBic; B. Braun Melsungen AG, Melsungen) behandelt.

Nach zwei Stunden wurden die Vernebelung und die nachfolgenden Blutentnahmen in oben geschilderter Weise wiederholt. Die Gruppe Lid i.v. 4 erhielt an Stelle der Vernebelung Lidocain intravenös im Bolus (4 mg/kg), gefolgt von intravenöser LPS-Gabe (5 mg/kg). Zur Bestimmung der Serumkonzentrationen von Lidocain nach intravenöser Gabe wurden dieser Gruppe Blutproben 1, 5, 10, 30, 60 und 120 min nach i.v.-Gabe von Lidocain entnommen. Der Blutverlust wurde wie beschrieben isovolumetrisch ersetzt. Nach zwei Stunden wurden die Lidocaininjektion und die Blutentnahmen in oben beschriebener Weise wiederholt.

Die LPS-only Gruppe erhielt nach einer Vernebelung von NaCl 0,9% (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) über 30 min lediglich LPS injiziert, sowie eine zweite Vernebelung nach zwei Stunden. In der Kontrollgruppe (Control) erfolgte lediglich die Vernebelung von NaCl 0,9% zu Beginn und zwei Stunden nach Ende der ersten Vernebelung ohne anschließende

LPS-Gabe. Um vergleichbare Bedingungen zu schaffen, wurde den Tieren der Control und LPS-only Gruppe das gleiche Blutvolumen wie den Vernebelungs-/i.v.-Tieren entnommen und isovolumetrisch ersetzt. Die Gesamtdauer der Versuche betrug ab LPS-Gabe bzw. nach Beendigung der ersten Vernebelung (Kontrollgruppe) fünf Stunden. Nach Beendigung des Versuchs wurden die Tiere unter fortgeführter Beatmung und Anästhesie durch Exsanguination getötet. Anschließend wurde wie beschrieben die Thorakotomie und BAL durchgeführt.

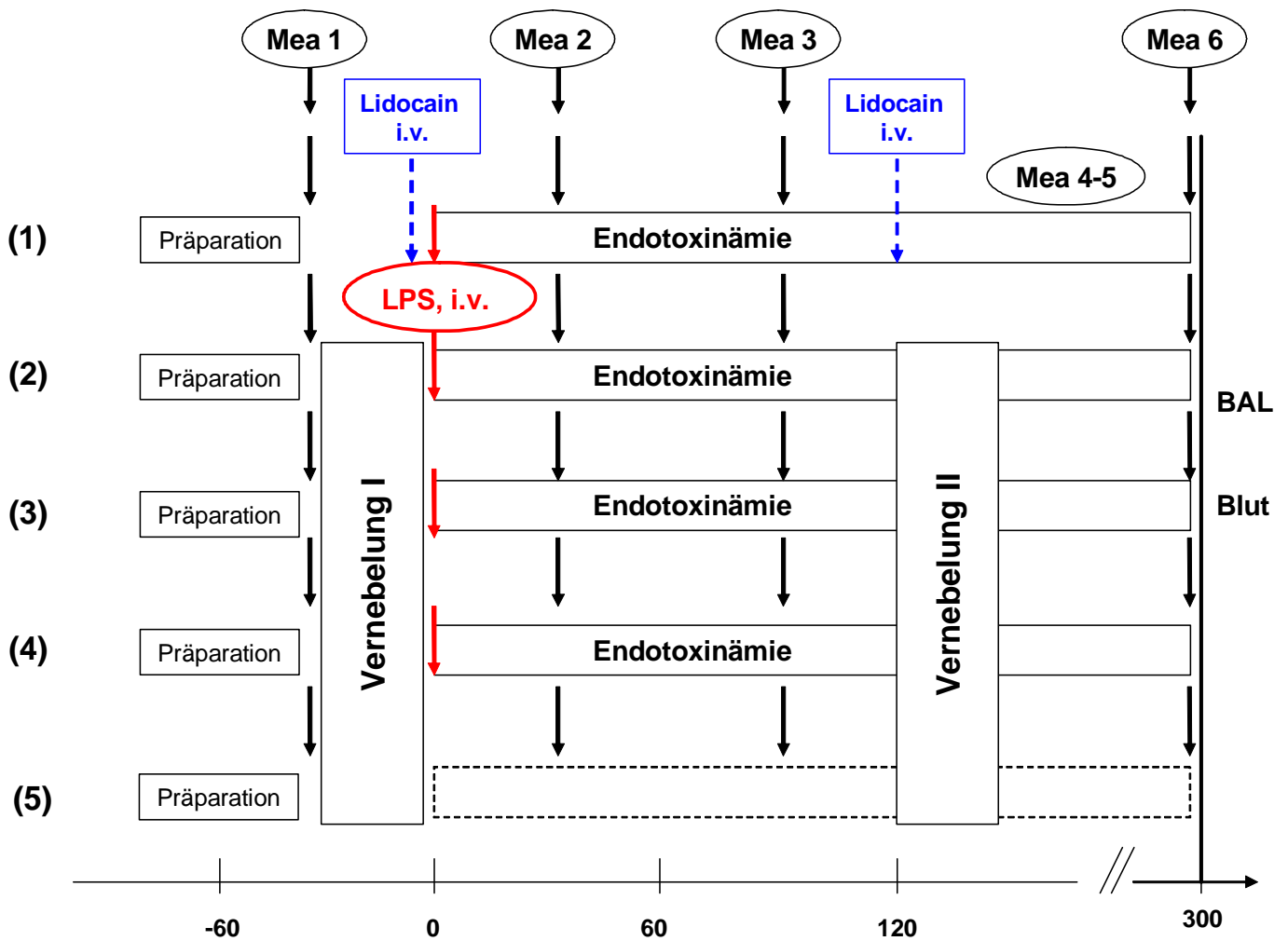


Abb. 7 Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls

Nach Abschluss der Präparation Randomisierung der Versuchsgruppen

- (1) Lid i.v.-Gruppe: i.v.-Gabe von Lidocain (4mg/kg KG) unmittelbar vor LPS-Gabe zur Induktion der Endotoxinämie, erneute Lidocain i.v.-Gabe nach 2 h,
- (2)+(3) Hoch- und Niedrigdosis Vernebelungsgruppe: 30 minütige Vernebelung von Lidocain, Induktion der Endotoxinämie mit LPS, erneute Vernebelung (30min) von Lidocain nach 2h
- (4) LPS-only-Gruppe: 30 minütige Placebo (PBS)-Vernebelung, Induktion der Endotoxinämie mit LPS, erneute Placebo-Vernebelung nach 2h
- (5) Kontrollgruppe: 30 minütige Placebo (PBS)-Vernebelung, Wiederholung nach 2h

2.8.4 Parameter

Blutgasanalysen und Differentialblutbild:

Arterielle Blutgasanalysen wurden zu definierten Zeitpunkten durchgeführt und dabei PaCO₂, PaO₂, pH-Wert, Baseexcess (BE), Elektrolyte (Na⁺, K⁺, Cl⁻) und die Konzentrationen von Laktat und Bikarbonat mit einem Blutgasanalysator bestimmt (BGA, Chiron diagnostics, Typ 860).

Aus den gleichen Proben wurden Differentialblutbilder zur Bestimmung der Zahl der Lymphozyten, segmentkernigen Granulozyten und Monozyten pro 100 Zellen erstellt. Dazu wurde der Ausstrich eines Blutropfens luftgetrocknet und für die histologische Auswertung in einem Färbebad (Shandon, Varistain 4, Frankfurt) nach Pappenheim angefärbt (MayGrünwald- und GiemsaLösung, Aqua dest. pH 7,2). Die lichtmikroskopische Auswertung erfolgte mittels Durchlichtmikroskop (Zeiss, Deutschland) durch eine geblindete MTA.

Blutdruck:

Die Messung von systolischem, diastolischem und mittlerem Blutdruck erfolgte arteriell über einen zuvor in die A. femoralis gelegten flüssigkeitsgefüllten Katheter (Portex Non sterile, Polyethene Tubing, ID 0.42 mm, SIMS Portex, England), der an einen Druckwandler mit Monitor (Siemens Sirecust 404) angeschlossen wurde.

Temperatur:

Die Temperaturmessung erfolgte rektal über eine Temperatursonde (Checktemp 1, Hanna, VWR international, Ismaning, Deutschland), deren Messdaten an einen Monitor (Siemens Siercust 404) übertragen wurden. Um eine konstante Körpertemperatur der Tiere (37,0-38,5°C) zu gewährleisten, war der Operationstisch stufenweise beheizbar. Dies erfolgte durch eine regulierbare Heizmatte unter der metallenen Auflagefläche (25x35x0,5 cm) des Tisches, der von zwei rechteckigen Plastikstützen getragen wurde (s. Abb.6).

EKG und kleines Blutbild:

Zusätzlich zu den oben aufgeführten Parametern wurde die Herzfrequenz über subkutane EKG-Elektroden Standardableitungen am Monitor gemessen (Siemens Sirecust 404). Zu definierten Zeitpunkten wurde parallel zum Differentialblutbild mittels eines Hämozytometers ein kleines Blutbild angefertigt (Coulter AC T8, Beckman-Coulter, Krefeld).

2.8.5 Lidocain Plasmakonzentrationen

Die Kinetik der Plasmakonzentrationen von Lidocain nach Inhalation und nach intravenöser Gabe wurde durch Blutabnahmen zu definierten Zeitpunkten ermittelt. Unmittelbar nach Entnahme wurden die Proben in Eppendorfreaktionsgefäßen zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge, Mikro-, 5415 C, 8000 U/min, 2 min) und das Plasma bei -30°C nach Abpipettieren asserviert (Colora UF 85-460T, Kendro, Hanau, Deutschland). Zur Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Lidocain wurde ein photometrisches Verfahren gemäß der Herstelleranleitung verwendet (TDX-FLX-Methode, TDX-System, Abbott Laboratories, Illinois, USA). Das Meßprinzip des TDX-Systems ist unter 2.6 eingehender dargestellt.

2.8.6 Nitritbestimmung

Für die Bestimmung der NO-Freisetzung durch AM wurde dessen Oxidationsprodukt Nitrit (NO_2^-) mit Hilfe der Griess-Reaktion nach einer Methode von Ding et al. (52) quantifiziert. Das von den AM freigesetzte NO_2^- wird in Gegenwart des Griess-Reagenz (100 mg 1% Sulfanilamid und 10 mg 0,1% Naphtylethylenediamid, beides Sigma Chemical CO, St. Louis und 2,5 %iger Phosphorsäure, Hausapotheke, LMU München) oxidiert und anschließend nach definiertem Zeitraum (10 min) photometrisch gemessen (Easy Reader, EAR 400 AT, SLT, Labinstruments, Österreich). Nitrit bildet mit den aromatischen Aminen des Griess-Reagenz einen Farbkomplex mit einem Absorptionsmaximum bei 550 nm, welcher photometrisch detektiert werden kann.

Dazu werden 200 000 vitale, aus der BAL gewonnene AM pro well auf einer Kulturplatte (Falcon® Ready-Stack™ Kulturplatten, Milian AG, Basel, Schweiz) ausgesät und mit Nährlösung (VLE RPMI 1640, Biochrom KG, Berlin mit 10% Fetal Bovine Serum, Greiner Labortechnik, Frickenhausen) in einem Brutschrank (Heraeus, Kendro instruments, Cytoperm 2) für 24 h bei 37°C und 5% CO_2 -Atmosphäre inkubiert. Zur Bestimmung der Nitritproduktion nach 24 h wurden jeweils 50 μl des Überstandes von der Kulturplatte abgenommen, in eine Mikrotiterplatte (96er MTP, HJ-Bioanalytik GmbH, Mönchengladbach, Deutschland) pipettiert und mit 50 μl Griess-Reagenz versetzt. Nach 10 min Inkubationszeit wurde die Absorption bei 550 nm im ELISA-Reader (EAR 400 AT, SLT, Salzburg, Österreich) gemessen. Als Standard diente eine lineare Verdünnungsreihe NO_2^- in DMEM, anhand derer die NO_2^- -Konzentration im Medium berechnet wurde. Der lineare Messbereich

liegt zwischen 0 und 100 $\mu\text{mol/L}$. Die Messungen wurden als Dreifachmessungen durchgeführt, deren Mittelwert bestimmt wurde. Um eine Aussage darüber treffen zu können, wie stark die AM der Versuchstiere in vivo durch LPS-Gabe stimuliert wurden, wurde ein Teil der gewonnenen AM vor Inkubation nochmals mittels LPS (*E. coli*, Stamm 055:B5) in vitro stimuliert.

Um die Vitalität der aus der BAL gewonnenen AM zu bestimmen, wurde ein Tropfen Trypanblau (Hausapotheke, LMU München) zu den auf einem Objektträger befindlichen AM gegeben. Lichtmikroskopisch (Zeiss, West Germany, Durchlicht Mikroskop) wurde der prozentuale Anteil blau gefärbter (avitaler) Zellen durch Auszählen von 100 AM bestimmt. Die Vitalität der Zellen lag im Median bei 94 % (IQR = 5).

2.8.7 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration der BAL wurde mit dem Bicinchoninsäure (BCA)-Ansatz (BCA = 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure), bestehend aus 1 g BCA, 2 g Natriumkarbonat, 0,16 g Natriumtartrat, 4g Natriumhydroxid und 0,95 g Natriumbikarbonat pro 100 ml wässriger Lösung bei einem pH-Wert von 11,25 nach der Methode von Smith et al. (209) bestimmt. 200 μl der BCA-Lösung und 20 μl der BAL werden gemeinsam bei 37°C für 30 min inkubiert. Anschließend wird die Absorption bei 562 nm im ELISA-Reader (EAR 400 AT, SLT, Salzburg, Österreich) gemessen. Die Proteinkonzentration der Probe wird anhand einer Standardverdünnungsreihe aus Kälberserumalbumin (Sigma) errechnet.

2.8.8 Zytokinbestimmung in Plasma und BALF

Der quantitative Nachweis von IL-1 β , IL-6, IL-10, INF γ und TNF α in BALF und Blutplasma erfolgte mittels „*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*“ (ELISA). Bei den hierfür verwendeten standardisierten ELISA-kits (Quantikine®, R&D Systems, Minneapolis, USA) handelte es sich um Sandwich-Enzym-Immunoassays: die Mikroplatte ist vorab mit einem monoklonalen Antikörper (*'capture antibody'*) beschichtet, der spezifisch gegen das zu messende Zytokin gerichtet ist. Standardisierte Mengen der Proben, Kontrollen und Standards werden auf die Mikroplatte pipettiert und das zu bestimmende Zytokin bindet an den *'capture antibody'* auf der Oberfläche der Platte. Nach dem Waschen der Platte wird ein weiterer Antikörper hinzugegeben, der mit einem Enzym gekoppelt und spezifisch gegen ein sekundäres Epitop des zu bestimmenden Zytokins gerichtet ist (*'detection antibody'*). Es

kommt zur Ausbildung eines Enzym-Antikörper-Komplexes. Nach erneutem Waschen wird eine Substratlösung hinzugegeben, welche enzymatisch in ein farbiges Produkt umgewandelt wird. Die Farbintensität wird photometrisch gemessen und ist proportional zur Menge des zu bestimmenden Zytokins, welches im ersten Schritt an die Mikroplatte gebunden hat. Anhand der Standardkurve kann die Zytokinkonzentration berechnet werden (pg/ml).

2.9 Datenauswertung und Statistik

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten wurde mit Hilfe des Statistikprogramms SigmaStat[®] 2.0 (SPSS-Jandel Scientific, Erkrath) für jeden Meßzeitpunkt (t) durchgeführt. Mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Test, welcher in die Software integriert ist, wurden die Versuchsdaten auf Normalverteilung getestet. Ein Teil der Daten war nicht normalverteilt, wie es für biometrische Daten zu erwarten war, weshalb alle Daten ausschließlich nichtparametrisch getestet wurden.

Die Daten aller Versuchsgruppen wurden mittels Kruskal-Wallis One Way ANOVA on ranks – repeated measures on ranks und anschließender post-hoc Analyse mit Hilfe des Student-Newman-Keuls Tests gegeneinander auf signifikante Unterschiede getestet. Eine Betrachtung über die Zeit wurde nicht durchgeführt, da signifikante Änderungen der biometrischen Daten (PaO₂, PaCO₂, Herzfrequenz) aufgrund der LPS-Gabe zu erwarten waren. Von vorrangigem Interesse waren die Auswirkung der Therapie zu jedem t im Vergleich zu Sepsis und Control-Gruppe und nicht die für eine isolierte Gruppe beobachteten Veränderungen über die Zeit. Die Irrtumswahrscheinlichkeit α war auf 5% festgelegt; bei $p < 0.05$ wurde die zugehörige Nullhypothese „kein Unterschied zwischen den Messzeitpunkten“ verworfen.

Die Darstellung der Ergebnisse in Abbildung 8-15 und 19 erfolgt als Median mit Interquartilsabstand (IQR; Differenz zwischen 75. und 25. Perzentile, bzw. 3. und 1. Quartil). Die t-förmigen Striche über- bzw. unterhalb des Punktes (= Median) zeigen die 75. bzw. 25. Perzentile an, entsprechend der 3. bzw. 1. Quartile.

Die Darstellung in Box-Plots (Abb. 16-18) zeigt den Median (Mittelstrich des grauen Rechtecks), sowie 75. bzw. 25. Perzentile entsprechend 3. bzw. 1. Quartile (obere bzw. untere Begrenzung des grauen Rechtecks). Das Minimum und Maximum der Gruppen wird durch t-förmige Balken („Whisker“) über- und unterhalb des Box-Plots dargestellt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Hämodynamik

Der mittlere arterielle Blutdruck (Tabelle 1) änderte sich in den einzelnen Versuchsgruppen während des Versuchszeitraumes nicht signifikant. Nach LPS-Injektion kam es bei einzelnen Tieren der endotoxämischen Gruppen zu einem Blutdruckabfall, der durch die alleinige Gabe von Volumen nicht zu kompensieren war und in der Folge die kontinuierliche Infusion von Noradrenalin erforderte. Durch diese therapeutischen Maßnahmen wurde ein dauerhaftes Absinken des MAP unter einen Wert von 80 mmHg verhindert. Es konnten keine signifikante Unterschiede im Volumen- oder Noradrenalinbedarf zwischen den endotoxämischen Gruppen festgestellt werden. Lediglich die Tiere der Kontrollgruppe benötigten zu keiner Zeit Noradrenalin.

Tabelle 1 Verlauf des mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) während des Versuchszeitraumes (Median (IQR)), Zeitpunkt 0 min: Ausgangswert, danach stündliche Messungen bis 300 min nach Versuchsbeginn, $p < 0.05$

MAP (mmHg)

Versuchsgruppe	0min	60min	120min	180min	240min	300min
Control	104 (19)	95 (20)	97 (20)	105 (15)	106 (4)	99 (20)
LPS- only	119 (20)	106 (28)	113 (17)	106 (17)	108 (8)	101 (11)
Lid i.v. 4 mg/kg	121 (34)	106 (21)	123 (15)	105 (13)	92 (21)	99(20)
Lid ae 0.4 mg/kg	126 (13)	100 (14)	111 (22)	101 (7)	101 (11)	99(11)
Lid ae 4 mg/kg	131 (40)	110 (19)	105 (22)	104 (14)	104 (18)	104 (17)

Die Herzfrequenz (Abbildung 8) blieb innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen während des Versuchszeitraumes konstant. Bei 60 min wies die Kontrollgruppe eine signifikant niedrigere Frequenz auf als LPS-only und Lid ae 4 (LPS-only: 432 (12) min⁻¹ vs. 324 (48) min⁻¹ und Lid ae 4: 432 (72) min⁻¹ vs. 324 (12) min⁻¹). Ab 120 min bis zum Versucheende war die Herzfrequenz der Kontrollgruppe signifikant niedriger als die der übrigen Gruppen. Die Werte der endotoxämischen Gruppen unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt signifikant von einander.

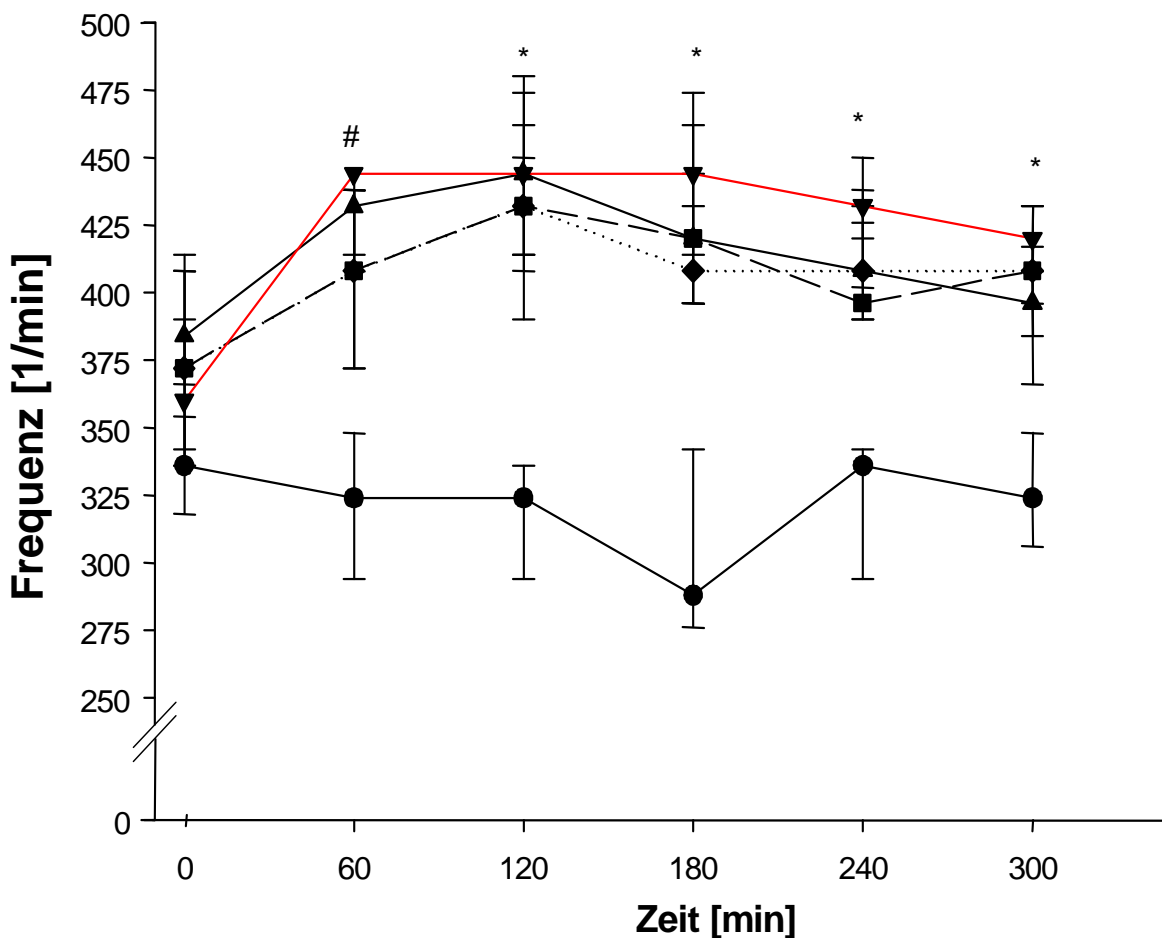


Abb. 8 Verlauf der Herzfrequenz während des Versuchszeitraumes. (Median (IQR)), Zeitpunkt 0: Ausgangswert, danach stündliche Messungen bis 300 min nach Versuchsbeginn, p<0.05, *Control vs. Gruppen; # Control vs. LPS-only und Lid ae 4

3.2 Lungenfunktion

Die beiden Lungenfunktionsparameter Resistance (R) und Compliance (C) blieben über den gesamten Versuchszeitraum konstant und wiesen keine signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen auf (Tabelle 2).

Tabelle 2 Verlauf von Resistance (R) und Compliance (C) während des Versuchszeitraumes. (Median (IQR)), p<0.05, Zeitpunkt 0 min: Ausgangswert, danach stündliche Messungen bis 300 min nach Versuchsbeginn

C (ml/mbar)

Versuchsgruppe	0min	60min	120min	180min	240min	300min
Control	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
LPS-only	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Lid i.v. 4 mg/kg	0.5	0.5	0.5	0.5	0.6	0.5
Lid ae 0.4 mg/kg	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Lid ae 4 mg/kg	0.6	0.5	0.6	0.6	0.6	0.6

R (mbar/l/s)

Versuchsgruppe	0min	60min	120min	180min	240min	300min
Control	146 (17)	136 (11)	140 (13)	141 (13)	135 (10)	138 (18)
LPS-only	152 (26)	158 (19)	148 (17)	141 (9)	141 (5)	135 (6)
Lid i.v. 4 mg/kg	148 (21)	148 (16)	149 (23)	138 (27)	141 (26)	137 (20)
Lid ae 0.4 mg/kg	145 (12)	143 (16)	148 (19)	143 (7)	141 (11)	141 (5)
Lid ae 4 mg/kg	149 (12)	150 (11)	142 (29)	143 (13)	145 (7)	147 (18)

3.3 Arterielle Blutgasanalyse

Zu den Zeitpunkten 0, 120, 180 und 300 min wies die Kontrollgruppe signifikant höhere PaO₂-Werte (Abbildung 9) auf als die endotoxämischen Gruppen. Zum Zeitpunkt 240 min lag der PaO₂ aller Gruppen signifikant über dem der Vernebelungsgruppen.

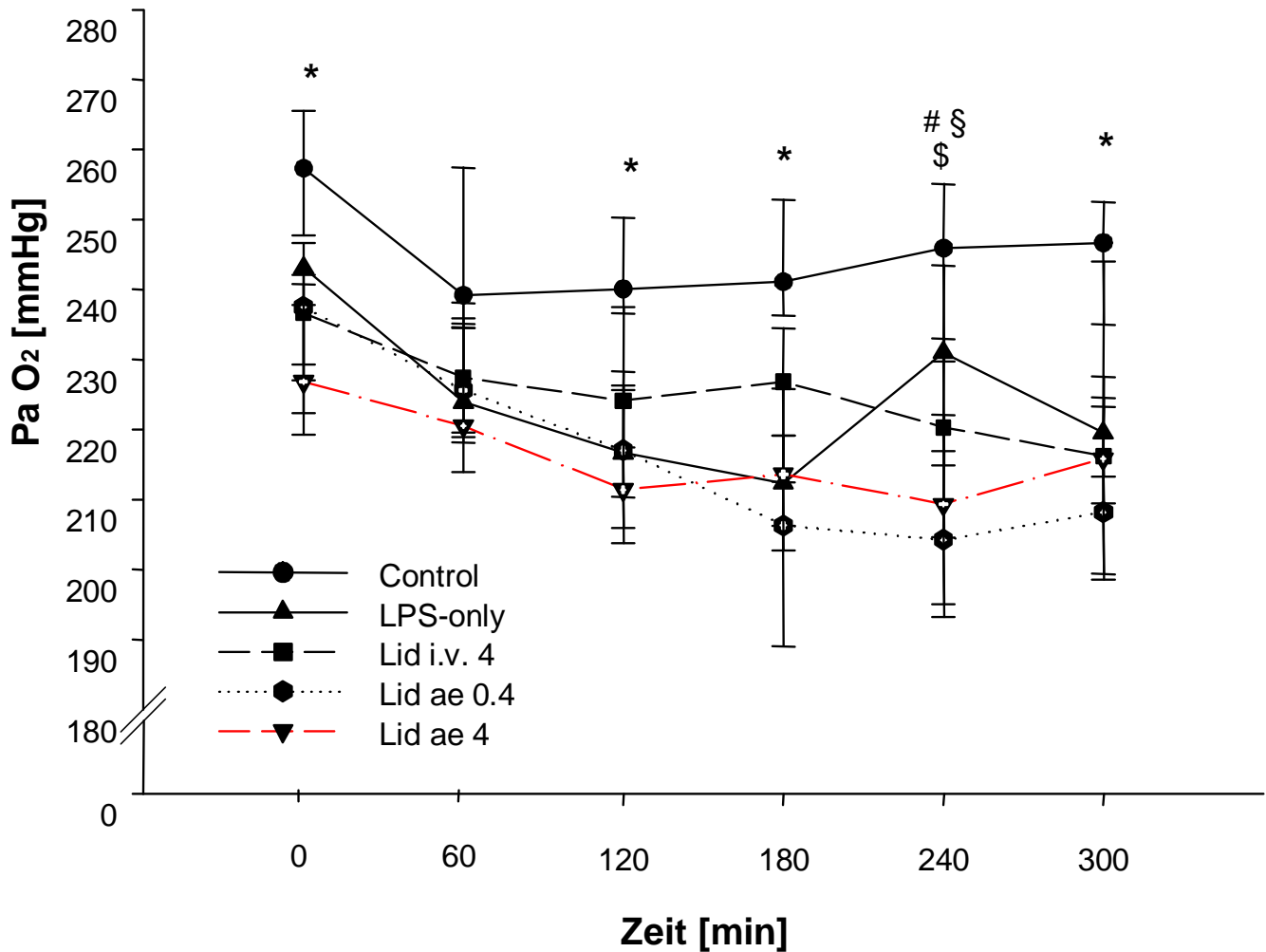


Abb. 9 Verlauf des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes (PaO₂) während des Versuchszeitraumes. (Median (IQR)); Zeitpunkt 0: Ausgangswert, danach stündliche Messungen bis 300 min nach Versuchsbeginn, p<0.05, * Control vs. andere Gruppen, # Control vs. Lid ae 4, Lid ae 0.4; § Lid i.v. 4 vs. Lid ae 4 und Lid ae 0.4, \$ LPS-only vs. Lid ae 4 und Lid ae 0.4

Der Kohlendioxidpartialdruck (PaCO₂, Abbildung 10) gemessen im arteriellen Blut der LPS-only Gruppe war zum Zeitpunkt 0, 120, 180 und 300 min signifikant höher als in den übrigen Versuchsgruppen. Zum Zeitpunkt 240 min lag der PaCO₂ der LPS-only Gruppe signifikant über dem der Therapiegruppen (Lid i.v. 4, Lid ae 0.4 und Lid ae 4).

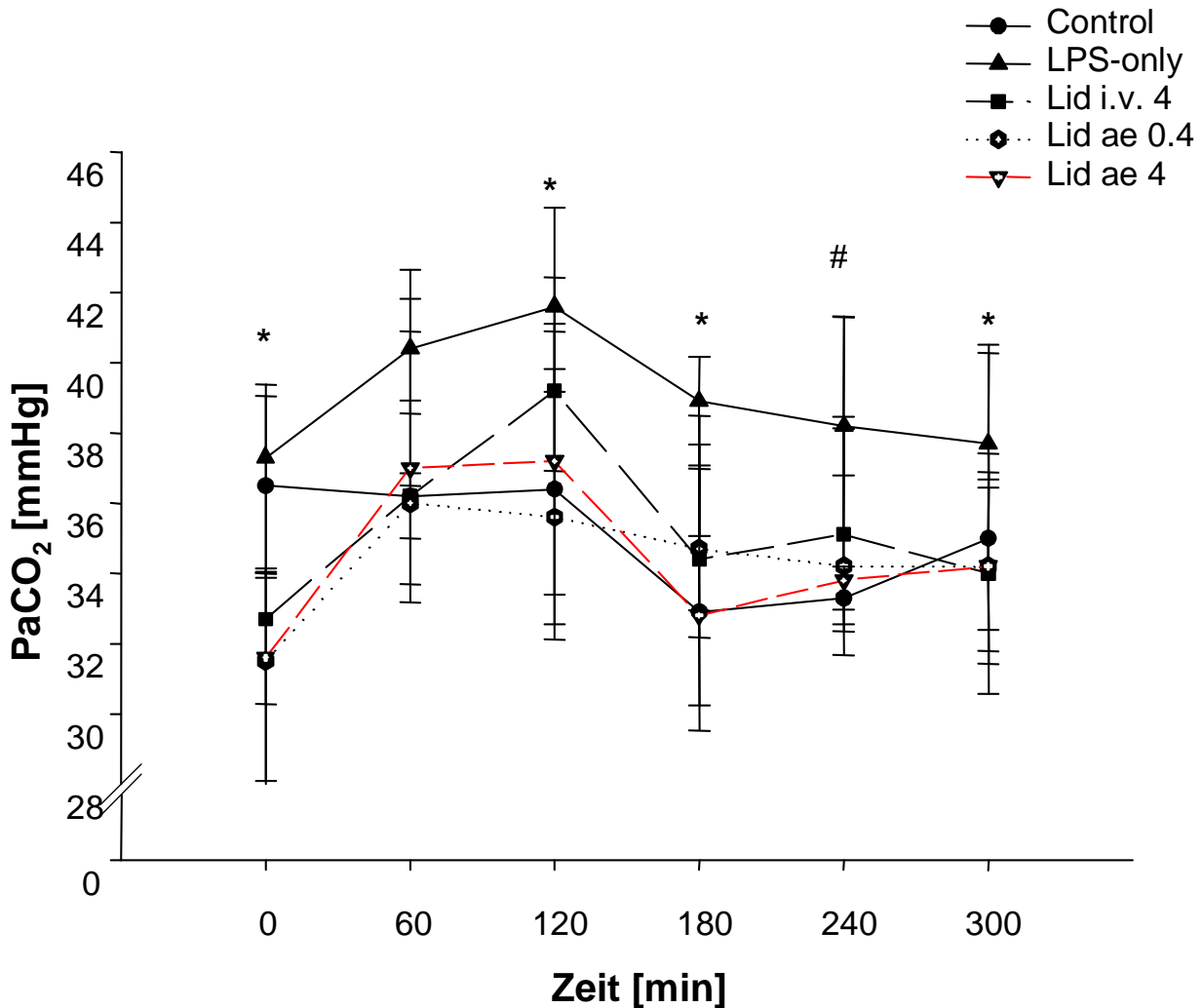


Abb. 10 Verlauf des arteriellen Kohlendioxidpartialdrucks (PaO₂) während des Versuchszeitraumes. (Median (IQR)), p<0.05, Zeitpunkt 0: Ausgangswert, danach stündliche Messungen bis 300 min nach Versuchsbeginn, * LPS-only vs. Gruppen, # LPS-only vs. Therapiegruppen

Elektrolyte, pH-Wert:

Während der gesamten Versuchszeit lag der Median des pH-Wertes und der Elektrolyte (Natrium und Kalium) der einzelnen Versuchsgruppen stets im Normbereich (pH: 7,35-7,45; Na⁺: 135-148 mmol/l; K⁺: 3,6-5,0 mmol/l).

3.4 Blutbild

In allen endotoxämischen Versuchsgruppen, trat während der ersten Stunde ein signifikanter Abfall der Leukozytenzahl (Abbildung 11) im Vollblut im Vergleich zur Kontrollgruppe auf und blieb bis zum Zeitpunkt 240 min nach Versuchsbeginn bestehen. Zum Ende des Versuchszeitraumes wies nur noch Lid ae 0.4 eine signifikant niedrigere Leukozytenzahl als die Kontrollgruppe auf (Lid ae 0.4: 4,1 (1,8) vs. 6,4 (1,8)). Zum Zeitpunkt 180 min war die Leukozytenzahl von Lid i.v. 4 signifikant größer als die der Hochdosis Vernebelungsgruppe (Lid i.v. 4: 5,7 (2,0) vs. 2,9 (1,3)).

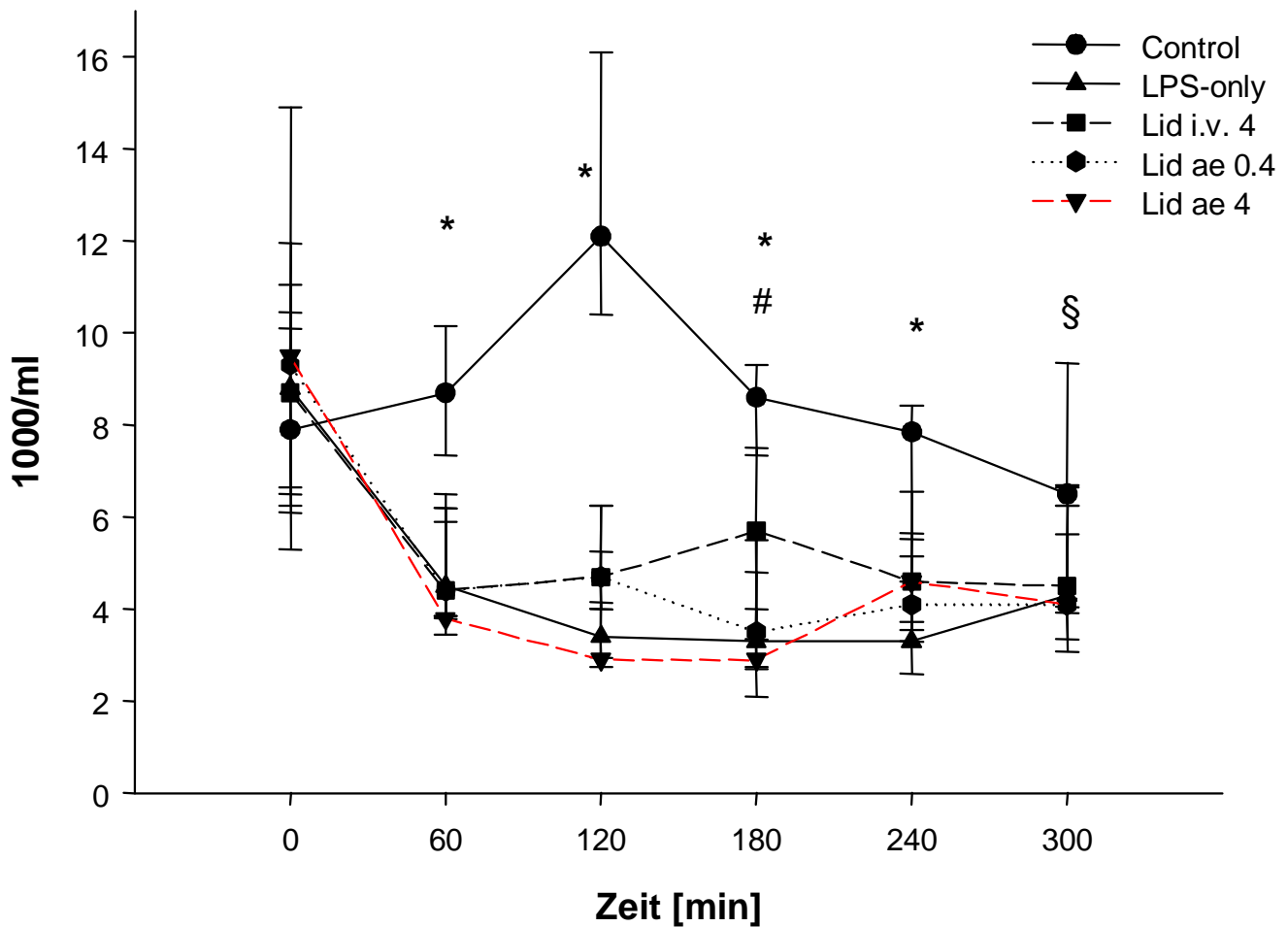


Abb. 11 Änderungen der Leukozytenzahlen (*white blood cells*) während des Versuchszeitraumes. (Median (IQR)), $p < 0.05$, Zeitpunkt 0: Ausgangswert, danach stündliche Messungen bis 300 min nach Versuchsbeginn, *Control vs. andere Gruppen, # Lid i.v. 4 vs. Lid ae 4, § Control vs. Lid ae 0.4

Dabei zeigte sich eine Verschiebung im Differentialblutbild im Sinne einer Abnahme der peripheren Lymphozytenzellzahl (Abbildung 12) und Zunahme der Anzahl segmentkerniger Granulozyten (Abbildung 13). Diese Veränderungen waren in allen Gruppen erkennbar. Lediglich die Kontrollgruppe zeigte ab 180 min eine signifikant geringere Abnahme der Lymphozytenzahl im Vergleich zu den übrigen Gruppen. Zu den Zeitpunkten 0 und 120 min war die Lymphozytenzahl von Lid i.v. 4 signifikant niedriger als die der Kontrollgruppe (Zeitpunkt 0: Lid i.v. 4: 67 (8) vs. 82 (7); Zeitpunkt 120 min: Lid i.v. 4: 32 (4) vs. 46 (19)).

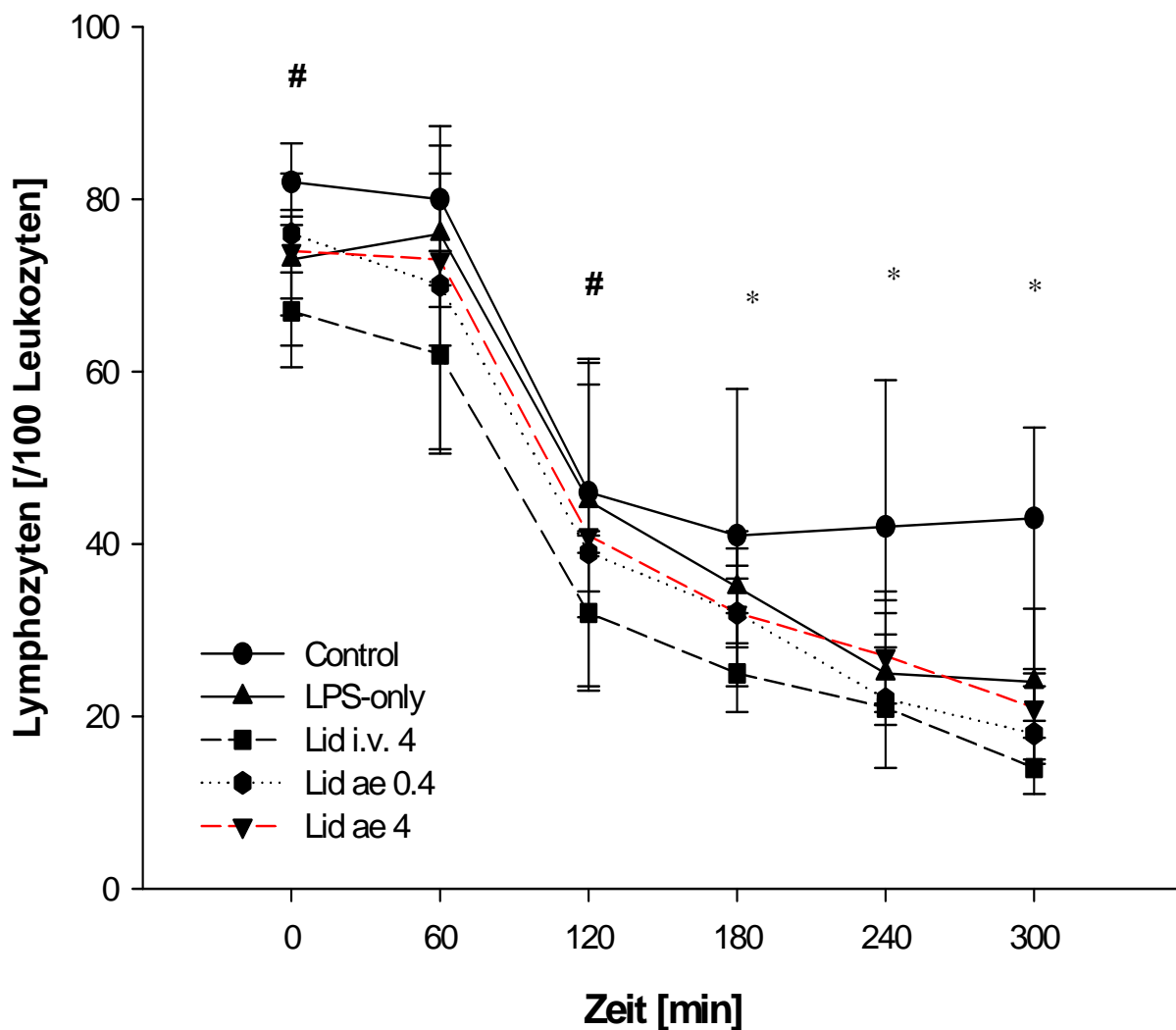


Abb. 12 Änderung der Lymphozytenzahl im peripheren Blut während des Versuchszeitraumes. (Median (IQR)), $p < 0.05$, Zeitpunkt 0: Ausgangswert, danach stündliche Messungen bis 300 min nach Versuchsbeginn, *Control vs. Gruppen, # Control vs. Lid i.v. 4

Es deutete sich ein Trend an, dass die Zahl der segmentkernigen Granulozyten im peripheren Blut (Abbildung 13) der Kontrollgruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen weniger stark anstieg und auf einem mittleren Niveau blieb. Zum Meßzeitpunkt 300 min ergab die Analyse keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ($p=0.051$), obwohl die graphischen Darstellung dies vermuten ließe. Zum Zeitpunkt 0 lag die Zahl der segmentkernigen Granulozyten der Kontrollgruppe signifikant unter derjenigen von Lid i.v. 4 (Control: 9 (8) vs. 25 (8)), zum Zeitpunkt 180 min auch unter denen der Vernebelungsgruppen (Control: 57 (12) vs. Lid i.v. 4: 69 (3), Lid ae 0.4: 66 (17) und Lid ae 4: 64 (7)). Bei 240 min wies die Kontrollgruppe die niedrigsten Zahlen segmentkerniger Granulozyten aller Gruppen auf, bei 300 min deutete sich ein solcher Trend nur an.

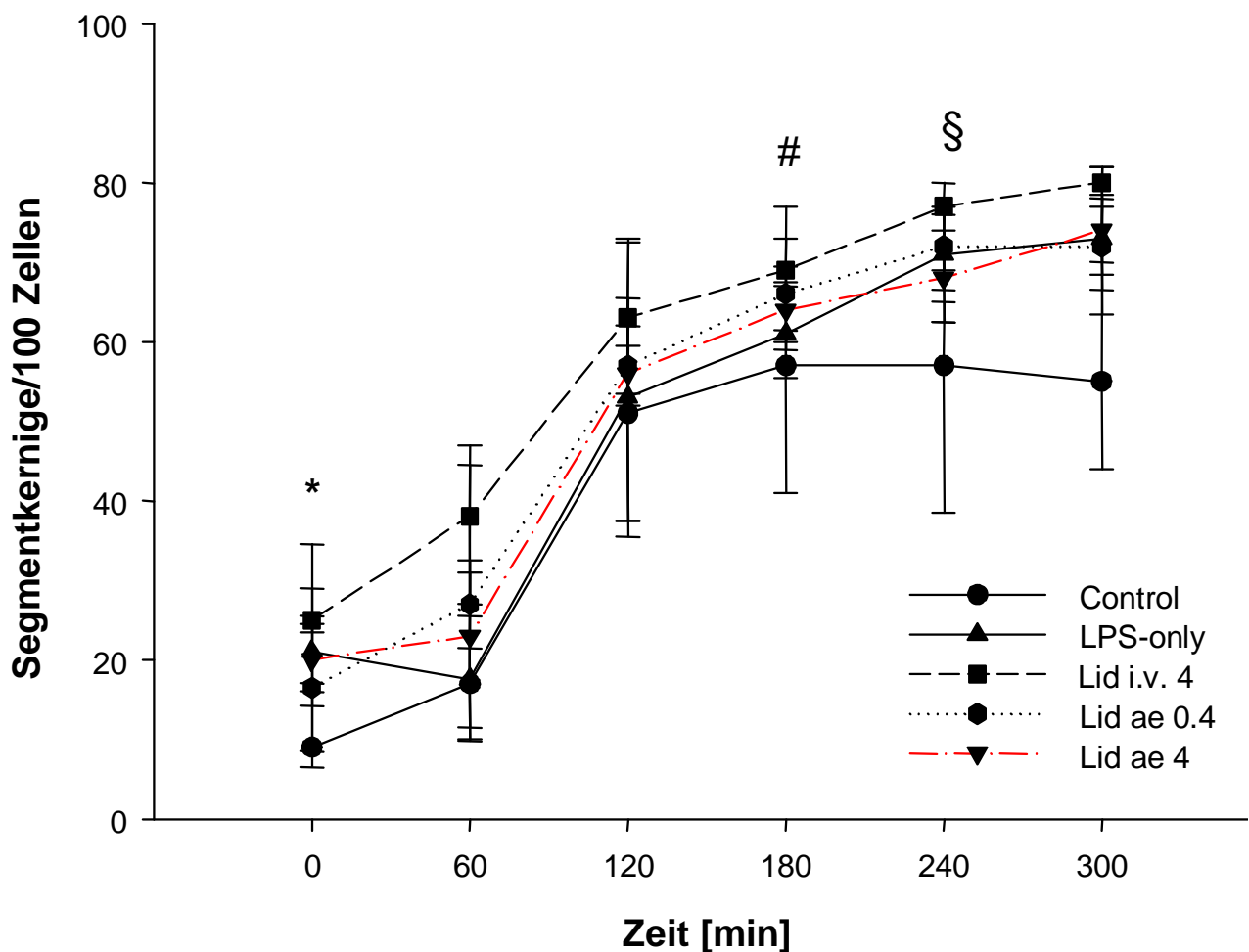


Abb. 13 Änderung der Zahl der segmentkernigen Granulozyten während des Versuchszeitraumes. (Median (IQR)), $p<0.05$, Zeitpunkt 0: Ausgangswert, danach stündliche Messungen bis 300 min nach Versuchsbeginn, *Control vs. Gruppen, # Control vs. Lid i.v. 4, +Control vs. Lid ae 0.4, Lid ae 4 und Lid i.v. 4

Die Thrombozytenzahlen (Abbildung 14) sanken in den endotoxämischen Gruppen 180 min nach LPS-Injektion signifikant gegenüber der Kontrollgruppe ab. Diese Veränderung im Blutbild blieb bis zum Versuchsende (300 min) bestehen.

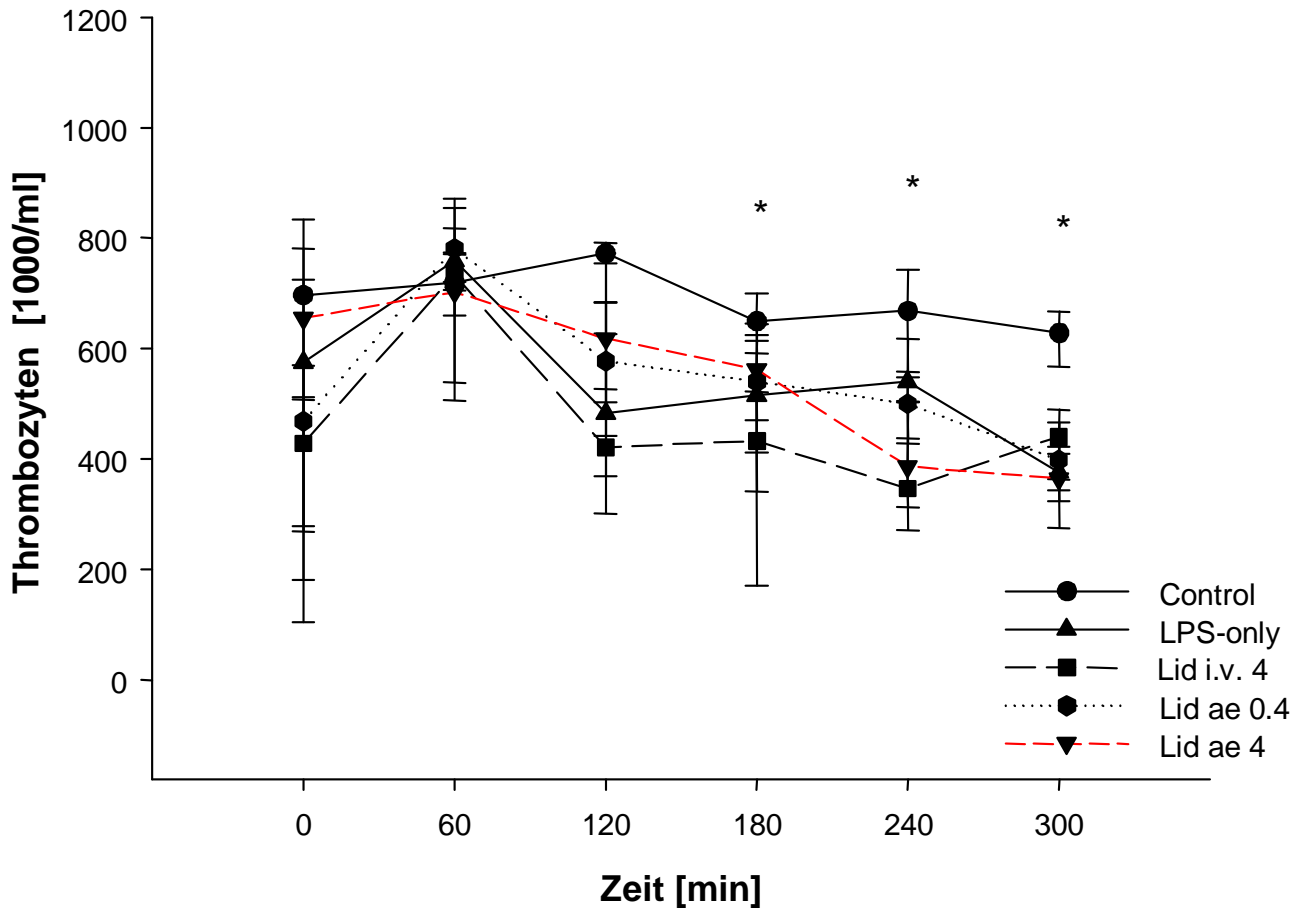


Abb. 14 Änderungen der Thrombozytenzahlen im peripheren Blut während des Versuchszeitraumes. (Median (IQR)), * $p < 0.05$, Zeitpunkt 0: Ausgangswert, danach stündliche Messungen bis 300 min nach Versuchsbeginn, *Control vs. andere Gruppen

Der Hb-Wert (Abbildung 15) zeigte über den Versuchszeitraum eine kontinuierliche Abnahme von 15,2 g/dl (IQR 1,7) zu Beginn auf 10,9 g/dl (IQR 1,0) nach 300 Minuten. Die Kontrollgruppe hatte bei 60 min und 120 min signifikant niedrigere Werte als die übrigen Gruppen. Eine Übersicht über die Veränderungen im Blutbild der einzelnen Versuchsgruppen bietet Tabelle 3.

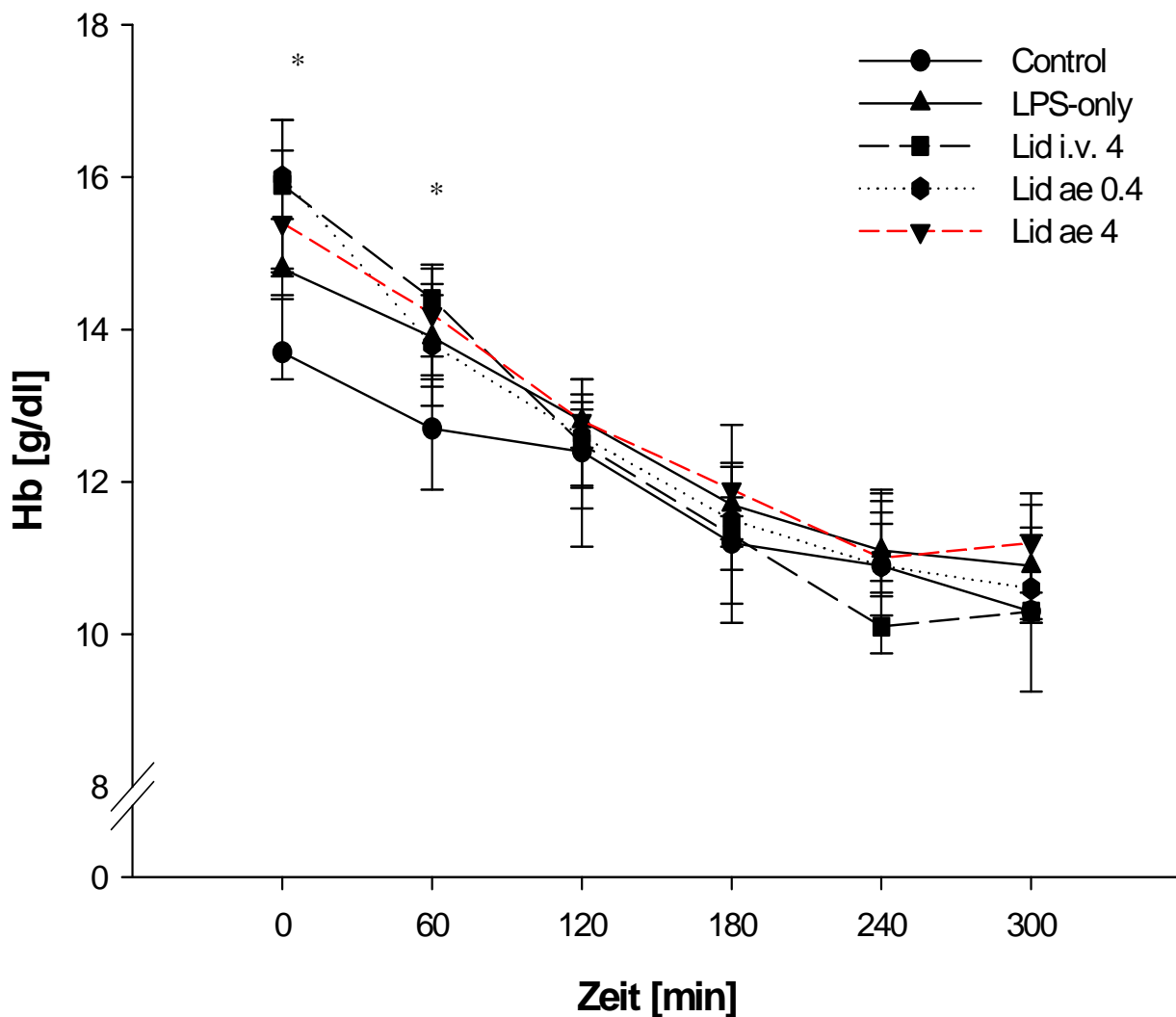


Abb. 15 Änderungen des Hb-Wertes (Hb) während des Versuchszeitraumes. (Median (IQR)), * $p < 0.05$, Zeitpunkt 0: Ausgangswert, danach stündliche Messungen bis 300 min nach Versuchsbeginn, *Control vs. andere Gruppen

Tabelle 3 Veränderungen im Blutbild der Versuchsgruppen während des Versuchszeitraumes. (Median /IQR)

Zeitpunkt nach Gabe von LPS oder Ende der ersten Vernebelung

	0min	60min	120min	180min	240min	300min
Leukozyten(10³/ml)						
Control	7,9 /2,5	8,7 /2,3 *	12,5 /4,5 *	8,6 /1,4 *	8,2 /2,0 *	6,4 /1,8 §
LPS- only	8,8 /6,6	4,5 /2,5	3,4 /1,3	3,3 /1,3	3,3 /1,5	4,3 /1,8
Lid i.v. 4 mg/kg	8,7 /2,4	4,4 /1,9	4,7 /1,5	5,7 /2,0 \$	4,6 /1,3	4,5 /1,4
Lid ae 0.4 mg/kg	9,3 /5,1	3,8 /1,3	3,2 /0,4	3,5 /1,4	4,1 /1,2	4,1 /1,8
Lid ae 4 mg/kg	9,5 /3,9	3,8 /0,6	2,9 /0,6	2,9 /1,3	4,6 /2,4	4,8 /2,2
Thrombozyten (10³/ml)						
Control	696 / 309	720 /82	773 /110	649 /102 *	668 /270 *	628 /94 *
LPS- only	575 /397	759 /92	483 /227	515 /200	540 /140	376 /129
Lid i.v. 4 mg/kg	428 /413	733 /213	412 /379	432 /309	346 /153	440 /98
Lid ae 0.4 mg/kg	468 /78	781 /84	577 /103	540 /115	500 /100	398 /37
Lid ae 4 mg/kg	655 /376	702 /243	618 /86	562 /83	386 /200	364 /35
Lymphozyten (/100Leuk.)						
Control	82 /7 +	80 /15	46 /19 +	41 /12 *	42 /22 *	43 /31*
LPS- only	73 /13	76 /18	45 /24	35 /8	25 /9	24 /13 +
Lid i.v. 4 mg/kg	67 /8	62 /20	32 /14	26 /6	21 /12	14 /9
Lid ae 0.4 mg/kg	76 /8	70 /22	39 /10	32 /15	22 /11	18 /7
Lid ae 4 mg/kg	74 /8	73 /10	41 /18	32 /9	27 /5	21 /7

Segment. (/100 Leuk.)						
Control	9 /8 +	17 /16	51 /20	57 /12 + § §	57 /23 *	55 /31
LPS- only	21 /15	18 /16	53 /22	61 /8	71 /16	73 /14
Lid i.v. 4 mg/kg	25 /8	38 /17	63 /13	69 /3	77 /5	80 /10
Lid ae 0.4 mg/kg	17 /6	27 /21	57 /10	66 /17	72 /9	72 /13
Lid ae 4 mg/kg	20 /6	23 /14	56 /19	64 /7	68 /5	74 /8

Segment.: Segmentkernige Leukozyten, Leuk.: Leukozyten, p<0.05, *vs. Gruppen, # vs. LPS-only, + vs. Lid i.v. 4, § vs. Lid ae 0.4, \$ vs. Lid ae 4,

3.5 Nitritfreisetzung aus Alveolarmakrophagen

Abbildung 16 A zeigt die spontane Nitritfreisetzung aus kultivierten Alveolarmakrophagen innerhalb von 24 h. Die Makrophagen der Kontrolltiere produzierten spontan kein messbares Nitrit. In den Makrophagen der LPS-only Tiere kam es vermehrt zur Freisetzung von Nitrit. In allen Therapiegruppen kam es zu einer signifikanten ($p < 0.05$) Hemmung der Nitrit-Produktion im Vergleich zur LPS-only Gruppe. Dabei lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Therapiegruppen vor. Es deutete sich allerdings ein Trend an, dass die Vernebelungsgruppen die NO-Produktion stärker supprimierten als die i.v.-Gruppe (Lid ae 4: 1,68 (0,84); Lid ae 0.4: 1,6 (1,12) vs. Lid i.v. 4: 2,63 (0,66)).

Durch die Zugabe von LPS *in vitro* (Abbildung 16 B) ließen sich die Alveolarmakrophagen aller Gruppen gleichermaßen stimulieren. Es deutete sich lediglich ein Trend an, dass die Makrophagen der LPS-only Gruppe nach erneuter Stimulation mit LPS *in vitro* mehr Nitrit freisetzen, als die übrigen Versuchsgruppen. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

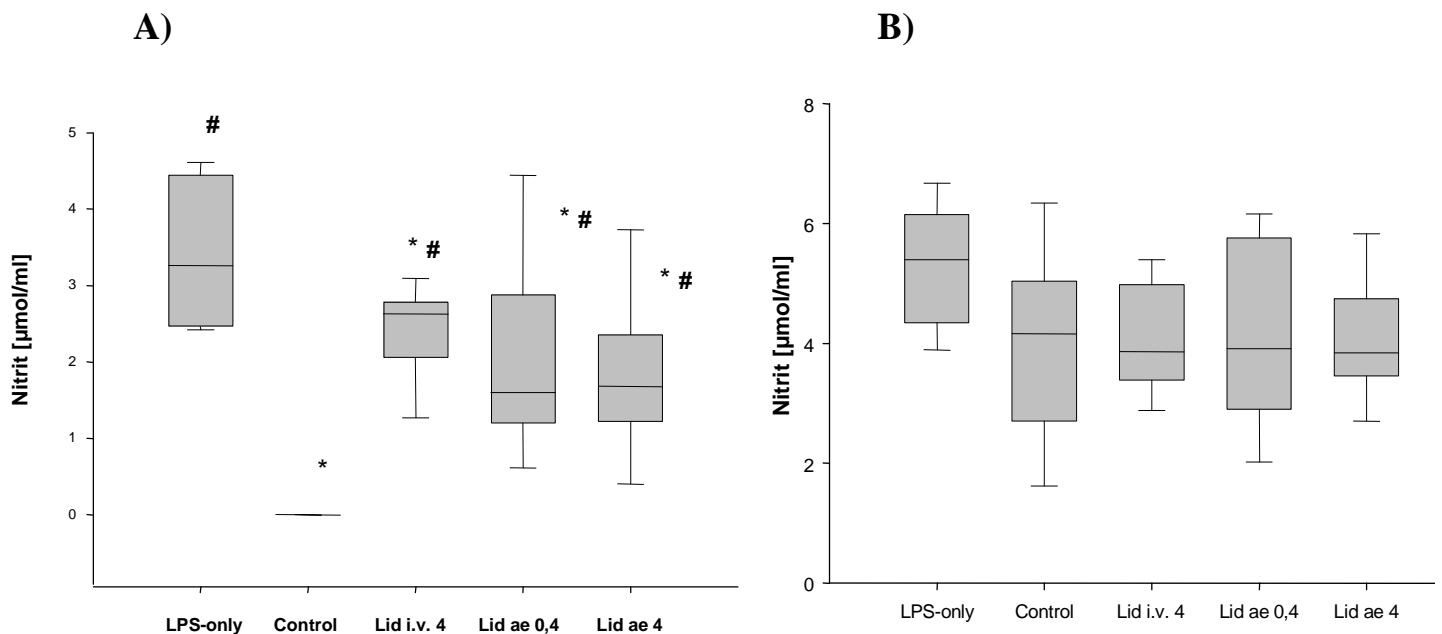


Abb. 16 Nitritfreisetzung aus Alveolarmakrophagen. Die Makrophagen wurden für 24 h entweder ohne Stimulus (A) oder nach Zugabe von LPS (1µg/ml) *in vitro* (B) kultiviert, (Median (IQR)), $p < 0.05$, *Gruppen vs. LPS-only, # Gruppen vs. Control

3.6 Zytokinkonzentrationen im Plasma

Die Tiere der Kontrollgruppe wiesen im Plasma lediglich sehr geringe Konzentrationen der gemessenen Zytokine (IL-1 β , IL-6, IL-10 und TNF α) auf. Durch die Gabe von LPS kam es zu einem signifikanten Anstieg der Konzentrationen aller gemessener Zytokine, die jedoch von keiner der Therapiegruppen signifikant gesenkt werden konnte. Abbildung 17 zeigt eine graphische Darstellung der Plasmakonzentrationen der gemessenen Zytokine der einzelnen Versuchsgruppen. Tabelle 4 gibt eine tabellarische Übersicht über diese Werte.

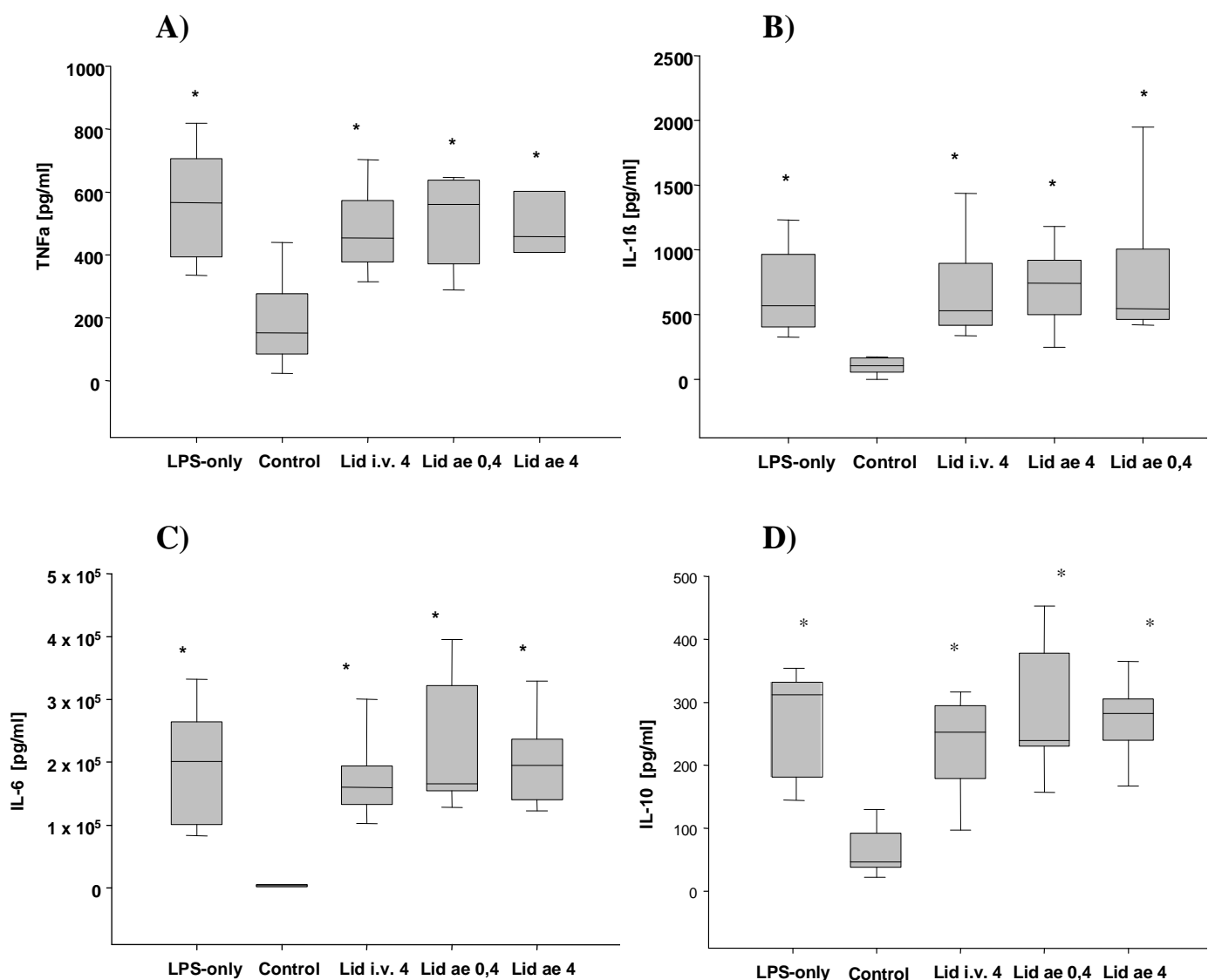


Abb. 17 Übersicht über die Konzentrationen der Zytokine im Plasma. (Median (IQR)), $p < 0.05$, A: Tumornekrosefaktor alpha (TNF α), B: Interleukin-1 β (IL-1 β), C: Interleukin-6 (IL-6), D: Interleukin-10 (IL-10), * vs. Control

3.7 Zytokinkonzentrationen in BALF

Die Bestimmung proinflammatorischer Zytokine in der BALF der Versuchstiere nach LPS-Injektion und ihre Supprimierung durch die präventive Vernebelung von Lidocain im Vergleich zur intravenösen Gabe von Lidocain war einer der Schwerpunkte der vorliegenden Studie. Die nachfolgenden Abbildungen (Abbildung 18 A-D) zeigen die Ergebnisse der dazu durchgeführten ELISA-Messungen. Die Injektion von LPS löste in allen Tieren einen signifikanten Anstieg der gemessenen Zytokinkonzentrationen (IL-1 β , IL-6 und TNF α) aus. Im Gegensatz zur niedrigdosierten Vernebelung (0,4 mg/kg KG) waren in der hochdosierten Vernebelungsgruppe (4 mg/kg KG) die Konzentrationen von IL-1 β und TNF α in der BALF signifikant erniedrigt. Durch die i.v.-Gabe von Lidocain wurde dies ebenfalls erreicht.

Durch die Injektion von LPS kam es zu einem signifikanten Anstieg der IL-1 β Konzentration. Durch die hochdosierte Vernebelung (4 mg/kg KG) von Lidocain konnte dieser Anstieg um 56,6 % (217.3 (195.1) pg/ml vs. 94.2 (165.8) pg/ml) gesenkt werden. Vergleichbar effektiv zeigte sich die i.v.-Gabe von Lidocain (4mg/kg KG) mit einer Senkung des IL-1 β Anstiegs um 57,1 % (217.3 (195.1) pg/ml vs. 93.2 (79.8) pg/ml). Dabei unterschieden sich die IL-1 β -Konzentrationen der genannten Therapiegruppen nicht signifikant von denen der Control-Gruppe. Durch die niedrigdosierte Vernebelung (0.4 mg/kg KG) konnte keine signifikante Supprimierung des LPS-induzierten IL-1 β -Anstiegs erreicht werden.

Wie für IL-1 β konnte durch Lid ae 4 und Lid i.v. 4 auch eine signifikante Suppression des LPS-induzierten Konzentrationsanstiegs von TNF- α erzielt werden. Lid ae 4 senkte den TNF α -Anstieg um 27,7 % (436.7 (344.5) pg/ml vs. 316.4 (191.1) pg/ml), Lid i.v. 4 sogar um 48,6 % (436.7 (344.5) pg/ml vs. 228.6 (169.3) pg/ml). Analog zu den Messergebnissen der IL-1 β -Bestimmung konnte die niedrigdosierte Vernebelung auch keine Suppression des LPS-induzierten Anstiegs der TNF α -Konzentrationen bewirken.

IL-6 ließ sich bei den Tieren der Kontrollgruppe in einer Konzentration von 411,2 (277,0) pg/ml nachweisen. Die Injektion von LPS führte zu einem signifikanten Anstieg der IL-6-Konzentrationen aller Gruppen, die durch keine der Therapieformen signifikant gegenüber der LPS-only Gruppe (2755 (1144) pg/ml) gesenkt werden konnten. Lid i.v. 4 hatte signifikant niedrigere Konzentrationen von IL-6 in der BALF als Lid ae 0.4. (1918 (726) pg/ml vs. 3233 (1570) pg/ml).

In keiner der Versuchsgruppen konnten erhöhte IL-10-Konzentrationen der BALF nachgewiesen werden.

Die Messergebnisse von INF γ in der BALF der Versuchsgruppen ergab von den übrigen Messungen abweichende Werte: Die Injektion von LPS führte in der LPS-only-Gruppe nach 300 min zu gleich hohen INF γ -Konzentrationen wie in der Kontrollgruppe zu messen waren (61.6 (158,1) pg/ml bzw. 71.7 (123.6) pg/ml). Zwischen den Versuchsgruppen bestand kein signifikanter Unterschied bezüglich ihrer INF γ -Konzentrationen. Lediglich die hochdosierte Vernebelung führte nach 300 min zu signifikant niedrigeren INF γ -Konzentrationen als in allen übrigen Gruppen.

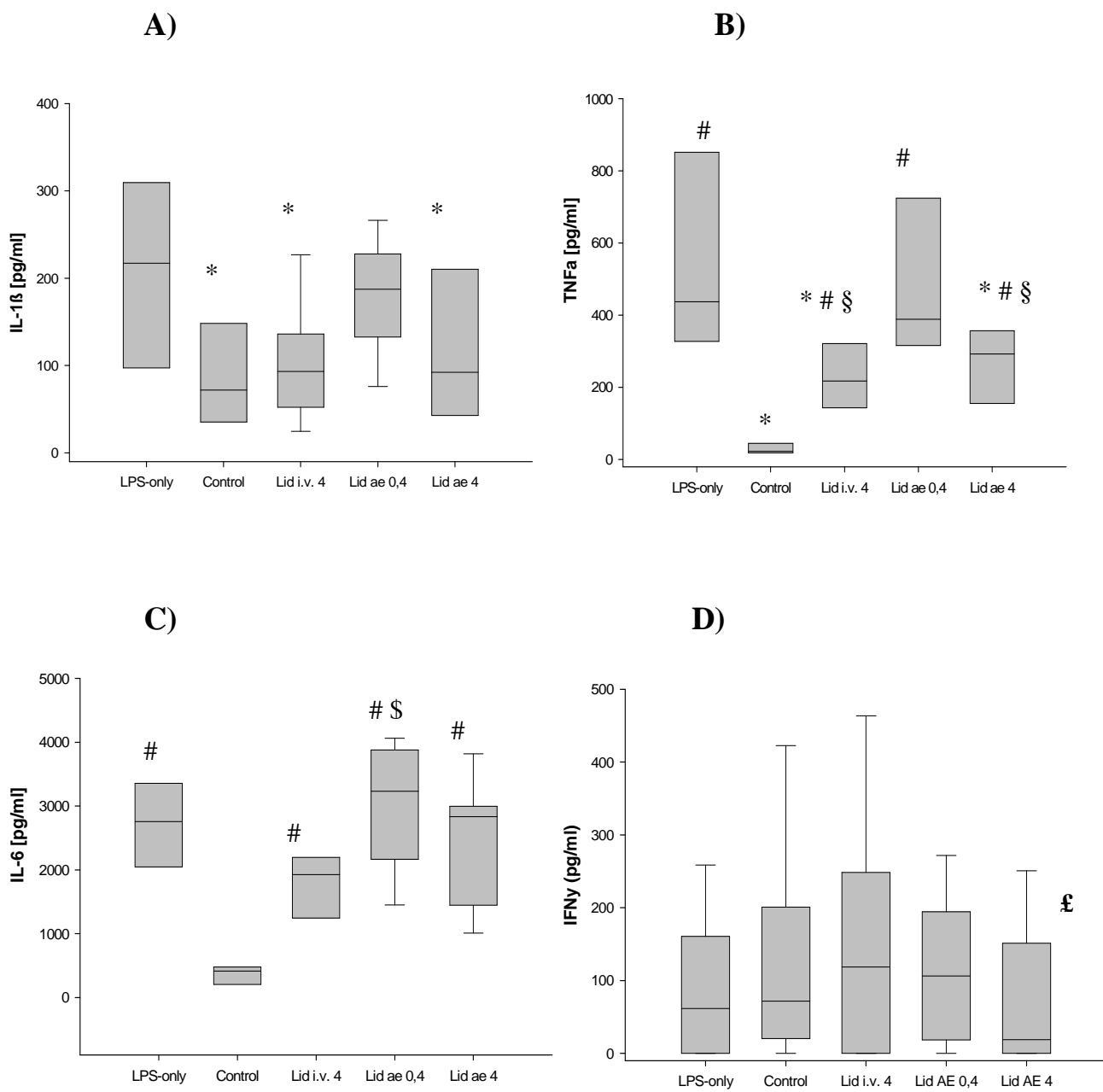


Abbildung 18 Übersicht über die Zytokinkonzentrationen in der BALF, A: Interleukin 1 β (IL-1 β), B: Tumornekrosefaktor α (TNF α), C: Interleukin 6 (IL-6), D: Interferon γ (IFN γ), (Median (IQR)), $p < 0.05$, * vs. LPS-only, # vs. Control, § vs. Lid ae 0.4, £ vs. Lid i.v. 4, £ Lid ae 4 vs. Gruppen

3.8 Lidocainkonzentrationen im Plasma

Die Lidocainkonzentrationen im Plasma der beiden Vernebelungsgruppen (Abbildung 19 B) lagen zu allen Messzeitpunkten signifikant unter denen der i.v.-Gruppe (Abbildung 19 A). Die größten Unterschiede zeigten sich bei den ersten Messungen nach Lidocainapplikation: die i.v.-Bolusgabe resultierte in hohen Spitzenwerten, die rasch abfielen. Die Vernebelung von Lidocain resultierte in wesentlich kontinuierlicheren Plasmakonzentrationen (beachte die unterschiedliche Skalierung der y-Achsen!).

Nach intravenöser Gabe von Lidocain kam es zu einem initialen Anstieg auf 4,93 $\mu\text{mol/ml}$ (IQR= 2,0) eine Minute nach der ersten Injektion und vergleichbar hohen Werten (4,4 $\mu\text{mol/ml}$ [IQR= 1,7]) nach der zweiten Injektion. Die Werte der Hochdosis Vernebelungsgruppe Lid ae 4 lagen mit 0,32 $\mu\text{mol/l}$ (IQR= 0,28) nach der ersten Vernebelung und mit 0,74 $\mu\text{mol/ml}$ (IQR= 0,12) nach der zweiten signifikant darunter. Nach der zweiten Injektion von Lidocain sanken die Plasmakonzentrationen von Lidocain wesentlich langsamer ab als nach der ersten, was sich in dem flacheren Kurvenverlauf der Lid i.v. 4-Gruppe nach der zweiten Injektion widerspiegelt.

Zu Versuche lagen die Lidocainkonzentrationen im Plasma der Lid i.v. 4-Gruppe mit 1,5 $\mu\text{mol/ml}$ (IQR=0,55) signifikant ($p<0.05$) über denen der Lid ae 4-Gruppe (0,54 $\mu\text{mol/ml}$ [IQR=0,22]). Eine Lidocainkonzentration oberhalb der toxischen Grenze von 10 $\mu\text{g/ml}$ (174) wurde nach der ersten Lidocaininjektion bei einem Tier der Lid i.v. 4-Gruppe eine Minute nach Injektion gemessen und bei einem weiteren Tier dieser Gruppe eine Minute nach der zweiten Injektion. Fünf Minuten nach den Bolusinjektionen lagen die Konzentrationen von Lidocain im Plasma deutlich unterhalb der toxischen Grenze (1,81 $\mu\text{g/ml}$ [IQR=0,13] bzw. 3,84 $\mu\text{g/ml}$ [IQR=0,84]).

Die Plasmakonzentrationen von Lid ae 0.4 lagen nach der ersten Vernebelung unter 0,1 $\mu\text{mol/ml}$ und damit unterhalb des Bereiches, in welchem das Messgerät (TDx-Analyzer, Abbott, Illinios, USA) laut Hersteller zuverlässige Werte liefert. Nach der zweiten Vernebelung lagen die Werte nur knapp darüber.

Bei keinem Tier der Vernebelungsgruppen wurde zu irgendeiner Zeit eine Plasmakonzentration von Lidocain in der Nähe toxischer Bereiche gemessen. Der höchste gemessene Wert in den Vernebelungsgruppen lag bei 1,5 $\mu\text{g/ml}$ (Lid ae 4).

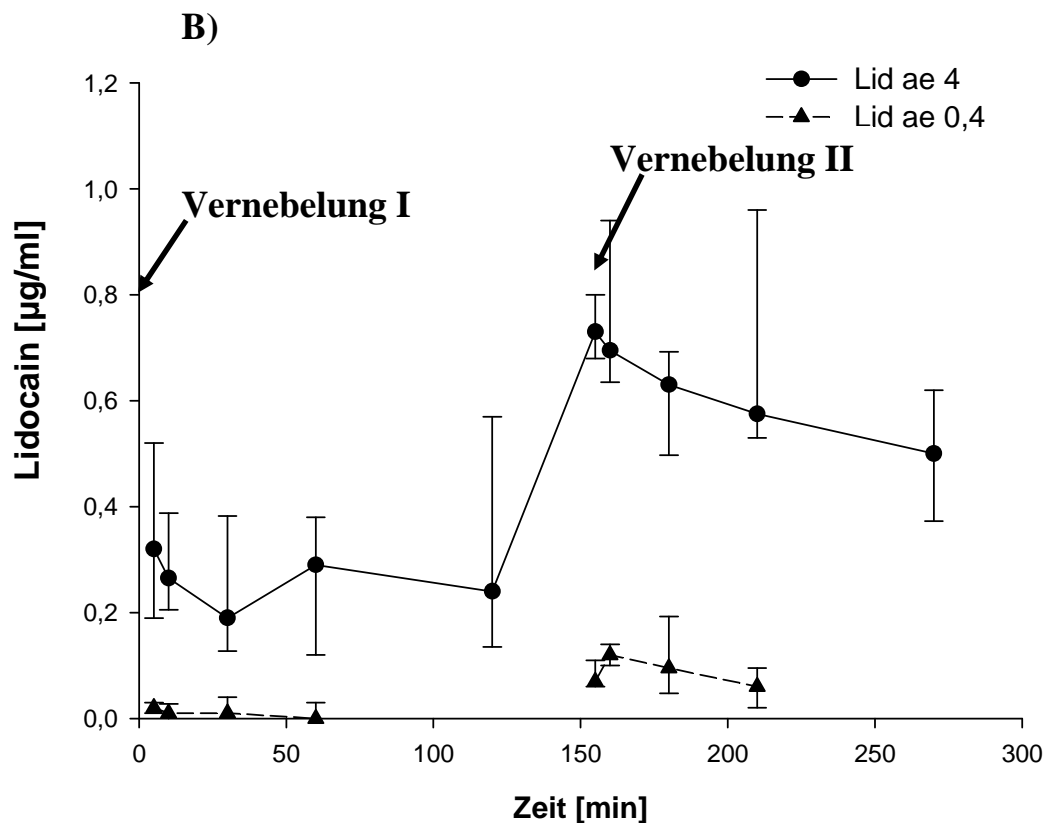
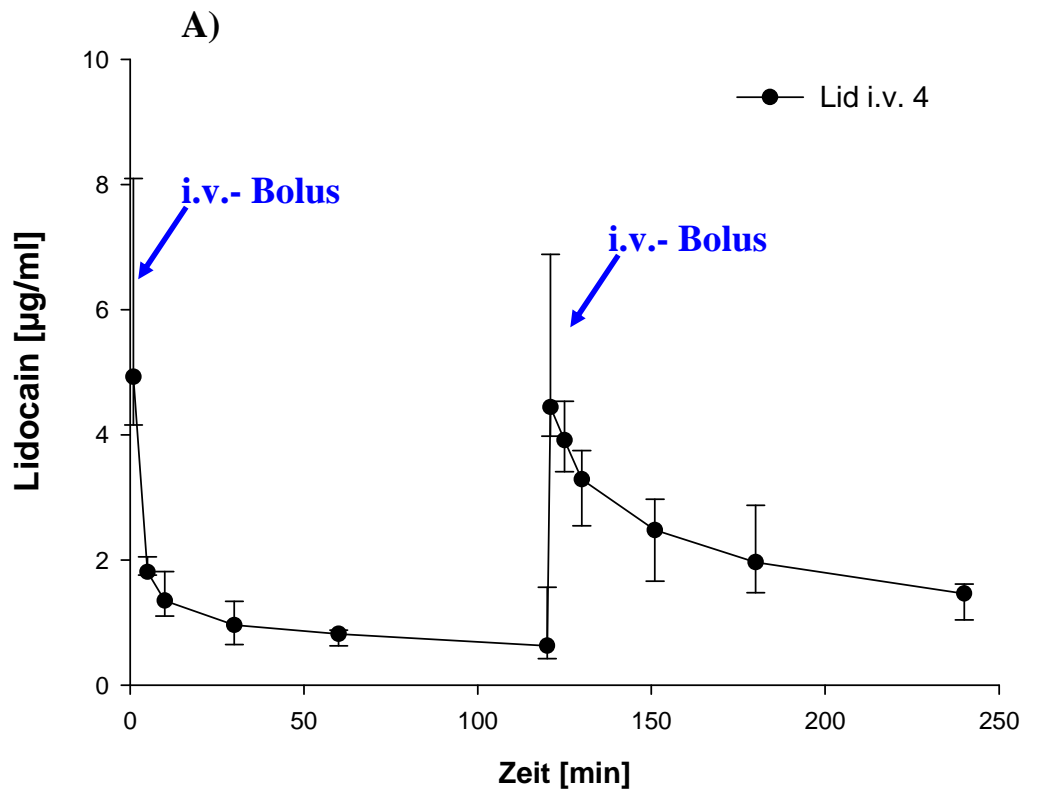


Abb. 19 Kinetik der Lidocainkonzentrationen im Plasma der Versuchstiere über die Zeit. A: Plasma-konzentrationen von Lidocain nach i.v.-Gabe, B) nach Vernebelung, Daten sind dargestellt als Median mit simple-error-bars der 25. und 75. Perzentile. Die Plasmakonzentrationen beider Vernebelungsgruppen lagen zu allen Messzeitpunkten signifikant unter den Plasmakonzentrationen von Lid i.v. 4 ($p < 0.05$), die Plasmakonzentrationen von Lid ae 0.4 lagen zudem zu allen Messzeitpunkten signifikant ($p < 0.05$) unter denen von Lid ae 4

4 DISKUSSION

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 Tiermodell

Studien zur Inhalation an Kleintieren werden häufig unter Spontanatmung an wachen oder sedierten Tiere durchgeführt (183,185). Das Atemmuster während Spontanatmung ist jedoch unregelmäßig und nicht kontrollierbar. Unterschiedliche Frequenz und Tiefe der Atemzüge wirken sich auf die alveoläre Deposition aus, die unter solchen Bedingungen stark variiert. Die Gabe von Sedativa und Anästhetika wirkt sich zusätzlich alterierend auf die Atemmechanik aus (48), was zu einer Beeinflussung der Aerosolverteilung und –deposition führt (216).

In der vorliegenden Studie wurde die Vernebelung von Lidocain während kontrollierter Beatmung am einzelnen Versuchstier durchgeführt. Damit waren vergleichbare Bedingungen zwischen den Versuchsgruppen geschaffen. Die Realisation dieses Modells gelangen Hofstetter et al. in den Vorarbeiten zur Vernebelung von Interleukin-10 während experimenteller Endotoxinämie am Versuchstier Ratte (93).

4.1.2 Vernebelung

In der klinischen Praxis stehen für die Erzeugung und Verabreichung eines Aerosols während kontrollierter Beatmung grundsätzlich zwei Methoden zur Verfügung: Die Ultraschallvernebelung und die Jetvernebelung. Die Verwendung eines Jetvernebelers bietet gegenüber derjenigen eines Ultraschallvernebelers mehrere Vorteile. Das von einem Jetvernebeler erzeugte Partikelspektrum weist eine geringere Schwankungsbreite auf als das eines Ultraschallvernebelers (188,219). Das Maß der alveolären Deposition hängt wesentlich von der Größe der erzeugten Aerosolpartikel ab. Eine große Streuung in der Partikelgröße geht mit einer verminderten alveolären Deposition einher.

Die während Ultraschallvernebelung frei werdende Energie, u.a. in Form von Wärme, stellt ein weitere Beeinträchtigung, vor allem für hitzeempfindliche Aerosole (Proteine) dar. Eine Veränderung oder Inaktivierung von Proteinen durch die Hitzeentwicklung während Ultraschallvernebelung ist für Insulin (231), Interferon (104) und Surfactant (235) beschrieben.

Die Erzeugung eines Aerosols mit Hilfe von Druckluft (Jetvernebelung) ist eine klinisch etablierte und weit verbreitete Methode (153), die für prinzipiell alle löslichen Substanzen anwendbar ist (1). Das erzeugte Partikelspektrum hängt von vielen verschiedenen Faktoren ab: von dem verwendeten Verneblertyp, der Größe der Vernebelungskammer, der Temperatur sowie der Durchflußrate des durchströmenden Gases und den physikochemischen Eigenschaften der vernebelten Substanz (39,88).

Die therapeutische Vernebelung von Substanzen im Tierexperiment zur Behandlung der akuten Inflammationsreaktion der Lunge ist neben der vorliegenden Studie auch in weiteren Studien untersucht worden. Beispiele hierfür sind die Vernebelung von 'tissue plasminogen activator' (TPA) im verbrennungsassoziierten Lungenschaden (55), Terbutalin und Budesonid als Therapie des chlogasinduzierten Lungenschadens (224) und LU-135252, ein Endothelin (A) Rezeptorantagonist mit Surfactant-Mangel assoziierten Lungenschaden.

Der in der vorliegenden Studie verwendete Vernebler erzeugte ein Partikelspektrum, das eine alveoläre Deposition von 3.8% ermöglichte, was einer Deposition an intubiert beatmeten Patienten auf Intensivstation entspricht (67,130). Zudem konnte die Vernebelung unter physiologischen Bedingungen durchgeführt werden, ohne eine Schädigung der Lunge oder Beeinträchtigung der Hämodynamik nach sich zu ziehen.

In einer weiteren Studie könnte die Frage geklärt werden, ob die Inhalation von Lidocain nicht nur präventiv sondern auch therapeutisch erfolgen kann. Die Beantwortung dieser Frage ist von großer klinischer Relevanz. Nishina et al. (163) konnten zeigen, dass die Gabe von intravenösem Lidocain 10 min nach Auslösen des experimentellen Lungenschadens durch intratracheale Säureapplikation gleichermaßen effektiv war, wie die prophylaktische Gabe von Lidocain. Der protektive Effekt intravenösen Lidocains war jedoch 30 min nach Auslösen des Lungenschadens nicht mehr vorhanden (163).

Ein möglicher Vorteil einer Inhalationstherapie mit Lidocain ist die Tatsache, dass die Substanz nicht in die systemische Zirkulation gelangt, sondern direkt vor Ort ihre antiinflammatorische Wirkung im betroffenen Lungengewebe entfalten kann. Da die vernebelte Menge an Lidocain direkt an den Ort der Entzündung gelangt und sofort ihre Wirkung entfalten kann, ohne durch die alveolar-kapilläre Barriere diffundieren zu müssen, könnte folglich für die Vernebelung von Lidocain ein größeres therapeutisches Zeitfenster existieren, als für die intravenöse Gabe. Für die Formen der direkten Lungenschädigung bietet die Vernebelung von Lidocain womöglich einen zusätzlichen Vorteil, da die auslösende Noxe

ebenfalls von der alveolären Seite her einwirkt und so eine direkte Antagonisierung der proinflammatorischen Reize durch das vernebelte Lidocain erfolgen kann.

4.1.3 Experimentelle Endotoxinämie

Die bakterielle Sepsis ist die häufigste Ursache für das Zustandekommen des akuten Lungenschaden (100). Die Organschädigungen, zu denen auch der ALI gehört, entwickeln sich meist sekundär im Laufe des septischen Krankheitsbildes. Die Schädigung der Lunge erfolgt auf indirektem Weg, was bedeutet, dass mikrobielle Erreger, Endotoxine und Entzündungsmediatoren über die Blutbahn in die Lunge gelangen und dort den ALI verursachen. Dieser Pathophysiologie folgend erscheint es plausibel, im Tierexperiment durch die intravenöse Injektion von LPS ein septisches Krankheitsbild zu induzieren, welches sekundär eine pulmonale Inflammationsreaktion auslöst.

Von zentraler Bedeutung für das Zustandekommen dieses septischen Krankheitsbildes ist Endotoxin (Lipopolysaccharid = LPS), ein stark inflammatorisch wirkendes Molekül auf der äußeren Hülle aller gram-negativer Bakterien (194). Die intravenöse Gabe von LPS ist ein etabliertes und weit verbreitetes Modell zur Induktion eines septischen Geschehens mit vergleichbaren klinischen Auswirkungen. Zahlreiche tierexperimentelle Studien wählten diese Vorgehensweise zur Induktion einer pulmonalen Inflammationsreaktion an Affen (230), Hunden (66,85), Ratten (38,53,238), Kaninchen (113,147,162), Schweinen (42,115,155) und Mäusen (5,37,86,120).

LPS ist in der Lage, Endothelzellen direkt und indirekt zu schädigen, was eine Schlüsselrolle im Entstehungsprozess der pulmonalen Inflammationsreaktion darstellt (177). Der Endothelzellschaden ist ein charakteristisches Merkmal autoptischer Untersuchungen an Lungen von Patienten, die an sepsisbedingtem ARDS verstarben (144). In zahlreichen Tierversuchen konnte nachgewiesen werden, dass es nach Injektion von LPS zur Schädigung und Ablösung der Endothelzellen der Kapillargefäße kommt (16). Eine erhöhte Anzahl zirkulierender Endothelzellen konnte auch im Blutstrom septischer Patienten nachgewiesen werden, was mit einer schlechteren Prognose einherging (156).

In einzelnen Studien korrelierte die Konzentration von zirkulierendem LPS mit der Entwicklung eines Multi-Organversagen (MOF = *'multi organ failure'*) einschließlich der Entwicklung eines ARDS (27). Durch die alleinige Gabe von LPS konnte im Tierexperiment ein Endothelzellschaden ausgelöst werden, der dem bei gram-negativer Infektion vergleichbar

ist (28,221). Umgekehrt wirkten Therapieansätze zur Neutralisation des LPS-Moleküls protektiv auf Endothelzellen (227,228). LPS induziert in Endothelzellen Reaktionen, die in ähnlicher Weise auch während eines septischen Geschehens vorkommen. So aktiviert LPS in Endothelzellen die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 (74,110), IL-8 (11,74), IL-1 β (50,124) sowie die vermehrte Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin, Interzelluläres Adhäsionsmolekül (ICAM)-1 und vaskuläres Zelladhäsionsmolekül (VCAM)-1 (74,109) und darüber hinaus die Expression von Gewebefaktor (Thromboplastin) (41,72).

Die Effekte von LPS werden über das membranständige Glykoprotein CD14 (mCD14) vermittelt. Zu den betroffenen Zellpopulationen zählen Zellen monozytären Ursprungs, Alveolarmakrophagen und neutrophile Granulozyten (222). Das LPS-Molekül alleine ist in der Lage, direkt an mCD14 zu binden. Seine Affinität zu diesem Rezeptor wird jedoch deutlich erhöht, wenn es einen Komplex mit dem LPS-Bindungsprotein (LBP) eingeht (167). LBP fördert zudem die Bindung von LPS an die lösliche, nicht membranständige Form des CD14 (sCD14) (222). Im Komplex mit sCD14 kann LPS via *toll-like* Rezeptor-4 (Tlr-4) über einen von mCD14 unabhängigen Wirkmechanismus mit Endothelzellen interagieren (222). Der durch Tlr-4 vermittelte intrazelluläre Transduktionsweg bewirkt neben einer Aktivierung von NFkappaB und einer damit verbundenen Produktion proinflammatorischer Zytokine die Aktivierung von Kaspasen (16). Diese sind proteolytisch wirksame Enzyme, die in aktiviertem Zustand die zelluläre Apoptose herbeiführen.

Die Rolle, die LPS im endotoxämischen Lungenschaden spielt, wird aus tierexperimentellen Beobachtungen deutlich. Die Injektion von LPS löst in Schafen dosisabhängig ein dem ARDS vergleichbares Krankheitsbild aus (57), welches im Verlauf zur Ausbildung einer kritischen Hypoxie mit tödlichem Ausmaß führen kann (29). Die Sensibilität für LPS ist jedoch speziesabhängig (28). Am Schwein reichen schon geringe Dosen LPS (1 mg/kg), um einen Abfall des PaO₂ und schwerste hämodynamische Kreislaufinstabilität herbeizuführen (115). Im Gegensatz dazu benötigen Sprague Dawley Ratten ein viel faches dieser Dosis, um vergleichbare klinische Veränderungen hervorzurufen (eigene Beobachtungen). Die Dosierung von 5 mg/kg LPS intravenös in der vorliegenden Studie entspricht einer üblichen Dosierung (154).

In der vorliegenden Studie wurde durch intravenöse Gabe von LPS eine pulmonale Inflamationsreaktion ausgelöst, für deren Quantifizierung die Bestimmung proinflammatorischer Zytokine in BALF und Plasma sowie die Messung von freigesetztem Nitrit aus kultivierten AM diente. Die Zytokinbestimmungen im Plasma der endotoxämischen Versuchsgruppen zeigten eine signifikante Erhöhung aller gemessenen Zytokine gegenüber

der Kontrollgruppe. Manche Tiere zeigten zudem unmittelbar nach LPS-Injektion einen ausgeprägten Blutdruckabfall, der die Gabe von Volumen und gegebenenfalls von Katecholaminen erforderte, was bei den Tieren der Kontrollgruppe nicht zu beobachten war. Neben der Erhöhung der Zytokine in BALF und Plasma und den Veränderungen der Herzfrequenz führte die intravenöse Gabe von LPS in der vorliegenden Studie auch zu einer signifikanten Leuko- und Thrombozytopenie im peripheren Blut. Lediglich die Tiere der Kontrollgruppe waren von diesen Veränderungen ausgenommen. Die Beobachtungen in der vorliegenden Studie bezüglich der Auswirkungen von LPS auf Zytokinproduktion, Hämodynamik und Blutbild decken sich mit den Erfahrungen anderer Autoren (20,28,225).

4.1.4 Wirkspektrum von Lidocain

Lidocain gehört zu den Lokalanästhetika mit der ausgeprägtesten antiinflammatorischen Wirkung (61,198). Es vermag *in vitro* den Signalweg von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten (94) zu hemmen und *in vivo* den der natürlichen Killerzellen (186,197) als auch den der neutrophilen Granulozyten (97,103).

Von den zahlreichen alternativen Effekten der LA sind aus anästhesiologischer Sicht die antiinflammatorischen Eigenschaften mit Einfluss auf Makrophagen und neutrophile Granulozyten, als auch die Verbesserung einer gestörten mikrovaskulären Permeabilität von besonderem Interesse (96,173). Intravenöses Lidocain vermag die endotoxinbedingte Adhäsion neutrophiler Granulozyten am Gefäßendothel signifikant zu hemmen. Hierfür waren Plasmakonzentrationen zwischen 1,4 und 2,5 µg Lidocain /ml erforderlich (198). Die in der vorliegenden Studie gemessenen Plasmakonzentrationen von Lidocain lagen mit 0,6-1,8 µg/ml nach der ersten Bolusgabe bzw. 1,5-3,3 µg/ml nach der zweiten ebenfalls in diesem Bereich und werden unter 4.2.6 eingehender diskutiert.

Durch Inkubation mit Lidocain (2-20 mM) und Bupivacain (0,4-4,4 mM) konnte die Freisetzung von LTB₄ aus stimulierten neutrophilen Granulozyten und Monozyten fast vollständig supprimiert werden (206). Daraus resultiert eine verringerte Aktivierung der neutrophilen Granulozyten mit reduzierter Chemotaxis (96). Eine *in vivo* durchgeführte Studie von MacGregor et al. bestätigte diese Beobachtung. Die Injektion von Lidocain (Bolus von 2,5 mg/kg) führte zu einer vorübergehenden Abnahme der Leukozytenadhäsion um 40% im Vergleich zur Kontrolle (129). Dieser Effekt dauerte bis zu 15 min nach Injektion an. Folgte der Bolusinjektion zusätzlich noch eine kontinuierliche Infusion (0,3 mg/kg/min), blieb die adhäsionshemmende Wirkung von Lidocain für die gesamte Dauer der Infusion bestehen.

Ähnliche Effekte konnten bei Patienten beobachtet werden, die Lidocain im Bolus (100 mg) zur antiarrhythmischen Therapie bekamen (129). In mehreren Studien konnte die hemmende Wirkung von Lidocain auf die Migration neutrophiler Granulozyten *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden (56,84,199).

Dabei war eine zentrale Beobachtung im Rahmen der antiinflammatorischen Effekte der LA, dass sie das Priming verhindern (61, 97,173). Darunter versteht man den Aktivierungsprozess neutrophiler Granulozyten aufgrund verschiedener Stimuli, während dessen Verlauf diese freie Radikale ($O^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH , $HOCL$) ausschütten und damit zu einer überschießenden Entzündungsreaktion beitragen können (129). Diesen Vorgang bezeichnet man auch als '*respiratory burst*'. Zu den Faktoren, die das Priming in neutrophilen Granulozyten auslösen können, gehören $TNF-\alpha$, IL-6, IL-8 und PAF (173). Dadurch kann es zur direkten Schädigung des betroffenen Gewebes kommen. Im physiologischen Aktivierungsprozess der neutrophilen Granulozyten kommt es dagegen nicht zu einer Schädigung des Gewebes (177). Lidocain ist in der Lage den '*respiratory burst*' in neutrophilen Granulozyten dosisabhängig ab einer Konzentration von 2-8 $\mu g/ml$ zu inhibieren (104). Dadurch wirken LA einer Schädigung des Gewebes entgegen.

Die Hypothese, dass LA nicht die physiologische Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, sondern nur selektiv deren Priming verhindern, würde erklären warum LA in der Lage sind, überschießende Inflammationsreaktionen zu verhindern, ohne zu einer erhöhten Infektanfälligkeit zu führen (173). Gestützt wird diese These durch Untersuchungen von Procopio et al. (181), die nur vorübergehende, minimale Veränderungen in der Immunfunktion gesunder Probanden nach Epiduralanästhesie mittels Lidocain fanden.

LA wirken auch hemmend auf Makrophagen. Die Freisetzung von Zytokinen, der '*respiratory burst*' und der Vorgang der Phagozytose in Makrophagen sind abhängig von dem in der Zelle vorherrschenden pH-Wert (96). Dieser wird unter anderem von membranständigen Protonentransportmolekülen und Membranpumpen (Na^+/H^+ -Austauschern) reguliert, an die LA binden können (90). Von Lidocain ist bekannt, dass es diese in humanen neutrophilen Granulozyten *in vitro* zu hemmen vermag (82). Lidocain verzögert zudem dosisabhängig die intrazelluläre pH-Regulation und den '*respiratory burst*' in Kaninchenmakrophagen *in vitro* (96). Durch die Hemmung des Na^+/H^+ -Austauschers in Makrophagen durch LA lassen sich ein Teil ihrer inhibitorischen Wirkungen auf diese Zellen erklären (96).

Ein weiterer Vorteil von Lidocain ist seine stabilisierende Wirkung auf die mikrovaskuläre Permeabilität. Dies zeigte sich in tierexperimentellen Modellen der säureinduzierten

Peritonitis (189), des mechanischen Ileus (160) und des Verbrennungstraumas (33). Durch topisches und intravenöses Lidocain konnte das Ausmaß der Albuminextravasation und Flüssigkeitssekretion in den einzelnen Studien signifikant gesenkt werden.

Die protektive Wirkung von intravenösem Lidocain auf die mikrovaskuläre Permeabilität ist jedoch dosisabhängig. In niedriger Dosierung (10 µg/kg/min) infundiert wirkt Lidocain vasokonstriktorisch und protektiv. In hohen Dosierungen (30 µg/kg/min) gegeben wirkt Lidocain vasodilatatorisch auf die glatten Muskelzellen der Gefäße, was eine Ödembildung und Extravasation begünstigen kann (96,111). Die in der vorliegenden Studie erreichten Plasmaspiegel von Lidocain nach Vernebelung lagen maximal bei 1,5 µg/ml. Damit ist eine ödemfördernde Wirkung des inhalierten Lidocains sehr unwahrscheinlich. Vielmehr liegen die nach Vernebelung erreichten Konzentrationen in einem niedrigen Bereich und wirken damit wahrscheinlich stabilisierend auf die mikrovaskuläre Permeabilität.

Aufgrund des oben geschilderten Wirkspektrums von Lidocain erschien die Erprobung zur inhalativen Therapie der pulmonalen Inflammationsreaktion während experimenteller Endotoxämie sinnvoll.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Hämodynamik

Die Parameter der Hämodynamik waren in der vorliegenden Studie neben Störungen im Säure-Basen-Haushalt keine primären Zielparameter, da therapeutisch eingegriffen wurde. Nach intravenöser Gabe von LPS kann initial typischerweise ein ausgeprägter Blutdruckabfall beobachtet werden, der nach 15 min sein Maximum erreicht (79). Auf diese akute Auswirkung von LPS auf den Blutdruck folgt eine prolongierte Phase der Hypotension, welche nach ca. 70 min beginnt und unbehandelt zum Tod führen kann (166). Diese Auswirkungen von LPS auf den MAP konnten auch in der vorliegenden Studie nachvollzogen werden.

Jedoch wurde mittels Volumen- und Katecholamingabe therapeutisch interveniert, um ein Absinken des MAP unter 80 mmHg zu verhindern und eine Minderdurchblutung der Organe, insbesondere der Lunge, zu vermeiden. Ziel war es auf diese Weise einer Störung der Mikrozirkulation mit einer daraus resultierenden Gewebshypoxie vorzubeugen, da Alveolarmakrophagen empfindlich auf Hypoxie und Entgleisungen des pH-Wertes reagieren (239).

Die Herzfrequenz war ab dem Zeitpunkt 120 min nach LPS-Gabe in allen endotoxämischen Gruppen signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Dies entspricht der klinischen Beobachtung, dass Patienten mit septischem Krankheitsbild häufig tachykard sind, was daher ein Definitionskriterium der Sepsis ist.

4.2.2 Lungenmechanik und Gasaustausch

Die initialen pathophysiologischen Veränderungen des ALI führen zu einer Abnahme der Compliance, einer Zunahme der Resistance und einer Beeinträchtigung des Gasaustausches mit Abfall des PaO₂ und Anstieg des PaCO₂ (136,225). Bei der vorgestellten Studie zeigten Resistance und Compliance während der Versuchsdauer keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Dies lag möglicherweise an der invasiven Beatmung der Versuchstiere. Die gewählte FiO₂ von 0,5 lag deutlich über derjenigen der Umgebungsluft und der eingestellte PEEP von 4 mbar sollte die Ausbildung atelektatischer Lungenbereiche mit Rechts-Links-Shunts verhindern.

Zudem sah das Protokoll ein Blähmanöver im Falle eines starken Abfalls der Tidalvolumina (>10%) vor, was zusätzlich einer Verschlechterung der Lungenmechanik und des Gasaustausches entgegenwirkte. Es ist denkbar, dass die pathologischen Veränderungen nicht ausgeprägt genug waren, um eine signifikante Beeinträchtigung der Lungenmechanik zu bewirken. Diskrete Veränderungen von Compliance und Resistance wurden durch das gewählte Beatmungsregime womöglich coupiert und sind der Analyse entgangen.

Der PaO₂ der Kontrollgruppe lag fast über die gesamte Versuchsdauer hinweg signifikant über dem der endotoxämischen Gruppen. Der PaCO₂ der LPS-only-Gruppe dagegen lag ebenfalls fast während der gesamten Versuchsdauer über dem der übrigen Versuchsgruppen. Dies spricht dafür, dass die intravenöse Gabe von LPS in der vorliegenden Studie eine signifikante Beeinträchtigung des Gasaustausches verursachte. Lediglich die Kontrollgruppe war von dem LPS-induzierten Abfall des PaO₂ ausgenommen. Alle Therapiegruppen erfuhren durch die inhalative bzw. intravenöse Gabe von Lidocain eine signifikante Verbesserung des Gasaustausches bezogen auf den PaCO₂ gegenüber der LPS-only-Gruppe. Zwischen den Therapiegruppen lag jedoch kein signifikanter Unterschied in der Höhe des PaCO₂. Da die LPS-only-Gruppe allerdings schon zu Versuchsbeginn signifikant höhere PaCO₂ aufwies, sind diese Veränderungen mit Zurückhaltung zu bewerten.

4.2.3 Blutbild

Die Hämoglobinkonzentration nahm in allen Versuchsgruppen vom Zeitpunkt 0 min bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes kontinuierlich ab. Dies ist mit den Blutentnahmen und der kontinuierlichen Infusion von Flüssigkeit sowie der Gabe von Volumen im Sinne eines Verdünnungseffektes zu erklären. Um vergleichbare Bedingungen zwischen den Versuchsgruppen zu schaffen, wurde der Kontrollgruppe und LPS-only-Gruppe eine entsprechende Blutmenge abgenommen, verworfen und isovolumetrisch ersetzt. Deswegen führten die Blutentnahmen zur Bestimmung der Lidocainplasmakonzentration weder in der i.v.-Gruppe noch in den Vernebelungsgruppen zu einem signifikanten Abfall der Hämoglobinkonzentration im Vergleich zu den übrigen Versuchsgruppen. Lediglich die Kontrollgruppe startete mit einem signifikant niedrigeren Hb-Wert als die übrigen Versuchsgruppen, was sich im weiteren Versuchsverlauf (ab 120 min) jedoch nivellierte. Eine pathophysiologische Erklärung für diesen Unterschied ist unwahrscheinlich, sondern vielmehr eine in der Norm befindliche, interindividuelle Schwankung der Ausgangs-Hb-Werte.

Die Thrombozytenzahlen der Kontrollgruppe liegen ab dem Zeitpunkt 180 min signifikant über dem der endotoxämischen Gruppen. Ein Abfall der Thrombozytenzahlen nach LPS-Injektion in Ratten konnte auch in anderen Studien beobachtet werden (203) und liegt mit 4 h nach LPS-Injektion in einem vergleichbaren zeitlichen Rahmen wie in der vorliegenden Studie. Eine isolierte Thrombozytopenie entwickelt sich häufig zu Beginn einer Septikämie und kann das erste Zeichen dafür sein, dass sich eine zuvor lokal begrenzte Entzündung systemisch ausbreitet (169). Eine Thrombozytopenie ist auch Teil des *'Systemic Inflammatory Response Syndrome'* (SIRS), der generalisierten Entzündungsreaktion des Organismus auf auslösende Faktoren (z.B. Endotoxin), welche mit Organbeteiligung definitionsgemäß eine Sepsis darstellt. Pathophysiologisch kommt es zum Verbrauch von Thrombozyten aufgrund einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) (158), was Meduri et al. auch bei Patienten mit ARDS beobachten konnten (140).

Auch der initiale Abfall der Leukozytenzahlen im peripheren Blut nach LPS-Injektion in der vorliegenden Studie deckt sich mit den Beobachtungen in anderen Untersuchungen. Ab dem Zeitpunkt 60 min liegen die Leukozytenzahlen aller endotoxämischen Gruppen signifikant unter denen der Kontrollgruppe. Zum Versuchsende gilt dies nur noch für Lid ae 0.4 was an einer zu großen Streuung der Werte in den übrigen endotoxämischen Gruppen liegen kann, so

dass es für diese nicht zum Erreichen des Signifikanzniveaus kam. Chang et al. (35) beobachteten ebenfalls direkt nach LPS-Injektion in Sprague-Dawley Ratten einen Abfall der peripheren Leukozytenzahlen, welche sich nach 6 h wieder dem Ausgangsniveau näherten. Neutrophile Granulozyten migrieren nach LPS-Injektion aus dem pulmonalen Gefäßbett in die Alveolen und lösen dort eine neutrophile Alveolitis aus, was eine Vorstufe des ALI darstellt (190,225). Dadurch kann es zur Abnahme der peripheren Leukozytenzahlen kommen.

In allen endotoxämischen Gruppen zeigte sich eine Abnahme der Lymphozytenzahlen über den Versuchszeitraum. Diese Veränderung des Blutbildes war in der Kontrollgruppe ab dem Zeitpunkt 180 min signifikant weniger ausgeprägt. Die Injektion von LPS führt zu einer starken Bindung der Lymphozyten an Endothelzellen (106) und nach intratrachealer Gabe von LPS wurde eine erhöhte Anzahl von Lymphozyten im entzündlichen Infiltrat der Lunge gefunden (174). Diese Wirkungen von LPS auf periphere Lymphozyten bieten eine Erklärung für deren Abnahme im peripheren Blut nach LPS-Injektion.

Die Zahl der segmentkernigen Granulozyten (SG) im peripheren Blut verhielt sich entgegengesetzt zu der der Lymphozyten: sie stieg über die Versuchszeit kontinuierlich an. Es deutete sich ein Trend an, dass die Zahl der SG in der Kontrollgruppe signifikant geringer anstieg als in den endotoxämischen Gruppen. Aufgrund zu großer Streuung ($p=0,051$ bei 300 min) der einzelnen Werte war dies jedoch nur zum Zeitpunkt 240 min für alle Gruppen und zum Zeitpunkt 180 min ausgenommen der LPS-only-Gruppe signifikant. Eine Zunahme der peripheren Granulozytenzahlen bei gleichzeitiger Abnahme der Lymphozyten- und Leukozytenzahlen konnte auch nach pulmonaler Deposition von LPS in Schafen (30) beobachtet werden. Diese von Bogden et al. beschriebenen Veränderungen des Blutbildes decken sich mit denen in der vorliegenden Studie nach Injektion von LPS.

4.2.4 Die Rolle der Alveolarmakrophagen im ALI

Die Lunge stellt ein großes Reservoir an Makrophagen dar, die sowohl interstitiell als auch alveolär lokalisiert sind. Alveolarmakrophagen (AM) besitzen pro- und antiinflammatorische Eigenschaften. Unter physiologischen Bedingungen supprimieren diese Zellen die Proliferation von Lymphozyten und dienen der mikrobiellen Erregerabwehr (177). Im aktivierten Zustand sind AM jedoch ähnlich wie neutrophile Granulozyten zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α (220), IL-1 β , IL-6 und IL-8 (117) befähigt.

Durch die Ausschüttung von Signallipiden und -peptiden können AM andere Zellen aktivieren (47,204). Durch diese Fähigkeiten nehmen AM eine Schlüsselrolle in der zellulären Immunabwehr der Lungen ein. Neben den neutrophilen Granulozyten sind AM daher Gegenstand intensiver Untersuchungen im Zusammenhang mit der Pathogenese von ALI und ARDS geworden.

Vergleicht man beide Zellpopulationen in der BAL septischer Patienten mit ALI, zeigt sich dass eine Anhäufung neutrophiler Granulozyten mit schwereren Krankheitsverläufen und einer schlechteren Prognose der Patienten assoziiert ist (211). Eine Zunahme der AM in der BAL septischer Patienten dagegen geht mit einer besseren Prognose und besserem Outcome einher. Dies lässt vermuten, dass AM eine wichtige Funktion in der Ausheilung des ALI einnehmen. Es ist eine generelle Beobachtung, dass sich die Zahl der Makrophagen und Monozyten in der Rückbildungsphase einer Entzündung im erkrankten Gewebe erhöht. Auch gibt es Hinweise dafür, dass dies ebenso für AM und Patienten mit ALI gilt (177,211). Bestätigt wurde dies von Domenici et al. (53) durch Beobachtungen an Ratten, denen Endotoxin intratracheal verabreicht wurde und deren Lungen 2, 3, 5, 8 und 15 Tage im Anschluß daran histologisch untersucht wurden: sie folgerten aus ihren Daten, dass AM eine Schlüsselrolle im Reperaturmechanismus zur Wiederherstellung der Lungenphysiologie nach endotoxin- bedingtem ALI einnehmen.

Neben diesen protektiven Fähigkeiten besitzen AM auch eine Reihe zytotoxischer, proinflammatorischer Eigenschaften. Makrophagen setzen sowohl in vitro (52,226) als auch in vivo (122,226) nach LPS-Stimulation vermehrt reaktive Stickstoffmetabolite (NO_2^- , NO, NO_2) frei. Dieser Effekt ist einerseits direkt über LPS vermittelt, andererseits indirekt über die vermehrte Freisetzung von $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, und $\text{IL-1}\beta$ (52,214). Nitrit ist das stabile Oxidationsprodukt von Stickstoffmonoxid (NO). Von zentraler Bedeutung für die Bildung von NO ist die induzierbare NO-Synthetase (iNOS). Wie in vielen anderen Zellpopulationen (neutrophile Granulozyten, Endothelzellen, Epithelzellen) wird die Aktivität der iNOS auch in AM nach Stimulation mit LPS oder proinflammatorischen Zytokinen wie $\text{IFN-}\gamma$, $\text{IL-1}\beta$ und $\text{TNF-}\alpha$ hochreguliert (237). Stickstoffradikale tragen durch Lipidperoxidation, DNA-Oxidation und Inaktivierung von Enzymen und Proteinen zu Schädigungen von Gewebe bei (s. 4.2.4). Diese gewebstoxischen Effekte resultieren aus einer direkten Toxizität der NO-Moleküle auf organische Strukturen und aus einer synergistischen Wirkung mit anderen Oxidantien, wie z.B. mit reaktiven Sauerstoffmetaboliten (123). Die Reaktion von NO mit Superoxidanionen führt zur Produktion von Stickstoffmetaboliten, die zum Teil ein größeres zytotoxisches Potential haben als NO oder O_2^- alleine (193,223). Ein Beispiel hierfür ist das

potente Zytotoxin Peroxynitrit (ONOO⁻). Auf der anderen Seite übernimmt NO neben der zytotoxischen Wirkung auch wichtige Funktionen bei der Zellprotektion und Signaltransduktion (123).

Warner et al. (226) beobachteten nach *in vitro* Stimulation von Alveolarmakrophagen mit IFN γ , TNF- α oder LPS eine zeit- und dosisabhängige Produktion von NO $_2^-$. In einer weiteren Untersuchung wurde LPS *in vivo* intrapulmonal appliziert. In der anschließend gewonnenen BALF war der Gehalt an NO $_2^-$ signifikant höher als bei unbehandelten Kontrolltieren. Die Alveolarmakrophagen aus den LPS-Tieren produzierten zudem vermehrt NO $_2^-$.

Bei Patienten mit sepsisassoziiertem ARDS fanden Kobayashi et al. (117) in der BALF signifikant höhere NO $_2^-$ -Konzentrationen als bei Lungengesunden oder langzeitbeatmeten Sepsispatienten ohne ARDS. Des Weiteren konnten sie nur in der ARDS-Gruppe eine iNOS-Expression in Alveolarmakrophagen nachweisen. Zudem fanden sich signifikant höhere Konzentrationen von IL-6 und IL-8 in der BAL der ARDS-Gruppe, als in den Vergleichsgruppen. Hieraus folgerten sie, dass AM durch Freisetzung von Stickstoffmetaboliten und proinflammatorischen Zytokinen wesentlich am septischen Lungenschaden beteiligt sind. Diese Vermutung wird durch zahlreiche Studien bestärkt:

Durch Inaktivierung der AM durch intratracheale Gabe von liposomalem Chlodronat konnte der aspirationsbedingte Lungenschaden im Tiermodell signifikant verringert werden. Die Behandlung der AM mit liposomalem Chlodronat resultierte in einer signifikant verringerten Expression der mRNA bzw. Produktion proinflammatorischer Mediatoren und signifikant verringertem neutrophilem Rekrutment (18).

Auch für den durch akut nekrotisierende Pankreatitis ausgelösten ALI konnte im Tiermodell eine entscheidende Beteiligung der AM am Krankheitsverlauf gezeigt werden (36). Weiterführende Untersuchungen legen nahe, dass eine CD40-vermittelte Aktivierung der AM wesentlich zum LPS- induzierten ALI beiträgt (86).

Durch gezielte Hypothermie (27°C) konnten Lim et al. (125) in endotoxämischen Ratten die Aktivierung des Transkriptionsregulators NFkappaB und die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-1 β) durch AM signifikant verringern. Auch die Zahl neutrophiler Granulozyten in der BAL war in den hypothermen Rattenlungen signifikant geringer als bei Normothermie. Lim et al. (125) sehen durch diese Beobachtung die Vermutung bestätigt, dass einer Rekrutierung neutrophiler Granulozyten im septischen Lungenschaden eine Aktivierung von AM vorausgeht. Die Aktivierung nukleärer Transkriptionsfaktoren (NFkappaB) mit konsekutiver Expression proinflammatorischer

Zytokine durch AM ist demnach proximal lokalisiert, das Rekrutment der neutrophilen Granulozyten distal (125).

Gestützt werden diese Aussagen durch kürzlich veröffentlichte Ergebnisse von Beck-Schimmer et al. (19): AM-depletierte Ratten zeigten im Vergleich zu AM-kompetenten Tieren nach intratrachealer LPS-Gabe einen um 320% gesteigerten interstitiellen und alveolären Einstrom neutrophiler Granulozyten. Zudem war die Konzentration von Monozyten chemotaktisch anziehendem Protein-1 (MCP1) in Abwesenheit von AM in der BAL der betreffenden Tiere deutlich erhöht. Durch Neutralisierung des MCP1 konnte der Einstrom neutrophiler Granulozyten verringert werden. Hieraus folgerten Beck-Schimmer et al., dass AM eine wichtige Rolle im LPS-induzierten ALI spielen. Die Hinweise für eine Beteiligung der AM an dem Entstehungsprozess des ALI und dessen Resolutionsphase sind zahlreich und ihre Rolle im Krankheitsgeschehen bei der Entwicklung einer effektiven Therapie definitiv mit zu berücksichtigen.

In der vorliegenden Studie waren AM mit 91% die dominierende Zellpopulation in der BALF aller Gruppen. Die Mediane der einzelnen Versuchsgruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Zudem produzierten die AM aller endotoxämischen Gruppen NO, was für eine Aktivierung dieser Zellen durch LPS in der vorliegenden Studie spricht. Die AM der Kontrollgruppe taten dies nicht. Es ist somit wahrscheinlich, dass die in der vorliegenden Studie gemessenen Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine in der BALF der Versuchstiere fast ausschließlich dieser Zellpopulation entstammen.

4.2.5 Nitritfreisetzung aus Alveolarmakrophagen

Stickstoffmonoxid ist ein second-messenger Molekül mit sehr kurzer Halbwertszeit, welches von NO-Synthetasen produziert wird. Nitrit ist das stabile Oxidationsprodukt von NO. Unter physiologischen Bedingungen wird NO in den Lungen von zwei Isoformen der NO-Synthetase produziert: von der neuronalen (nNOS) oder der endothelialen NO-Synthetase (ecNOS), die in Epithelzellen, Endothel sowie cholinergen und nicht-cholinergen Nervenfasern enthalten sind (68). LPS und proinflammatorische Zytokine (TNF α , IL-1 β , INF γ) bewirken in vielen Zellsystemen (Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Epithel-, Endothelzellen) die Induktion einer dritten Isoform, der induzierbare NO-Synthetase (iNOS) (80,118,191,196). Untersuchungen an iNOS-defizienten knock-out Mäusen haben gezeigt,

dass die beiden vorrangig aktiven Isoformen der NOS, nNOS und eNOS, bei fehlender iNOS deren Aufgabe nach LPS-Stimulation nicht übernehmen (120).

In welcher Form die iNOS zur Pathogenese des ALI beiträgt, ist nicht abschließend geklärt. Kristof et al. (120) führten daher Untersuchungen an iNOS-defizienten knock-out Mäusen durch, die nach LPS-Injektion signifikant mildere Verläufe eines ALI zeigten, als die Kontrolltiere. Beobachtungen, wonach NO die Migration von neutrophilen Granulozyten und die Produktion von Zytokinen hemmt, legen die Vermutung nahe, dass NO eine protektive Rolle im Rahmen des ALI einnimmt (26,107). Zudem verstärkten NO-Inhibitoren in einigen Untersuchungen das Ausmaß des ALI (120).

Andererseits führt eine Überproduktion von NO durch die iNOS in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten zur Gewebeschädigung im septischen Schock und kann zum Multi-Organ Versagen (MOV) beitragen (96). Mitverantwortlich hierfür ist die Reaktion von NO mit anderen Radikalen, wodurch es zur Bildung von Peroxynitriten kommt, die zum Teil höheres zytotoxisches Potential besitzen als NO selbst (193,223). Das zytotoxische Potential dieser gebildeten Stickstoffradikale beruht auf der Oxidation von DNA, Enzymen, Zellmembranen und Proteinen, was schließlich zur Gewebsschädigung führt. Dies erklärt, warum in manchen Studien mittels NOS-Inhibitoren eine klinische Milderung des ALI bei signifikanter Reduzierung der Peroxynitritproduktion erzielt werden konnte (14,236). Gründe für die kontroversen Ergebnisse können neben der geringen Spezifität der NOS-Inhibitoren in der Tatsache liegen, dass nicht dargestellt wurde, welche der Isoformen der NOS zur erhöhten NO-Konzentrationen beitrug (120). NO übt vermutlich verschiedene Effekte aus, je nachdem welche Isoform der NOS beteiligt ist und aus welcher Zellpopulation es stammt (143).

Die LPS-induzierte NO-Produktion durch *ex vivo* kultivierte AM konnte in der vorliegenden Studie durch inhaliertes Lidocain ab einer Dosis von 0.4 mg/kg signifikant supprimiert werden. Eine Steigerung der Dosis auf das Zehnfache bewirkte keine darüber hinausgehende Hemmung der NO-Produktion.

In der vorliegenden Studie deutete sich ein Trend an, dass die hoch dosierte Inhalation von Lidocain eine stärker supprimierende Wirkung auf die NO-Produktion hat als die intravenöse Gabe (48,5% vs. 19,3%). Auf die Menge des eingesetzten Stoffes bezogen ergab die Vernebelung eines Zehntels der intravenös verabreichten Menge eine mindestens gleich starke Supprimierung der pulmonalen NO-Freisetzung wie durch die intravenöse Gabe von Lidocain (50,9% vs. 19,3%). Dies deutet auf eine bessere Wirksamkeit von vernebeltem

Lidocain bezüglich der NO-Produktion in AM gegenüber systemisch verabreichtem Lidocain hin.

Wie von Warner et al. (226) beobachtet, kam es auch in der hier vorliegenden Studie nach Stimulation mit LPS zur vermehrten Freisetzung von NO aus *ex vivo* kultivierten AM. Wurden diese *in vitro* erneut mit LPS stimuliert, setzten die AM aller drei Therapiegruppen erneut NO frei. Dies bedeutet, dass die NO-Freisetzung durch AM nicht dauerhaft von Lidocain inhibiert wurden. Ein Grund hierfür könnte die kurze Halbwertszeit von Lidocain sein, die nach einmaliger, intravenöser Applikation beim Menschen dosisabhängig (1-2 mg/kg) bei ca. 15-20 min liegt.

Wie auch von DeMeester et al. (46) postuliert, gilt für die NO-Produktion im septischen Geschehen wahrscheinlich, dass sowohl eine zu geringe, als auch eine überschießende Freisetzung schädlich ist. Wünschenswert wäre demzufolge ein physiologisches Maß an NO-Produktion im septischen Geschehen, bei dem die protektiven, stabilisierenden Eigenschaften noch erhalten sind und die zytotoxische Wirkung noch nicht einsetzt. In beiden Vernebelungsgruppen (Lid ae 0.4 und Lid ae 4) war in der vorliegenden Studie die NO-Freisetzung auf 1,6 (1,12) bzw. 1,68 (0,84) $\mu\text{mol/ml}$ gesenkt (Median (IQR)). Damit liegen ihre Konzentrationen genau in der Mitte zwischen den Werten der Sepsisgruppe (LPS-only = 3,26 (1,94) $\mu\text{mol/ml}$) und der Kontrollgruppe (Control = 0 (0) $\mu\text{mol/ml}$). Ob damit das von DeMeester et al. postulierte Optimum an NO-Produktion im septischen Geschehen getroffen wurde, ist unklar. Interessanterweise vermochte inhaliertes Lidocain bereits in geringen Mengen mit NO einen potenten Induktionsfaktor des ALI signifikant zu inhibieren.

4.2.6 Zytokinkonzentrationen

„Zytokine sind von vielen Zellen gebildete und sezernierte Proteine, die das Verhalten oder die Eigenschaften anderer Zellen verändern“ (Psyhyrembel, medizin. Wörterbuch). Sie bilden eine heterogene Gruppe von mehr als 40 verschiedenen Proteinen, von denen einige zur Pathogenese des ALI beitragen (91,212). In der akuten Phase des ALI sezernieren stimulierte Alveolarmakrophagen die Zytokine Interleukin (IL-) 1, 6, 8 und 10 sowie TNF- α . Diese lokal wirksamen Zytokine ziehen neutrophile Granulozyten chemotaktisch an, was zu deren Stimulation und Aktivierung führt (225).

Im weiteren Verlauf des ALI werden ortständige Alveolarmakrophagen stimuliert und setzen ihrerseits ebenfalls proinflammatorische Zytokine frei, wodurch der Entzündungsprozess fortschreitet und das umliegende Gewebe geschädigt wird. Im gesunden alveolären Milieu befinden sich pro- und antiinflammatorische Zytokine im Gleichgewicht: IL-1 Rezeptorantagonist (IRAP) (71), Antikörper gegen IL-8, löslicher TNF- α Rezeptor, IL-10 und IL-11 (177,225) bilden ein Gegengewicht zu den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 und TNF- α . Dieses Gleichgewicht wird durch die überschüssende Produktion proinflammatorischer Zytokine gestört – es kommt zum Überwiegen der entzündungsfördernden Zytokine, was durch die physiologisch vorhandenen antiinflammatorischen Zytokine nicht mehr ausgeglichen werden kann (225). Eine pathologische, überschüssende Entzündungsreaktion ist die Folge.

Meduri et al. (142) wiesen nach, dass eine im Krankheitsverlauf fortwährende Erhöhung proinflammatorischer Mediatoren in der BAL erkrankter Patienten eine schlechte Prognose nach sich zieht. In ihrer Studie waren die BAL- Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-8 am ersten Tag des ARDS bei Überlebenden signifikant niedriger als bei Patienten, die an der Krankheit verstarben. Neben der akuten Phase der Erkrankung spielen Zytokine auch in der Reparatur- und Regenerationsphase, die sich an den ALI anschließt, eine wichtige Rolle (135).

4.2.6.1 Zytokinkonzentrationen im Plasma

4.2.6.1.1 Kinetik der Zytokinfreisetzung

Bei den vorgenommenen Messungen der Zytokinkonzentrationen im Plasma der Versuchstiere spielen die Kinetik der Zytokinfreisetzung und der Messzeitpunkt eine wichtige Rolle. An LPS-stimulierten peripheren humanen mononukleären Zellen (PBMC) untersuchten Janský et al. (108) die Kinetik der Zytokinproduktion. Dabei kamen sie mit vorangegangenen Untersuchungen (34,44) übereinstimmend zu dem Ergebnis, dass TNF- α und IL-1 β frühzeitig nach LPS-Stimulation freigesetzt werden, gefolgt von IL-6. Erst im späteren Verlauf werden weitere proinflammatorische Zytokine wie IL-12 und IFN γ freigesetzt. Auch Beutler et al. (24) kamen bei ihren Untersuchungen zur Kinetik der TNF- α Freisetzung zu dem Ergebnis, dass TNF- α frühzeitig nach LPS-Stimulation freigesetzt wird. Bei Kaninchen wurden zwei Stunden nach LPS-Injektion die höchsten TNF- α Konzentrationen im Plasma gemessen.

Dass dies nicht nur bei Tieren, sondern auch bei Menschen der Fall ist, konnten Michie et al. (145) an gesunden Probanden zeigen: 90-180 Minuten nach intravenöser Gabe von Endotoxin

(4 ng/kg) stiegen die TNF- α Konzentrationen im Plasma der Probanden auf maximale Werte an, um im weiteren Verlauf wieder auf das Ausgangsniveau abzusinken. Die Kinetik der Freisetzung von IL-1 β nach LPS-Injektion ist der von TNF- α sehr ähnlich. Hesse et al. (89) beschrieben maximale IL-1 β Plasmakonzentrationen zwei Stunden nach Endotoxininjektion bei gesunden Probanden.

In der vorliegenden Studie wurden die Proben zur Bestimmung der Zytokinkonzentrationen fünf Stunden nach LPS-Injektion entnommen. Damit wurden gemäß den oben zitierten Studien die maximalen Zytokinkonzentrationen im Plasma der Versuchstiere nicht vollständig erfasst. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Messungen, zwei Stunden nach Erreichen der höchsten Konzentrationen immer noch aussagekräftige Daten lieferten. Durch mehrfache Abnahmen von Blutproben nach LPS-Gabe hätte sich die Darstellung einer Zytokinkinetik realisieren lassen. Allerdings könnte die Entnahme der dazu erforderlichen Blutmenge bei kleinen Versuchstieren wie der Ratte zu Beeinträchtigung des Volumenstatus und damit zu einer zusätzlichen Manipulation der physiologischen Parameter führen, die nicht primär mit der Wirkung von LPS verknüpft sind. Eine Verfälschung der Messdaten im Sinne einer nicht LPS-assoziierten Irritation der Hämodynamik durch diese vermehrten Blutentnahmen wäre daher nicht auszuschließen. Solche zusätzlichen repetitiven Entnahmen wurden in der vorliegenden Studie nicht durchgeführt.

In zahlreichen Studien der LPS-induzierten pulmonalen Inflammationsreaktion wurden Blutentnahmen in den gleichen Zeiträumen wie in der vorliegenden Studie durchgeführt und lieferten verwertbare Ergebnisse bezüglich der Zytokinkonzentrationen im Plasma (92,149,161,162).

4.2.6.1.2 Systemische Wirksamkeit von inhaliertem und intravenösem Lidocain

Die intravenöse Gabe von LPS führte zu einem signifikanten Anstieg der Plasmakonzentrationen aller gemessener Zytokine im Vergleich zur Kontrollgruppe. In keiner der Therapiegruppen kam es zu einer signifikanten Senkung dieses LPS-induzierten Anstiegs der Zytokinkonzentrationen im Plasma. Die von anderen Autoren (116,163,217) beschriebenen Effekte systemisch verabreichten Lidocains konnten in der vorliegenden Studie nicht reproduziert werden. Der Grund dafür liegt vermutlich in der unterschiedlichen Applikationsweise von Lidocain und der Tatsache, dass in den einzelnen Studien unterschiedliche Spezies als Versuchstiere verwendet wurden.

Das vorliegende Versuchsprotokoll sah eine Bolusinjektion von Lidocain (4 mg/kg) bei Ratten im Abstand von zwei Stunden vor. Die Studien von Takao et al. (217), Nishina et al. (163) und Kiyonari et al. (116) sahen in ihren Protokollen nach der Bolusinjektion (2 mg/kg KG) eine kontinuierliche Lidocaingabe von 2 mg/kg/h bei Kaninchen über die gesamte Versuchszeit vor. Diese betrug in der Studie von Takao et al. (217) bis zu 36 Stunden.

Die Wirkdauer von Lidocain nach initialer Bolusgabe (1-2 mg/kg) liegt bei 15-20 min. Es ist denkbar, dass in der vorliegenden Studie dieses kurze Zeitfenster nicht ausgereicht hat, um eine hemmende Wirkung auf die endotoxinbedingte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine im Plasma der Versuchstiere zu entfalten. Im Gegensatz dazu führt eine kontinuierliche Infusion von 2 mg Lidocain/kg über die gesamte Versuchszeit zu konstanten und zu höheren Plasmaspiegeln mit potentiell stärkerer Wirkung. Folglich könnte die antiinflammatorische Wirkung ausgeprägter und prolongierter sein als nach zweimaliger Bolusgabe von Lidocain im Abstand von zwei Stunden. Ein dritter, wesentlicher Unterschied zwischen den zitierten Studien und der vorliegenden Untersuchung liegt in der Gesamtmenge des intravenös applizierten Lidocains. Takao et al. (217) verabreichten während des Versuchszeitraums von 36 h eine achtfach höhere Gesamtdosis an Lidocain im Vergleich zur vorliegenden Studie. Zur besseren Vergleichbarkeit der Gruppen wurde in der vorliegenden Studie die gleiche Substanzmenge inhalativ und intravenös verabreicht, um für die Ergebnisbetrachtung vergleichbare Bedingungen zu schaffen.

Ein weiterer Unterschied liegt in dem Modell der pulmonalen Inflammationsreaktion: Nishina et al. wählten hierfür die intratracheale Applikation von Salzsäure (163), Takao et al. eine Beatmung mit reinem Sauerstoff (218) und Kiyonari et al. die Infusion von Phospholipase A2 und Lipase (116). Diese Versuche fanden im Kaninchenmodell statt. In der vorliegenden Studie wurden die Untersuchungen an Sprague-Dawley Ratten durchgeführt. Die erwähnten Unterschiede in den Versuchsprotokollen und den verwendeten Spezies könnten eine Erklärung liefern für die unterschiedlichen Beobachtungen bezüglich der Wirksamkeit von intravenös verabreichtem Lidocain in der experimentell induzierten Inflammationsreaktion der Lunge.

Da es sich bei Lidocain um ein lipophiles Anästhetikum handelt, kommt es nach dessen intravenöser Gabe zur Umverteilung im Gewebe. Aus dem Blut (Kompartiment I) gelangen Lokalanästhetika rasch in gut durchblutete Organe (Kompartiment II). Anschließend kommt es zur Rückverteilung in das Blut und Fettgewebe des Organismus (Kompartiment III). Lidocain selbst neigt jedoch dazu, pulmonal zu akkumulieren (178,179). Das bedeutet, dass nach systemischer Gabe die Konzentrationen von Lidocain im Lungengewebe höher sind, als

in anderen Organen. Die kontinuierliche Infusion von Lidocain über 36 Stunden führt demnach möglicherweise zu höheren pulmonalen Gewebespiegeln als die zweimalige Bolusinjektion in der vorliegenden Studie. Die längere Infusionsdauer und die größere Menge eingesetzten Lidocains resultierten daher vermutlich in einer stärkeren Anreicherung von Lidocain im Lungengewebe. Die antiinflammatorische Wirkung von Lidocain auf die dort stattfindenden Entzündungsprozesse wäre folglich stärker und würde erklären, warum systemisch verabreichtes Lidocain in den zitierten Studien (116,163,217) die beobachteten Effekte hatte, nicht jedoch in der Vorliegenden.

Die nach Inhalation von Lidocain gemessenen Plasmaspiegel liegen deutlich unter denen nach intravenöser Gabe. In der vorliegenden Studie zeigte vernebeltes Lidocain eine dosisabhängige Wirkung auf die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine in der BALF. Da die Wirksamkeit von Lidocain in der vorliegenden Studie dosisabhängig ist, ist es bei den geringen Plasmaspiegeln von Lidocain nach Inhalation verständlich, dass in keiner der Vernebelungsgruppen eine signifikante Senkung der Zytokinkonzentrationen im Plasma nachzuweisen war.

4.2.6.2 Zytokinkonzentrationen in BALF

Zahlreiche Studien konzentrierten sich in ihren Bemühungen, den septischen Lungenschaden zu behandeln, auf die Konzentrationen der freigesetzten Zytokine in Plasma und BALF, als Maßstab für die Effektivität der Therapieansätze (92,141,142,148,162,217). Wie eingangs erwähnt gelten einige von ihnen als zentrale Mediatoren im Entzündungsgeschehen der pulmonalen Inflammationsreaktion des ALI/ARDS. Pittet et al. (177) bezeichneten TNF- α und IL-1 β gemeinsam mit IL-8 als die wichtigsten und in ihrer Beziehung zur Entwicklung des ALI am besten erforschten Zytokine.

Die Kinetik von Zytokinen in der BALF ist aus methodologischen Gründen schwieriger zu bestimmen als im Plasma. Stüber et al. (213) untersuchten die Auswirkungen verschiedener Beatmungsmodi auf die Zytokinfreisetzung in der BALF von Patienten mit ALI. Die Patienten wurden mit einem lungenprotektiven Beatmungsverfahren mit niedrigen Tidalvolumina (5 ml/kg KG) und hohem PEEP (15 cmH₂O) beatmet und anschließend über sechs Stunden auf ein konventionelles Beatmungskonzept (V_t = 12 ml/kg KG, PEEP = 5 cmH₂O) umgestellt. Vor Beginn der Umstellung auf das konventionelle Beatmungsschema sowie eine und sechs Stunden danach wurde eine BAL durchgeführt. Dabei fanden sich die

höchsten Konzentrationen von TNF- α und IL-1 β eine Stunde nach Umstellung von der lungenprotektiven auf das konventionelle Beatmungsschema (213).

Über die Kinetik proinflammatorischer Zytokine in der BALF septischer Patienten mit ALI ist wenig bekannt. Aufgrund der Beobachtungen von Stüber et al. (201) lässt sich nur vermuten, dass die Kinetik proinflammatorischer Zytokine im Verlauf des ALI in der BALF derjenigen im Plasma ähnelt. Für eine genaue Erfassung der Kinetik der Zytokinkonzentrationen in der BALF endotoxämischer Ratten hätten in der vorliegenden Studie wiederholt broncho-alveoläre Lavagen zu festgelegten Zeitpunkten des Versuchsprotokolls durchgeführt werden müssen. Dies ist bei einem Tier von der Größe einer Ratte technisch nicht realisierbar.

In zahlreichen Studien der LPS-induzierten pulmonalen Inflammationsreaktion wurden broncho-alveoläre Lavagen im gleichen Zeitraum wie in der vorliegenden Studie gewählt durchgeführt und lieferten verwertbare Ergebnisse bezüglich der Zytokinkonzentrationen (92,149,161,162).

4.2.6.2.1 Tumornekrosefaktor α

Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), auch Kachektin genannt, wird im Verlauf des ALI vor allem durch Alveolarmakrophagen und neutrophile Granulozyten frühzeitig freigesetzt und gilt als wichtiger Faktor in der Pathogenese des septischen Schocks (60). Injektion von Endotoxin (LPS) bewirkt eine Freisetzung von TNF- α . Die Konzentrationen im Plasma erreichen bei gesunden Probanden 1-2 Stunden nach Injektion niedriger Dosen Endotoxins ihren Höhepunkt und fallen 6-8 Stunden danach unter die Nachweisgrenze ab (145). Die Freisetzung von TNF- α induziert in anderen Zellen seinerseits die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β an und bewirkt eine Sequestration und Degranulation von neutrophilen Granulozyten in der Lunge (152).

Durch die Blockade des TNF- α Rezeptors konnte der sepsisbedingte Lungenschaden im Schwein (234), sowie ein aspirationsbedingter Lungenschaden in Ratten (71) begrenzt werden. Auch bei tierexperimenteller Bakteriämie und Endotoxinämie in Ratten lies sich durch die Gabe von TNF-Antikörpern die Letalität verringern (114).

Diese tierexperimentellen Erfolge konnten in klinischen Studien jedoch nicht wiederholt werden. Durch eine Neutralisation des TNF- α Moleküls ließ sich die Letalität von Patienten mit septischem Krankheitsbild nicht verringern. Weder durch die Infusion eines Fusionsdimers aus extrazellulärem TNF- α Rezeptor und dem Fc-Teil von IgG₁ (TNFR:Fc) durch Fischer et al. (62), noch durch die Gabe von TNF-Antikörpern (p55-IgG) durch Pittet et

al. (176) war in klinischen Studien ein Überlebensvorteil für die betroffenen Patienten zu erzielen. Vielmehr waren mittlere und hohe Dosen von TNFR:Fc mit einer erhöhten Mortalität assoziiert.

Die Aussagekraft der TNF- α Konzentrationen bezüglich des Krankheitsverlaufs werden kontrovers diskutiert. Die Konzentrationen von TNF- α in BALF oder Plasma von Patienten mit septischem Krankheitsbild stehen nicht in eindeutiger Relation zu dem Risiko einen ALI zu entwickeln oder im Krankheitsverlauf zu versterben. Meduri et al. (141,142) fanden bei Patienten mit ARDS, die verstarben, signifikant höhere Konzentrationen von TNF- α in der BAL im Vergleich zu denen, die überlebten.

Agouridakis et al. untersuchten Patienten mit ARDS und Patienten mit Risikofaktoren für ein ARDS. Dabei korrelierte die Höhe der TNF- α Konzentrationen in der BALF der Patienten reziprok mit dem Horowitz-Quotienten und direkt mit dem APACHE II Score. Des Weiteren fanden sich im Serum der Patienten, die verstarben, höhere Konzentrationen an TNF- α als bei Überlebenden (9). Auch Marks et al. konnten eine Korrelation zwischen der Höhe der TNF- α Konzentration im Plasma septischer Patienten und der Wahrscheinlichkeit ein ARDS zu entwickeln, sowie der Schwere des sich entwickelnden ARDS und der Mortalität der Patienten aufzeigen (133).

Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen stehen die Ergebnisse zahlreicher anderer Studien, die keine Korrelation zwischen den Konzentrationen von TNF- α in Serum oder in der BALF von Intensivpatienten und deren Überlebensrate oder dem Risiko ein ARDS zu entwickeln finden konnten (102,139,164,177,192).

Grund für diese unterschiedlichen Beobachtungen könnte das bereits erwähnte schmale Zeitfenster sein, in dem maximale TNF- α Konzentrationen nachgewiesen werden können, sowie die unterschiedlichen Verfahren zum Nachweis von TNF- α , die in den einzelnen Studien verwendet wurden (177). TNF- α gilt jedoch als ein wesentlicher Faktor im Geschehen der frühen zytokinvermittelten Entzündungsreaktion, wie sie beim ALI/ARDS auftritt. Ein frühes Absinken initial erhöhter Konzentrationen in BAL und Serum betroffener Patienten deutete in zahlreichen Studien auf einen Rückgang der pulmonalen Inflammationsreaktion und damit auf einen milderen Krankheitsverlauf mit verbesserten Überlebenschancen für den Patienten hin (s.o.).

In der vorliegenden Studie führte die intravenöse Gabe von Lidocain zu einer signifikanten Senkung der Konzentration von TNF- α in der BALF. Diese Beobachtung stimmt mit anderen

Untersuchungen überein, in denen systemische Injektion von Lidocain eine Senkung der TNF- α Konzentrationen in der BALF bewirkte (147,161,217).

Die hochdosierte Vernebelung (4 mg/kg) von Lidocain führte in der vorliegenden Studie ebenfalls zu einer signifikanten Supprimierung des LPS-induzierten Anstiegs von TNF- α in der BALF. Die niedrigdosierte Vernebelung (0,4 mg/kg) erwies sich diesbezüglich als nicht wirksam. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie lässt sich schließen, dass die Vernebelung von Lidocain dosisabhängig zu einer Supprimierung von TNF- α in der BALF führt und bei gleicher eingesetzter Menge diesbezüglich ebenso wirksam ist wie intravenös gegebenes Lidocain.

4.2.6.2.2 Interleukin-1 β

IL-1 β ist neben TNF- α ein weiteres proinflammatorisches Zytokin, welches in der frühen Phase des ALI freigesetzt wird und zu einer überschießenden Inflammation der Lunge beiträgt (171,182). Zu den Wirkmechanismen von IL-1 β zählen die Induktion der Cyclooxygenase 2 und Expression der induzierbare NO-Synthetase. IL-1 β bewirkt die Expression von Zytokinen wie TNF- α und IL-6, sowie die vieler anderer Chemokine und wirkt zudem zytotoxisch (51). Darüber hinaus induziert IL-1 β die Expression verschiedener Gewebsproteasen, wirkt stimulierend auf das Knochenmark und vermittelt die Freisetzung von neutrophilen Granulozyten (49). Alveolarmakrophagen und neutrophile Granulozyten sind gleichermaßen in der Lage, IL-1 β zu bilden (59,117). Auf AM, neutrophile Granulozyten und Lymphozyten wirkt IL-1 β chemotaktisch und stimulierend (157,205).

Parsey et al. (171) folgerten aus ihren tierexperimentellen Untersuchungen, dass die Freisetzung von IL-1 β neben anderen proinflammatorischen Zytokinen wesentlich zum akuten Lungenschaden beiträgt.

IL-1 β konnte auch in der BALF von Patienten mit ALI/ARDS in erhöhtem Maße nachgewiesen werden (205,215); darüber hinaus korrelierten erhöhte Plasmakonzentrationen von IL-1 β mit einer erhöhten Mortalität von Patienten mit septischem Krankheitsbild (87).

Der natürlich vorkommende IL-1 Rezeptorantagonist (IRAP) ist ein kompetitiver Inhibitor von IL-1 β mit gleicher Bindungsaffinität zum IL-1 Rezeptor (IL-1R), löst durch seine Bindung an IL-1R jedoch keine intrazelluläre Antwort aus (13,151). IRAP konnte in der BALF von Patienten mit ARDS nachgewiesen werden (73). Unter physiologischen Bedingungen stehen IL-1 β und sein Antagonist IRAP in einem Verhältnis von 1:1 (177). Bei Patienten mit ARDS erhöht sich dieses Verhältnis jedoch auf bis zu 10:1 (IL-1 β :IRAP), was

die Schlussfolgerung zulässt, dass ein Teil der proinflammatorischen Wirkung von IL-1 β nicht länger durch IRAP antagonisiert (73) wird.

Durch die Gabe von IRAP konnte in tierexperimentellen Studien eine klinische Verbesserung des septischen Krankheitsbildes erzielt werden. Dazu zählten die Stabilisierung der Hämodynamik (10), eine verminderte pulmonale NO-Produktion und ein verbessertes Überleben (49). Zudem gibt es Hinweise, dass die Gabe von IRAP das Überleben septischer Patienten verbessert, wenn diese initial ein hohes Mortalitätsrisiko (>24%) aufweisen (63). Patienten mit einer initialen IL-6 Konzentration von über 100 pg/ml zeigten zudem einen dosisabhängigen Überlebensvorteil nach Gabe von IRAP (64). Diese und die zuvor genannten Beobachtungen unterstreichen die zentrale Bedeutung, die IL-1 β im Verlauf des septischen Krankheitsgeschehens und in der Pathogenese der überschüssigen pulmonalen Inflammationsreaktion hat. Die Bestimmung von IL-1 β in BALF und/oder Serum septischer Patienten ist ein etabliertes Verfahren zur Bestimmung des Ausmaßes der Inflammationsreaktion in den betroffenen Systemen.

In der vorliegenden Studie wurde der LPS-induzierte Anstieg von IL-1 β in der BALF durch die intravenöse Gabe von Lidocain signifikant supprimiert. Dies deckt sich mit den Beobachtungen anderer Studien (147,163). Die hochdosierte Vernebelung von Lidocain (Lid ae 4) erwies sich diesbezüglich ebenfalls als wirksam. Im Gegensatz dazu führte die niedrigdosierte Vernebelung von Lidocain (Lid ae 0.4) zu keiner Erniedrigung der IL-1 β Konzentrationen in der BALF. Dies lässt zum einen auf eine dosisabhängige Wirkungsbeziehung des inhalierten Lidocains schließen und zeigt zudem, dass bei gleicher eingesetzter Menge die Vernebelung von Lidocain gleichwirksam ist wie die intravenöse Gabe, bezogen auf die Konzentrationen von IL-1 β in der BALF.

4.2.6.2.3 Interleukin-6

IL-6 ist ein Zytokin mit einem vielfältigen biologischen Wirkungsspektrum, welches von lymphatischen und nicht-lymphatischen Zellen gebildet wird. Es ist beteiligt an der Immunantwort, der Akuten Phase Reaktion, Entzündungsprozessen, Onkogenese und Hämatopoese (210). Erhöhte Serumkonzentrationen von IL-6 finden sich unter zahlreichen pathologischen Bedingungen wie bakteriellen und viralen Infektionen, Traumata, autoimmunologische Prozesse, Entzündungen und malignen Erkrankungen (105). Nach

Injektion von Endotoxin erreichen die Plasmakonzentrationen bei gesunden Probanden nach zwei bis vier Stunden ihr Maximum (65).

Die Freisetzung von IL-6 wird durch viele verschiedene Stimuli wie TNF- α , IL-1 β , IL-2, Endotoxin, Viren (HIV), Proteinkinase C oder Interferon β getriggert. Im Gegensatz dazu inhibieren IL-4 und IL-13 dessen Produktion (210). Im Ablauf des zytokinvermittelten Entzündungsprozesses ist IL-6 distal von TNF- α und IL-1 β lokalisiert und verbleibt wesentlich länger als diese im Plasma. In einigen Studien konnte eine positive Korrelation zwischen der Höhe der IL-6 Konzentrationen im Plasma und der Sterblichkeitsrate der Patienten nachgewiesen werden (141).

Patel et al. (172) veröffentlichten 1994 eine Studie, in der die gemessenen IL-6 Konzentrationen im Plasma septischer Patienten direkt mit dem Mortalitätsrisiko korrelierten. In dieser Studie konnte die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten anhand der Plasmaspiegel von IL-6 mit einer Sensitivität von 82,9% vorhergesagt werden. Auch Casey et al. (32) konnten nachweisen, dass erhöhte IL-6 Konzentrationen im Plasma septischer Patienten mit einer schlechteren Überlebensrate korrelierten. Diese Beobachtungen wurden von zahlreichen Studien bestätigt (17,141,142,164). Hierbei scheint eine anhaltende Erhöhung der IL-6 Konzentrationen im Plasma aussagekräftiger bezüglich des Krankheitsverlaufes und dem Mortalitätsrisiko zu sein, als initial gemessene Spitzenwerte (210).

Diese Erkenntnisse haben Eingang in die klinische Praxis gefunden. So werden Konzentrationen von IL-6 im Plasma im Rahmen des klinischen Monitoring bei Patienten auf Intensivstationen vielerorts routinemäßig als Entzündungsparameter bestimmt. Oberholzer et al. (164) schlugen daher vor, Interleukinkonzentrationen im Plasma bei der Evaluation von Scoring Systemen wie APACHE II und MOD mit zu berücksichtigen. Dadurch ließen sich womöglich Patienten frühzeitig identifizieren, die von einer antiinflammatorischen Therapie profitieren könnten.

In Tiermodellen konnte durch die Gabe von Antikörpern gegen IL-6 das Überleben von Mäusen nach standardisierter Verbrennung und letaler intraperitonealer LPS-Injektion, sowie nach zökaler Ligatur und anschließender Punktion verbessert werden (170,187). Bislang gibt es jedoch keine Hinweise dafür, dass die gezielte Blockade von IL-6 auch für septische Patienten benefizial sein könnte.

Auf die Freisetzung von IL-6 in Plasma und BALF hatte in der vorliegenden Studie weder systemisch verabreichtes, noch inhaliertes Lidocain eine signifikant supprimierende Wirkung.

Nur durch die hoch dosierte Vernebelung von Lidocain (4 mg/kg) konnte eine Senkung der Konzentrationen von TNF- α und IL-1 β in der BALF der Versuchstiere erreicht werden. Folglich wäre es denkbar, dass für die Hemmung der IL-6-Freisetzung eine noch höhere Dosis vernebelten Lidocains notwendig gewesen wäre.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass die Vernebelung von Lidocain vor allem auf die Produktion derjenigen Zytokine einen hemmenden Einfluss hatte, die nach LPS-Stimulation frühzeitig freigesetzt werden. Es ist denkbar, dass für die Supprimierung von IL-6 in der BALF höhere Konzentrationen über einen prolongierteren Zeitraum erforderlich gewesen wären. Durch vernebeltes IL-10 gelang es Hofstetter et al. (92) zusätzlich die Zytokine IL-6 und IFN γ zu supprimieren. Diese Zytokine werden zu einem späteren Zeitpunkt im Verlauf des ALI freigesetzt (89). Lidocain und IL-10 unterscheiden sich folglich in der Wirkdauer ihres hemmenden Effekts auf die Zytokinproduktion: IL-10 scheint prolongierter zu wirken als Lidocain. Erklärbar ist dies durch die wesentlich längere Halbwertszeit von IL-10 (2,3-3,7 h (101)) im Gegensatz zu Lidocain (15 min).

4.2.6.2.4 Interferon γ

Interferon- γ (IFN γ) wird hauptsächlich von T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) gebildet. Es verstärkt die biologische Wirkung von anderen proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und führt zu einer Aktivierung mononukleärer Phagozyten. Weitere Zellpopulationen die von IFN γ aktiviert werden sind Neutrophile Granulozyten, NK-Zellen und vaskuläre Endothelzellen. IFN γ bewirkt in den betreffenden Zellen via Enzyminduktion den *'respiratory burst'* - die Produktion reaktiver Stickstoff- und Sauerstoffmetabolite. In einem Mausmodell des LPS-induzierten Lungenschadens wiesen Kabir et al. (112) neben IL-1 und IL-6 auch erhöhte Konzentrationen von IFN γ in der Lunge nach.

Tanaka et al. (218) konnten zeigen, dass durch Inkubation mit Lidocain (100 μ mol/l) die Expression der mRNA und Proteinproduktion von IFN γ in humanen neutrophilen Granulozyten und CD-4-positive T-Zellen (Alveolarmakrophagen) inhibiert wurde.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bezüglich der IFN γ -Konzentrationen in der BALF der Versuchstiere sind nicht eindeutig zu interpretieren, da sich die IFN γ -Konzentrationen in der BALF der LPS-only-Gruppe nicht signifikant von denen der Kontrollgruppe unterschieden. Ein Grund für diese Beobachtung könnte in der Kinetik der IFN γ -Freisetzung während der

Endotoxinämie liegen. Hesse et al. (89) untersuchten die Kinetik der Zytokinfreisetzung in Schimpansen nach Endotoxinadministration. Dabei zeigte sich, dass $\text{IFN}\gamma$ im Verlauf der Endotoxinämie später als $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ freigesetzt wird und erst acht Stunden nach Endotoxinadministration die maximalen Konzentrationen im Plasma erreicht werden. Nach zwölf Stunden fielen die Werte auf kaum nachweisbare Konzentrationen ab (89).

Damit liegt der in der vorliegenden Studie gewählte Messzeitpunkt von fünf Stunden nach LPS-Gabe deutlich vor dem Zeitpunkt, zu dem die höchsten Konzentration von $\text{IFN}\gamma$ im Plasma zu erwarten gewesen wären. Folglich ist es denkbar, dass $\text{IFN}\gamma$ in der LPS-only-Gruppe zu diesem Zeitpunkt noch nicht ausreichend stimuliert war.

Eine Beobachtungszeit von ca. acht Stunden nach LPS-Gabe hätte womöglich aussagekräftigere Ergebnisse geliefert. Die Konzentration von $\text{IFN}\gamma$ in der BALF der Lid ae 4-Gruppe war in der vorliegenden Studie signifikant niedriger als in allen übrigen Gruppen. Dies spricht trotz der schwierigen Interpretation der Werte dafür, dass die hochdosierte Vernebelung von Lidocain zu einer Hemmung der Freisetzung von $\text{IFN}\gamma$ in der BALF geführt hat. Dies konnte in der vorliegenden Studie weder durch eine niedrigdosierte Vernebelung, noch durch die intravenöse Gabe von Lidocain erreicht werden.

4.2.7 Lidocainkonzentrationen im Plasma

Um der Frage nachgehen zu können, ob vernebeltes Lidocain dosisabhängig auf die LPS-induzierte pulmonale Inflamationsreaktion wirkt, wurde Lidocain in zwei verschiedenen Konzentrationen (0,4 mg/kg und 4 mg/kg) verabreicht. Zur Untersuchung der pulmonalen Selektivität des inhalierten Lidocain wurden Zytokinkonzentrationen in BALF und Plasma bestimmt.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass die Vernebelung von Lidocain **dosisabhängig** und **pulmonalselektiv** auf die Inflamationsreaktion der Lunge während experimenteller Endotoxinämie der Ratte wirkt:

Nur durch die hochdosierte Vernebelung von Lidocain konnte eine signifikante Supprimierung der Konzentrationen von $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-}\beta$ und $\text{IFN}\gamma$ in der BALF erzielt werden. Dies entsprach einer Steigerung der niedrigen Dosis (0,4 mg/kg) auf das Zehnfache (4 mg/kg). Aus diesen Beobachtungen lässt sich der Schluss ziehen, dass vernebeltes Lidocain dosisabhängig dazu in der Lage ist, die Freisetzung von $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und $\text{IFN}\gamma$ in der BALF endotoxischer Ratten zu supprimieren. Auf die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine im Plasma hatte die Inhalation von Lidocain keinen Effekt.

Der fehlende systemische Effekt beruhte vermutlich auf den zu niedrigen Plasmakonzentrationen von Lidocain nach Inhalation. Für Lid ae 0.4 lagen diese während der gesamten Versuchszeit fast ausschließlich unter der Messgrenze, bis zu der der TDx-Analyzer verlässlich misst (0,1 µg/ml). Für Lid ae 4 lagen die Werte 120 min nach der ersten Vernebelung im Median bei 0,27 [0,86] µg/ml und 120 min nach der zweiten Vernebelung bei 0,74 [0,12] µg/ml (Median [IQR]). Die nach intravenöser Gabe gemessenen Plasmakonzentrationen von Lidocain betragen 120 min nach der ersten Bolusgabe 0,63 [0,37] µg/ml und 120 min nach der zweiten Bolusgabe 1,47 [0,53] µg/ml (Median [IQR]). Die in der vorliegenden Studie nach Inhalation von Lidocain erreichten Plasmakonzentrationen liegen damit im Vergleich zu anderen Studien, in denen die Substanz intravenös gegeben wurde, sehr niedrig. Nishina et al. (163) berichteten in ihrer Studie über Plasmakonzentrationen von 1,2-2,5 µg/ml nach kontinuierlicher Infusion von Lidocain (2 mg/kg), Schmidt et al. (198) und Takao et al. (217) konnten Konzentrationen von 1,4-2,5 µg/ml messen.

Auf die Produktion von NO in kultivierten AM hatte sowohl Lid ae 0.4 als auch Lid ae 4 eine hemmende Wirkung gezeigt (s. 3.5). Offensichtlich hatte die im Vergleich zu Lid ae 0.4 zehnfache eingesetzte Menge in Lid ae 4 keine signifikante Steigerung der hemmenden Wirkung auf die pulmonale NO-Produktion zur Folge.

Das Lidocain seine Wirkung dosisabhängig entfaltet konnte auch in anderen Untersuchungen gezeigt werden. Klinische Untersuchungen ergaben, dass inhalativ verabreichtes Lidocain in der Lage ist, bei Rauchern (31), bei Patienten mit akutem Infekt der oberen Atemwege (83) und bei Patienten mit bekannter bronchialer Hyperreagibilität (77) dosisabhängig die Antwort auf einen unspezifischen Reiz zu vermindern.

Nach Vernebelung von Lidocain (0,4 mg/kg und 4 mg/kg) lagen die Plasmakonzentrationen zu jedem Messzeitpunkt signifikant unter der toxischen Dosis von 10 µg/ml und signifikant unter den Plasmakonzentrationen, die nach intravenöser Lidocaingabe gemessen wurden. Die eine Minute nach Injektion von Lidocain gemessenen Plasmakonzentrationen lagen teilweise im toxischen Bereich von 10 µg/ml (173).

4.3 Stellenwert von Studienergebnissen

Auf der Suche nach den Ursachen für die zum Teil kontroversen Ergebnisse in klinischen Studien bezüglich des Behandlungserfolgs und Senkung der Mortalität der Patienten, fanden Minneci et al. (150) eine bemerkenswerte Korrelation zwischen der Mortalität in der Kontrollgruppe der betreffenden Studien und dem etwaigen Nutzen der angewendeten

Therapie. In einer Metaanalyse, die Studien zum Einsatz von PAF-Antagonisten und anderer antiinflammatorischer Ansätze als Grundlage zur Behandlung septischer Patienten verglich, waren die Ergebnisse der einzelnen Studien, bezogen auf die Überlebensrate der Patienten, untereinander vergleichbar und zeigten keine herausragenden Therapieerfolge. Andererseits fanden Minneci et al. (150) eine hochsignifikante Abhängigkeit der Effektivität der untersuchten Studien von der Gesamtmortalitätsrate des jeweiligen Studienkollektivs: je höher die Mortalitätsrate in der betreffenden Kontrollgruppe war, umso eher zeigte sich ein positiver Nutzen der Therapie. Bei niedrigen Mortalitätsraten in der Studiengruppe hingegen, waren einige dieser Therapieansätze ineffektiv und manche sogar schädlich für die Patienten (150). Dies gilt auch für den Vergleich der Studien von Schuster et al. (200) mit der von Opal et al. (168): Die Mortalität der Kontrollgruppe betrug 44% in der ersten und nur 24% in der zweiten Studie. Folglich könnte der Verlust an Effektivität in der Studie von Opal et al. auf die geringere Mortalitätsrate in deren Patientenkollektiv im Vergleich zu der Studie von Schuster et al. zurück zu führen sein (150). Die gleiche Beobachtung machten Minneci et al. auch für die Studien zur Erprobung von aktiviertem Protein C: eine hohe Mortalität in der Kontrollgruppe der einzelnen Studien und ein hoher Wert im APACHE II Score gingen mit einer verbesserten odds ratio für das Überleben der Patienten einher (150). Diese grundlegenden Beobachtungen bezüglich der Effektivität einer gewählten Therapie in Abhängigkeit von der Kontrollgruppe sind für weitere Studien zur Verbesserung des Überlebens septischer Patienten aber auch für die vorliegende Studie von großem Interesse: eine Kontrollgruppe mit sehr hoher Mortalität wird die erprobte Therapie viel wahrscheinlicher benefiziell erscheinen lassen, als ein relativ gesundes Patientenkollektiv. In der vorliegenden Studie kam es durch die therapeutischen Interventionen bezüglich Kreislauf (Volumengabe und Katecholamine) und Atmung (Blähmanöver) lediglich zu sehr diskreten klinischen Veränderungen. Damit war in der vorliegenden Studie eine klinische Effektivität der Therapieregime gemäß Minneci et al. schwieriger zu erreichen, als bei hämodynamisch und respiratorisch sehr beeinträchtigten Kontrolltieren.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Studie wurden die inhalative als auch die intravenöse Applikation von Lidocain vor Injektion von LPS am Versuchstier Ratte untersucht. Die hochdosierte Vernebelung von Lidocain vermochte die Konzentrationen proinflammatorischer Mediatoren in der BALF der Versuchstiere signifikant zu senken und führte im Vergleich zur

intravenösen Gabe von Lidocain zu deutlich niedrigeren Plasmakonzentrationen. Lidocain-Aerosol in hoher Dosierung (4 mg/kg) greift damit direkt in die initialen Entzündungsprozesse ein, die dem LPS-induzierten ALI vorausgehen und stellt somit im Tiermodell eine Option zur Behandlung dieses Krankheitsbildes dar. Wie weit diese Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind, muß in weiterführenden Untersuchungen festgestellt werden.

Die Verringerung einzelner proinflammatorischer Mediatoren in Plasma oder BALF lassen jedoch keine Rückschlüsse auf die Effektivität einer Therapie bezüglich des Outcomes kritisch kranker Patienten zu. Die enttäuschenden Ergebnisse klinischer Studien mit dem Ansatz einzelne proinflammatorische Zytokine zu antagonisieren zeigen, wie komplex die dem ALI/ARDS zugrunde liegenden Pathophysiologie ist und das diese noch nicht ausreichend verstanden ist (3,40,62,63). Auf der Suche nach einer effektiven, immunmodulatorischen Therapie müssen demnach mehrere Faktoren gleichzeitig berücksichtigt und behandelt werden, um eine überschüssigen Inflammationsreaktion der Lunge zu verhindern. Wie unter 4.1.4 ausführlich dargestellt bietet Lidocain aufgrund seines vielfältigen antiinflammatorischen Wirkspektrums eine interessante Option zur Behandlung der überschüssigen pulmonalen Inflammationsreaktion, zumal es auf mehrere Zellpopulationen seine Wirkung ausübt, ohne deren physiologischen Funktionen zu beeinträchtigen.

In der vorliegenden Studie waren während der Vernebelung aus technischen Gründen weder eine PEEP-Beatmung noch ein online-Monitoring aller Beatmungsparameter möglich. Durch eine Fortführung der PEEP-Beatmung mit online-Monitoring sämtlicher Beatmungsparameter könnte eine besser kontrollierte Vernebelung von Lidocain erfolgen. Unter diesen Bedingungen wäre sogar eine dauerhafte, über die gesamte Versuchszeit ausgedehnte Inhalation unter kontrollierter Beatmung denkbar. Die intrapulmonal deponierte Menge von Lidocain wäre demnach größer und damit auch der erwartete therapeutische Effekt.

Die vorliegenden Messungen der Plasmakonzentrationen von Lidocain nach Vernebelung lassen darauf schließen, dass auch eine zeitlich ausgedehnte Inhalation zu konstanten Plasmakonzentrationen von Lidocain führt. Dies ist wünschenswert, um eine kontinuierliche und damit gut steuerbare Wirkung auf die Inflammationsreaktion der Lunge zu erzielen, ohne das es zum Erreichen toxischer Werte oder großer Schwankungen der Plasmakonzentrationen von Lidocain kommt. Inhaliertes Lidocain hat allerdings den Nachteil, eventuell eine transiente Bronchokonstriktion zu verursachen (76). Vor allem Patienten mit Asthma

und/oder COPD sind hiervon betroffen (137), so dass man zur Vermeidung dieser unerwünschten Nebenwirkung Lidocain intravenös vor der Inhalation verabreichte. Dadurch konnte der Bronchokonstriktion vorgebeugt werden (75). Eine Kombination aus inhalativer und intravenöser Gabe von Lidocain könnte zu einem Synergismus beider Therapieschemata führen: ein Vermeiden der Bronchokonstriktion durch intravenöses Lidocain mit den schon beobachteten benefiziellen Wirkungen von intravenösem Lidocain auf den septischen Lungenschaden (147,161) und die in der vorliegenden Studie beschriebenen pulmonalselektiven antiinflammatorischen Effekte inhalierten Lidocains.

Für die Etablierung einer effektiven Therapie des ALI/ARDS, mit dem Ziel die Mortalität und Morbidität kritisch kranker Patienten zu senken, müssen noch viele weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden. Tierexperimentelle Ansätze eignen sich in diesem Zusammenhang dazu, unter kontrollierten, überschaubaren Bedingungen einzelne Zusammenhänge detailliert zu erforschen.

An dem vorliegenden tierexperimentellen Ansatz zur experimentellen Endotoxinämie könnte folgenden weiterführenden Fragestellungen bezüglich einer Inhalationstherapie mit Lidocain-Aerosol nachgegangen werden:

- Die Abhängigkeit der antiinflammatorischen Wirkung von Lidocain-Aerosol vom Applikationszeitpunkt im Verhältnis zur LPS-Injektion
- Die Wirkung von Lidocain-Aerosol auf Ebene der Gentranskription und -translation
- Die längerfristigen Auswirkungen von Lidocain-Aerosol auf das Immunsystem
- Die Bestimmung von Lidocainkonzentrationen im Lungengewebe
- Die Evaluation eventueller Nebenwirkungen und toxischer Effekte einer Behandlung mit Lidocain-Aerosol

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das meist Sepsis-bedingte Krankheitsbild des ALI/ARDS stellt mit seiner hohen Inzidenz und einer fast unverändert hohen Mortalitätsrate nach wie vor ein Problem in der modernen Intensivmedizin dar (159,201). Das Verständnis der zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen ist in den vergangenen Jahren verbessert worden, jedoch nicht abschließend geklärt. Kennzeichnend für das Krankheitsbild des ALI/ARDS ist eine überschiessende pulmonale Inflammationsreaktion, welche von einem komplexen Netzwerk proinflammatorischer Zytokine und Mediatoren initiiert und perpetuiert wird (177,225). Eine durchschlagende, klinisch etablierte Therapie hierfür ist bislang nicht gefunden worden. Wie klinische Studien (3,40,62,63) gezeigt haben, erfordert die Komplexität der zugrunde liegenden pathophysiologischen Vorgänge einen therapeutischen Ansatz, der über die alleinige Blockade eines singulären beteiligten Faktors hinausgeht (195).

Vor diesem Hintergrund steht das Konzept der Therapie mit Lokalanästhetika, da diese über ein ausgeprägtes antiinflammatorisches Wirkungsspektrum verfügen (61,95,198). Die antiinflammatorische Wirkung wird vermutlich nicht über die Hemmung spannungsabhängiger Natriumkanäle entfaltet, sondern über Interaktionen der LA mit dem NMDA-Rezeptor (81), dem Na^+/H^+ -Austauscher in Makrophagen und Untereinheiten von G-Proteinen (G_α , G_i) (21, 97). Im Tierexperiment konnte durch die intravenöse Gabe von Lidocain der sepsis-induzierte Lungenschaden und die Konzentration proinflammatorischer Zytokine in der BALF gemindert werden (147,161). Die Inhalation von Lidocain bietet die Möglichkeit diese Substanz direkt am „Ort des Geschehens“ zu applizieren, mit dem antizipierten Vorteil der pulmonalen Selektivität.

Die antiinflammatorische Wirkung von Lidocain-Aerosol wurde an 45 intubierten, kontrolliert beatmeten Ratten untersucht. Die Induktion des experimentellen Lungenschaden wurde durch intravenöse LPS-Injektion ausgelöst.

Die Tiere wurden zufällig einer der fünf Versuchsgruppen zugeteilt: die LPS-only-Gruppe erhielt eine Placebovernebelung mit NaCl 0,9% gefolgt von einer LPS-Injektion (5 mg/kg). Die Lid ae 0.4 und Lid ae 4-Gruppen erhielten eine Vernebelung mit Lidocain in niedriger (0,4 mg/kg) bzw. hoher (4 mg/kg) Dosierung, gefolgt von einer LPS-Injektion (5 mg/kg). Die Kontrollgruppe erhielt lediglich eine Placebovernebelung mittels NaCl 0,9% ohne LPS-Gabe, um die Auswirkungen der Narkose, chirurgischen Präparation, Beatmung und Vernebelung zu

evaluieren. Alle Vernebelungsgruppen wurden zwei Stunden nach LPS-Gabe erneut für 30 Minuten vernebelt. Die Lid i.v. 4-Gruppe erhielt Lidocain intravenös im Bolus (4 mg/kg) direkt vor LPS-Injektion und zwei Stunden danach. Während der Versuchszeit von fünf Stunden nach LPS-Injektion wurden die Parameter der Atemmechanik und der Hämodynamik kontinuierlich protokolliert, sowie zu festgelegten Zeitpunkten Blutbilder angefertigt und arterielle Blutgase bestimmt. Am Ende des Versuchszeitraumes erfolgten eine broncho-alveoläre Lavage und die Asservierung von Blut- und Plasmaproben. Wichtigste Zielparameter waren dabei die Zytokinkonzentrationen in Plasma und zellfreiem Überstand der broncho-alveolären Lavage (BALF).

Die intravenöse Gabe von LPS führte sowohl zu einer systemischen als auch einer pulmonalen Entzündungsreaktion. Zwar waren die klinischen Parameter nur diskret beeinträchtigt, die Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α) waren jedoch sowohl im Plasma als auch in der BALF der Versuchstiere erhöht. Zudem setzten die *ex vivo* kultivierten AM aller endotoxämischen Tiere spontan NO frei.

Die hoch und niedrig dosierte Vernebelung hatte wie die intravenöse Gabe von Lidocain eine signifikante Hemmung der NO-Freisetzung aus *ex vivo* kultivierten AM zur Folge. Dabei unterschieden sich die drei Therapiegruppen in ihrer Wirksamkeit nicht signifikant voneinander, obwohl sich ein Trend andeutete, dass die hochdosierte Vernebelung von Lidocain zu einer stärkeren Supprimierung der NO-Freisetzung führte als die intravenöse Gabe (48,5% vs. 19,3%).

Auf die systemische Freisetzung proinflammatorischer Zytokine hatte keine der drei Therapiegruppen einen Einfluß. Durch die hochdosierte Vernebelung von Lidocain und durch die intravenöse Gabe waren die Konzentrationen von IL-1 β und TNF- α signifikant supprimiert und zusätzlich war durch die hoch dosierte Vernebelung eine signifikante Supprimierung der IFN γ -Konzentration im Vergleich zu allen übrigen Versuchsgruppen nachzuweisen. Die niedrig dosierte Vernebelung erwies sich diesbezüglich als ineffektiv. Aus der niedrig dosierten Vernebelung resultierten Plasmakonzentrationen an der unteren Nachweisgrenze. Die Plasmakonzentrationen von Lidocain nach hoch dosierter Vernebelung lagen über die gesamte Versuchszeit signifikant unter denen nach intravenöser Gabe und betragen zu Versuchsende lediglich 50,3% der Plasmakonzentration nach intravenöser Gabe von Lidocain (0,74 [0,12] μ g/ml vs. 1,47 [0,37] μ g/ml).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie haben gezeigt, dass bei gleicher eingesetzter Menge, die resultierenden Plasmakonzentrationen nach Vernebelung deutlich geringer sind als die nach systemischer Gabe. Die Inhalation von Lidocain hat in der vorliegenden Studie eine dosisabhängige und pulmonalselektive, antiinflammatorische Wirkung auf die LPS-induzierte Inflamationsreaktion der Lunge gezeigt. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie und die sich daraus anschließenden Überlegungen berücksichtigend, sollte die ausgedehnte Vernebelung hoher Dosen von Lidocain kombiniert mit niedrigdosierter intravenöser Gabe dieser Substanz unter kontinuierlicher PEEP-Beatmung in weiterführenden Studien als Therapieform zur Behandlung der LPS-induzierten, akuten Inflamationsreaktion der Lunge erprobt werden.

6 VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

• AF	Atemfrequenz (min^{-1})
• ALI	Acute Lung Injury
• AM	Alveolarmakrophage
• APACHE	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation
• ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
• BAL	Broncho-alveoläre Lavage
• BALF	Broncho-alveoläre Lavage Fluid
• BE	Baseexcess, Basenüberschuss
• BCA	Bicinchoninic Acid
• C	Compliance der Lunge (ml/mbar)
• CD	Cluster of Differentiation
• CVF	Cobra Venom Factor
• DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
• DIC	Disseminated Intravasal Coagulation; disseminierte Intravasale Gerinnung
• EC	Effektive Konzentration
• ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
• EMLA	Eutectic Mixture of Local Anesthetics
• FiO_2	inspiratorische Sauerstoffkonzentration
• FCS	Fetales Kälberserum
• Hb	Hämoglobingehalt (mg/dl)
• HF	Herzfrequenz (min^{-1})
• HCL	Salzsäure
• ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
• IL-1 β	Interleukin-1 beta

• IL-10	Interleukin-10
• IL-6	Interleukin-6
• IL-8	Interleukin-8
• INF γ	Interferon Gamma
• iNOS	induzierbare NO-Synthetase
• IRAP	Interleukin-1 Rezeptorantagonist
• IQR	Interquartilen Abstand; Differenz zwischen 75. und 25. Perzentil bzw. 3. und 1. Quartil
• KG	Körpergewicht
• LA	Lokalanästhetika
• LMU	Ludwig-Maximilians Universität
• LPB	LPS-Bindungsprotein
• LPS	Lipopolysaccharid
• MAC	Membrane Attack Complex; Membran Angriff Komplex
• MCP 1	Monozyten chemotaktisch anziehendem Protein-1
• MEA	Messzeitpunkt
• MOD	Multi Organ Dysfunction
• MOF/V	Multi Organ Failure/Versagen
• mRNA	Messenger-RNA; Boten-RNA
• NE	Neutrophilen Elastase
• NFkappaB	Nekrosefaktor Kappa B
• NMDA	N-methyl-D-aspartate
• NO	Stickstoffmonoxid
• PAF	Plättchen aktivierender Faktor
• PaO ₂	Arterieller Sauerstoffpartialdruck
• PaCO ₂	Arterieller Kohlendioxidpartialdruck

• PBS	Phosphat buffered saline
• PBMC	Periphere Humane Mononukleäre Zellen
• PEEP	Positive End-expiratory Pressure
• pH	negativer dekadischer Logarithmus der molaren H ⁺ -Ionen Konzentration
• p55-IgG	Antikörper gegen TNF
• PLT	Platelets, Thrombozytenkonzentration (10 ⁶ /ml)
• Pmax	maximaler Beatmungsdruck (mbar)
• R	Resistance der Lunge (mbar/l)
• ROS	Reactive Oxygen Species
• SARS	Severe acute respiratory syndrome
• SG	Segmentkernige Granulozyten
• SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome; systemsiche Entzündungsreaktion
• sCD14	soluable (=lösliches) CD14
• Tlr-4	Toll-like receptor 4
• TNF- α	Tumornekrose Faktor Alpha; (Kachektin)
• TNFR:Fc	Fusionsdimers aus extrazellulärem TNF- α Rezeptor und dem Fc-Teil von IgG ₁
• TPA	Tissue plasminogen activator
• VALI	Ventilation Associated Lung Injury
• VCAM	Vaskuläres Adhäsionsmolekül
• Vt	Tidalvolumen
• WBC	White blood cell; Leukozyt

7 Literaturverzeichnis

- (1) Aerosol consensus statement--1991. American Association for Respiratory Care. *Respir Care*. 1991;36(9):916-921.
- (2) Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. *N Engl J Med*. 2000;342(18):1301-1308.
- (3) Abraham E, Anzueto A, Gutierrez G et al. Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock. NORASEPT II Study Group. *Lancet*. 1998;351(9107):929-933.
- (4) Abraham E, Baughman R, Fletcher E et al. Liposomal prostaglandin E1 (TLC C-53) in acute respiratory distress syndrome: a controlled, randomized, double-blind, multicenter clinical trial. TLC C-53 ARDS Study Group. *Crit Care Med*. 1999;27(8):1478-1485.
- (5) Abraham E, Carmody A, Shenkar R, Arcaroli J. Neutrophils as early immunologic effectors in hemorrhage- or endotoxemia-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;279(6):L1137-L1145.
- (6) Abraham E, Laterre PF, Garbino J et al. Lenercept (p55 tumor necrosis factor receptor fusion protein) in severe sepsis and early septic shock: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter phase III trial with 1,342 patients. *Crit Care Med*. 2001;29(3):503-510.
- (7) Abraham E, Matthay MA, Dinarello CA et al. Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome: time for a reevaluation. *Crit Care Med*. 2000;28(1):232-235.
- (8) Adhikari N, Burns KE, Meade MO. Pharmacologic treatments for acute respiratory distress syndrome and acute lung injury: systematic review and meta-analysis. *Treat Respir Med*. 2004;3(5):307-328.
- (9) Agouridakis P, Kyriakou D, Alexandrakis MG et al. The predictive role of serum and bronchoalveolar lavage cytokines and adhesion molecules for acute respiratory distress syndrome development and outcome. *Respir Res*. 2002;3(1):25.
- (10) Aiura K, Gelfand JA, Burke JF et al. Interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist prevents Staphylococcus epidermidis-induced hypotension and reduces circulating levels of tumor necrosis factor and IL-1 beta in rabbits. *Infect Immun*. 1993;61(8):3342-3350.
- (11) Anrather J, Csizmadia V, Brostjan C et al. Inhibition of bovine endothelial cell activation in vitro by regulated expression of a transdominant inhibitor of NF-kappa B. *J Clin Invest*. 1997;99(4):763-772.
- (12) Anzueto A, Baughman RP, Guntupalli KK et al. Aerosolized surfactant in adults with sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. Exosurf Acute Respiratory Distress Syndrome Sepsis Study Group. *N Engl J Med*. 1996;334(22):1417-1421.

- (13) Arend WP. Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol.* 1993;54:167-227.
- (14) Arkovitz MS, Wispe JR, Garcia VF, Szabo C. Selective inhibition of the inducible isoform of nitric oxide synthase prevents pulmonary transvascular flux during acute endotoxemia. *J Pediatr Surg.* 1996;31(8):1009-1015.
- (15) Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet.* 1967;2(7511):319-323.
- (16) Bannerman DD, Goldblum SE. Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003;284(6):L899-L914.
- (17) Barriere SL, Lowry SF. An overview of mortality risk prediction in sepsis. *Crit Care Med.* 1995;23(2):376-393.
- (18) Beck-Schimmer B, Rosenberger DS, Neff SB et al. Pulmonary aspiration: new therapeutic approaches in the experimental model. *Anesthesiology.* 2005;103(3):556-566.
- (19) Beck-Schimmer B, Schwendener R, Pasch T et al. Alveolar macrophages regulate neutrophil recruitment in endotoxin-induced lung injury. *Respir Res.* 2005;6:61.
- (20) Bellingan GJ. The pulmonary physician in critical care * 6: The pathogenesis of ALI/ARDS. *Thorax.* 2002;57(6):540-546.
- (21) Benkowitz C, Garrison JC, Linden J et al. Lidocaine enhances Galphai protein function. *Anesthesiology.* 2003;99(5):1093-1101.
- (22) Bernard GR, Luce JM, Sprung CL et al. High-dose corticosteroids in patients with the adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 1987;317(25):1565-1570.
- (23) Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med.* 2001;344(10):699-709.
- (24) Beutler BA, Milsark IW, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo. *J Immunol.* 1985;135(6):3972-3977.
- (25) Bishop MJ, Kennard S, Artman LD, Cheney FW. Hydralazine does not inhibit canine hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am Rev Respir Dis.* 1983;128(6):998-1001.
- (26) Bloomfield GL, Holloway S, Ridings PC et al. Pretreatment with inhaled nitric oxide inhibits neutrophil migration and oxidative activity resulting in attenuated sepsis-induced acute lung injury. *Crit Care Med.* 1997;25(4):584-593.
- (27) Brandtzaeg P, Kierulf P, Gaustad P et al. Plasma endotoxin as a predictor of multiple organ failure and death in systemic meningococcal disease. *J Infect Dis.* 1989;159(2):195-204.
- (28) Brigham KL, Meyrick B. Endotoxin and lung injury. *Am Rev Respir Dis.* 1986;133(5):913-927.

- (29) Brigham KL, Begley CJ, Bernard GR et al. Septicemia and lung injury. *Clin Lab Med.* 1983;3(4):719-744.
- (30) Brogden KA, Cutlip RC, Lehmkühl HD. Response of sheep after localized deposition of lipopolysaccharide in the lung. *Exp Lung Res.* 1984;7(2):123-132.
- (31) Caranza R, Raphael JH, Nandwani N, Langton JA. Effect of nebulised lignocaine on the quality of induction of anaesthesia in cigarette smokers. *Anaesthesia.* 1997;52(9):849-852.
- (32) Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med.* 1993;119(8):771-778.
- (33) Cassuto J, Nellgard P, Stage L, Jonsson A. Amide local anesthetics reduce albumin extravasation in burn injuries. *Anesthesiology.* 1990;72(2):302-307.
- (34) Cavaillon JM, Fitting C, Haeffner-Cavaillon N et al. Cytokine response by monocytes and macrophages to free and lipoprotein-bound lipopolysaccharide. *Infect Immun.* 1990;58(7):2375-2382.
- (35) Chang JC, Lesser M. Quantitation of leukocytes in bronchoalveolar lavage samples from rats after intravascular injection of endotoxin. *Am Rev Respir Dis.* 1984;129(1):72-75.
- (36) Cheng S, He S, Zhang J. [The role of alveolar macrophage activation in rats with lung injury associated with acute necrotizing pancreatitis]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi.* 2002;40(8):609-612.
- (37) Chignard M, Balloy V. Neutrophil recruitment and increased permeability during acute lung injury induced by lipopolysaccharide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;279(6):L1083-L1090.
- (38) Chu CH, David LD, Hsu YH et al. Propofol exerts protective effects on the acute lung injury induced by endotoxin in rats. *Pulm Pharmacol Ther.* 2006.
- (39) Coates AL, MacNeish CF, Meisner D et al. The choice of jet nebulizer, nebulizing flow, and addition of albuterol affects the output of tobramycin aerosols. *Chest.* 1997;111(5):1206-1212.
- (40) Cohen J, Carlet J. INTERSEPT: an international, multicenter, placebo-controlled trial of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor-alpha in patients with sepsis. International Sepsis Trial Study Group. *Crit Care Med.* 1996;24(9):1431-1440.
- (41) Colucci M, Balconi G, Lorenzet R et al. Cultured human endothelial cells generate tissue factor in response to endotoxin. *J Clin Invest.* 1983;71(6):1893-1896.
- (42) Dahm PL, Jonson B, De Robertis E et al. The effects of nitric oxide inhalation on respiratory mechanics and gas exchange during endotoxaemia in the pig. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1998;42(5):536-544.

- (43) De Amici D, Ramaioli F, Ceriana P, Percivalle E. Antiviral activity of local anaesthetic agents. *J Antimicrob Chemother.* 1996;37(3):635.
- (44) De Groote D, Zangerle PF, Gevaert Y et al. Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation. *Cytokine.* 1992;4(3):239-248.
- (45) Dellinger RP, Zimmerman JL, Taylor RW et al. Effects of inhaled nitric oxide in patients with acute respiratory distress syndrome: results of a randomized phase II trial. Inhaled Nitric Oxide in ARDS Study Group. *Crit Care Med.* 1998;26(1):15-23.
- (46) DeMeester SL, Qiu Y, Buchman TG et al. Nitric oxide inhibits stress-induced endothelial cell apoptosis. *Crit Care Med.* 1998;26(9):1500-1509.
- (47) Demling RH. Current concepts on the adult respiratory distress syndrome. *Circ Shock.* 1990;30(4):297-309.
- (48) Diamond L, O'Donnell M. Pulmonary mechanics in normal rats. *J Appl Physiol.* 1977;43(6):942-948.
- (49) Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood.* 1996;87(6):2095-2147.
- (50) Dinarello CA. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest.* 1997;112(6 Suppl):321S-329S.
- (51) Dinarello CA. Interleukin-1beta. *Crit Care Med.* 2005;33(12 Suppl):S460-S462.
- (52) Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol.* 1988;141(7):2407-2412.
- (53) Domenici L, Pieri L, Galle MB et al. Evolution of endotoxin-induced lung injury in the rat beyond the acute phase. *Pathobiology.* 2004;71(2):59-69.
- (54) Donnelly SC, Strieter RM, Reid PT et al. The association between mortality rates and decreased concentrations of interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonist in the lung fluids of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Ann Intern Med.* 1996;125(3):191-196.
- (55) Enkhbaatar P, Murakami K, Cox R et al. Aerosolized tissue plasminogen inhibitor improves pulmonary function in sheep with burn and smoke inhalation. *Shock.* 2004;22(1):70-75.
- (56) Eriksson AS, Sinclair R, Cassuto J, Thomsen P. Influence of lidocaine on leukocyte function in the surgical wound. *Anesthesiology.* 1992;77(1):74-78.
- (57) Esbenshade AM, Newman JH, Lams PM et al. Respiratory failure after endotoxin infusion in sheep: lung mechanics and lung fluid balance. *J Appl Physiol.* 1982;53(4):967-976.

- (58) Esper AM, Martin GS. Evolution of treatments for patients with acute lung injury. *Expert Opin Investig Drugs*. 2005;14(5):633-645.
- (59) Fasano MB, Cousart S, Neal S, McCall CE. Increased expression of the interleukin 1 receptor on blood neutrophils of humans with the sepsis syndrome. *J Clin Invest*. 1991;88(5):1452-1459.
- (60) Filkins JP. Monokines and the metabolic pathophysiology of septic shock. *Fed Proc*. 1985;44(2):300-304.
- (61) Fischer LG, Bremer M, Coleman EJ et al. Local anesthetics attenuate lysophosphatidic acid-induced priming in human neutrophils. *Anesth Analg*. 2001;92(4):1041-1047.
- (62) Fisher CJ, Jr., Agosti JM, Opal SM et al. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *N Engl J Med*. 1996;334(26):1697-1702.
- (63) Fisher CJ, Jr., Dhainaut JF, Opal SM et al. Recombinant human interleukin 1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome. Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Phase III rhIL-1ra Sepsis Syndrome Study Group. *JAMA*. 1994;271(23):1836-1843.
- (64) Fisher CJ, Jr., Slotman GJ, Opal SM et al. Initial evaluation of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of sepsis syndrome: a randomized, open-label, placebo-controlled multicenter trial. *Crit Care Med*. 1994;22(1):12-21.
- (65) Fong Y, Moldawer LL, Marano M et al. Endotoxemia elicits increased circulating beta 2-IFN/IL-6 in man. *J Immunol*. 1989;142(7):2321-2324.
- (66) From AH, Fong JS, Good RA. Polymyxin B sulfate modification of bacterial endotoxin: effects on the development of endotoxin shock in dogs. *Infect Immun*. 1979;23(3):660-664.
- (67) Fuller HD, Dolovich MB, Posmituck G et al. Pressurized aerosol versus jet aerosol delivery to mechanically ventilated patients. Comparison of dose to the lungs. *Am Rev Respir Dis*. 1990;141(2):440-444.
- (68) Gaston B, Drazen JM, Loscalzo J, Stamler JS. The biology of nitrogen oxides in the airways. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;149(2 Pt 1):538-551.
- (69) Gattinoni L, Vagginelli F, Carlesso E et al. Decrease in PaCO₂ with prone position is predictive of improved outcome in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 2003;31(12):2727-2733.
- (70) Glenny RW, Bernard S, Brinkley M. Validation of fluorescent-labeled microspheres for measurement of regional organ perfusion. *J Appl Physiol*. 1993;74(5):2585-2597.
- (71) Goldman G, Welbourn R, Kobzik L et al. Tumor necrosis factor-alpha mediates acid aspiration-induced systemic organ injury. *Ann Surg*. 1990;212(4):513-519.

- (72) Golenbock DT, Bach RR, Lichenstein H et al. Soluble CD14 promotes LPS activation of CD14-deficient PNH monocytes and endothelial cells. *J Lab Clin Med.* 1995;125(5):662-671.
- (73) Goodman RB, Strieter RM, Martin DP et al. Inflammatory cytokines in patients with persistence of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154(3 Pt 1):602-611.
- (74) Grau GE, Mili N, Lou JN et al. Phenotypic and functional analysis of pulmonary microvascular endothelial cells from patients with acute respiratory distress syndrome. *Lab Invest.* 1996;74(4):761-770.
- (75) Groeben H, Foster WM, Brown RH. Intravenous lidocaine and oral mexiletine block reflex bronchoconstriction in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154(4 Pt 1):885-888.
- (76) Groeben H, Grosswendt T, Silvanus MT et al. Airway anesthesia alone does not explain attenuation of histamine-induced bronchospasm by local anesthetics: a comparison of lidocaine, ropivacaine, and dyclonine. *Anesthesiology.* 2001;94(3):423-428.
- (77) Groeben H, Schwalen A, Irsfeld S et al. Intravenous lidocaine and bupivacaine dose-dependently attenuate bronchial hyperreactivity in awake volunteers. *Anesthesiology.* 1996;84(3):533-539.
- (78) Groeneveld AB. Vascular pharmacology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Vascul Pharmacol.* 2002;39(4-5):247-256.
- (79) Gryglewski RJ, Wolkow PP, Uraz W et al. Protective role of pulmonary nitric oxide in the acute phase of endotoxemia in rats. *Circ Res.* 1998;82(7):819-827.
- (80) Guo FH, De Raeve HR, Rice TW et al. Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(17):7809-7813.
- (81) Hahnenkamp K, Durieux ME, Hahnenkamp A et al. Local anaesthetics inhibit signalling of human NMDA receptors recombinantly expressed in *Xenopus laevis* oocytes: role of protein kinase C. *Br J Anaesth.* 2006;96(1):77-87.
- (82) Haines KA, Reibman J, Callegari PE et al. Cocaine and its derivatives blunt neutrophil functions without influencing phosphorylation of a 47-kilodalton component of the reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidase. *J Immunol.* 1990;144(12):4757-4764.
- (83) Hall AP, Fox AJ, Raphael JH et al. Upper airway reactivity and upper respiratory tract infection: effect of nebulized lidocaine. *Br J Anaesth.* 1999;82(6):857-860.
- (84) Hammer R, Dahlgren C, Stendahl O. Inhibition of human leukocyte metabolism and random mobility by local anaesthesia. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1985;29(5):520-523.
- (85) Hardie EM, Rawlings CA, Shotts EB, Jr. et al. Lidocaine treatment of dogs with *Escherichia coli* septicemia. *Am J Vet Res.* 1988;49(1):77-81.

- (86) Hashimoto N, Kawabe T, Imaizumi K et al. CD40 plays a crucial role in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004;30(6):808-815.
- (87) Headley AS, Tolley E, Meduri GU. Infections and the inflammatory response in acute respiratory distress syndrome. *Chest*. 1997;111(5):1306-1321.
- (88) Hess D, Fisher D, Williams P et al. Medication nebulizer performance. Effects of diluent volume, nebulizer flow, and nebulizer brand. *Chest*. 1996;110(2):498-505.
- (89) Hesse DG, Tracey KJ, Fong Y et al. Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteremia. *Surg Gynecol Obstet*. 1988;166(2):147-153.
- (90) Hille B. Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction. *J Gen Physiol*. 1977;69(4):497-515.
- (91) Hodge S, Hodge G, Scicchitano R et al. Alveolar macrophages from subjects with chronic obstructive pulmonary disease are deficient in their ability to phagocytose apoptotic airway epithelial cells. *Immunol Cell Biol*. 2003;81(4):289-296.
- (92) Hofstetter C, Flondor M, Hoegl S et al. Interleukin-10 aerosol reduces proinflammatory mediators in bronchoalveolar fluid of endotoxemic rat. *Crit Care Med*. 2005;33(10):2317-2322.
- (93) Hofstetter C, Flondor M, Hoegl S et al. Aerosol delivery during mechanical ventilation to the rat. *Exp Lung Res*. 2004;30(7):635-651.
- (94) Hollmann MW, Durieux ME. Local anesthetics and the inflammatory response: a new therapeutic indication? *Anesthesiology*. 2000;93(3):858-875.
- (95) Hollmann MW, Gross A, Jelacin N, Durieux ME. Local anesthetic effects on priming and activation of human neutrophils. *Anesthesiology*. 2001;95(1):113-122.
- (96) Hollmann MW, Durieux ME. Local anesthetics and the inflammatory response: a new therapeutic indication? *Anesthesiology*. 2000;93(3):858-875.
- (97) Hollmann MW, Gross A, Jelacin N, Durieux ME. Local anesthetic effects on priming and activation of human neutrophils. *Anesthesiology*. 2001;95(1):113-122.
- (98) Honemann CW, Arledge JA, Podranski T et al. Volatile and local anesthetics interfere with thromboxane A2 receptors recombinantly expressed in *Xenopus* oocytes. *Adv Exp Med Biol*. 1999;469:277-283.
- (99) Honemann CW, Lo B, Erera JS et al. Local anesthetic effects on TXA2 receptor mediated platelet aggregation using quenched flow aggregometry. *Adv Exp Med Biol*. 1999;469:269-276.
- (100) Hudson LD, Milberg JA, Anardi D, Maunder RJ. Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151(2 Pt 1):293-301.

- (101) Huhn RD, Radwanski E, O'Connell SM et al. Pharmacokinetics and immunomodulatory properties of intravenously administered recombinant human interleukin-10 in healthy volunteers. *Blood*. 1996;87(2):699-705.
- (102) Hyers TM, Tricomi SM, Dettenmeier PA, Fowler AA. Tumor necrosis factor levels in serum and bronchoalveolar lavage fluid of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*. 1991;144(2):268-271.
- (103) Hyvonen PM, Kowolik MJ. Dose-dependent suppression of the neutrophil respiratory burst by lidocaine. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1998;42(5):565-569.
- (104) Ip AY, Arakawa T, Silvers H et al. Stability of recombinant consensus interferon to air-jet and ultrasonic nebulization. *J Pharm Sci*. 1995;84(10):1210-1214.
- (105) Ishihara K, Hirano T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002;13(4-5):357-368.
- (106) Issekutz TB. Effects of six different cytokines on lymphocyte adherence to microvascular endothelium and in vivo lymphocyte migration in the rat. *J Immunol*. 1990;144(6):2140-2146.
- (107) Iuvone T, D'Acquisto F, Carnuccio R, Di Rosa M. Nitric oxide inhibits LPS-induced tumor necrosis factor synthesis in vitro and in vivo. *Life Sci*. 1996;59(13):L207-L211.
- (108) Jansky L, Reymanova P, Kopecky. Dynamics of cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells stimulated by LPS or infected by *Borrelia*. *Physiol Res*. 2003;52(6):593-598.
- (109) Jersmann HP, Hii CS, Ferrante JV, Ferrante A. Bacterial lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha synergistically increase expression of human endothelial adhesion molecules through activation of NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Infect Immun*. 2001;69(3):1273-1279.
- (110) Jirik FR, Podor TJ, Hirano T et al. Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. *J Immunol*. 1989;142(1):144-147.
- (111) Johns RA, Difazio CA, Longnecker DE. Lidocaine constricts or dilates rat arterioles in a dose-dependent manner. *Anesthesiology*. 1985;62(2):141-144.
- (112) Kabir K, Gelinas JP, Chen M et al. Characterization of a murine model of endotoxin-induced acute lung injury. *Shock*. 2002;17(4):300-303.
- (113) Kang JL, Park W, Pack IS et al. Inhaled nitric oxide attenuates acute lung injury via inhibition of nuclear factor-kappa B and inflammation. *J Appl Physiol*. 2002;92(2):795-801.
- (114) Karzai W, Cui X, Mehlhorn B et al. Protection with antibody to tumor necrosis factor differs with similarly lethal *Escherichia coli* versus *Staphylococcus aureus* pneumonia in rats. *Anesthesiology*. 2003;99(1):81-89.

- (115) Kemming GI, Flondor M, Hanser A et al. Effects of perfluorohexan vapor on gas exchange, respiratory mechanics, and lung histology in pigs with lung injury after endotoxin infusion. *Anesthesiology*. 2005;103(3):585-594.
- (116) Kiyonari Y, Nishina K, Mikawa K et al. Lidocaine attenuates acute lung injury induced by a combination of phospholipase A2 and trypsin. *Crit Care Med*. 2000;28(2):484-489.
- (117) Kobayashi A, Hashimoto S, Kooguchi K et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and inflammatory cytokines in alveolar macrophages of ARDS following sepsis. *Chest*. 1998;113(6):1632-1639.
- (118) Kobzik L, Bredt DS, Lowenstein CJ et al. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1993;9(4):371-377.
- (119) Krause KH, Demarex N, Jaconi M, Lew DP. Ion channels and receptor-mediated Ca²⁺ influx in neutrophil granulocytes. *Blood Cells*. 1993;19(1):165-173.
- (120) Kristof AS, Goldberg P, Laubach V, Hussain SN. Role of inducible nitric oxide synthase in endotoxin-induced acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158(6):1883-1889.
- (121) LeVine H, III. Structural features of heterotrimeric G-protein-coupled receptors and their modulatory proteins. *Mol Neurobiol*. 1999;19(2):111-149.
- (122) Li XY, Donaldson K, MacNee W. Lipopolysaccharide-induced alveolar epithelial permeability: the role of nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(4 Pt 1):1027-1033.
- (123) Liaudet L, Soriano FG, Szabo C. Biology of nitric oxide signaling. *Crit Care Med*. 2000;28(4 Suppl):N37-N52.
- (124) Libby P, Ordovas JM, Auger KR et al. Endotoxin and tumor necrosis factor induce interleukin-1 gene expression in adult human vascular endothelial cells. *Am J Pathol*. 1986;124(2):179-185.
- (125) Lim CM, Kim EK, Koh Y et al. Hypothermia inhibits cytokine release of alveolar macrophage and activation of nuclear factor kappaB in endotoxemic lung. *Intensive Care Med*. 2004;30(8):1638-1644.
- (126) Long W, Thompson T, Sundell H et al. Effects of two rescue doses of a synthetic surfactant on mortality rate and survival without bronchopulmonary dysplasia in 700- to 1350-gram infants with respiratory distress syndrome. The American Exosurf Neonatal Study Group I. *J Pediatr*. 1991;118(4 (Pt 1)):595-605.
- (127) Luce JM, Montgomery AB, Marks JD et al. Ineffectiveness of high-dose methylprednisolone in preventing parenchymal lung injury and improving mortality in patients with septic shock. *Am Rev Respir Dis*. 1988;138(1):62-68.
- (128) Luhr OR, Antonsen K, Karlsson M et al. Incidence and mortality after acute respiratory failure and acute respiratory distress syndrome in Sweden, Denmark, and

- Iceland. The ARF Study Group. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(6):1849-1861.
- (129) MacGregor RR, Thorner RE, Wright DM. Lidocaine inhibits granulocyte adherence and prevents granulocyte delivery to inflammatory sites. *Blood*. 1980;56(2):203-209.
- (130) MacIntyre NR, Silver RM, Miller CW et al. Aerosol delivery in intubated, mechanically ventilated patients. *Crit Care Med*. 1985;13(2):81-84.
- (131) Marini JJ. New options for the ventilatory management of acute lung injury. *New Horiz*. 1993;1(4):489-503.
- (132) Marini JJ. How to recruit the injured lung. *Minerva Anesthesiol*. 2003;69(4):193-200.
- (133) Marks JD, Marks CB, Luce JM et al. Plasma tumor necrosis factor in patients with septic shock. Mortality rate, incidence of adult respiratory distress syndrome, and effects of methylprednisolone administration. *Am Rev Respir Dis*. 1990;141(1):94-97.
- (134) Martin TR. Lung cytokines and ARDS: Roger S. Mitchell Lecture. *Chest*. 1999;116(1 Suppl):2S-8S.
- (135) Martinet Y, Menard O, Vaillant P et al. Cytokines in human lung fibrosis. *Arch Toxicol Suppl*. 1996;18:127-139.
- (136) Matamis D, Lemaire F, Harf A et al. Total respiratory pressure-volume curves in the adult respiratory distress syndrome. *Chest*. 1984;86(1):58-66.
- (137) McAlpine LG, Thomson NC. Lidocaine-induced bronchoconstriction in asthmatic patients. Relation to histamine airway responsiveness and effect of preservative. *Chest*. 1989;96(5):1012-1015.
- (138) McHugh LG, Milberg JA, Whitcomb ME et al. Recovery of function in survivors of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;150(1):90-94.
- (139) Meade P, Shoemaker WC, Donnelly TJ et al. Temporal patterns of hemodynamics, oxygen transport, cytokine activity, and complement activity in the development of adult respiratory distress syndrome after severe injury. *J Trauma*. 1994;36(5):651-657.
- (140) Meduri GU. The role of the host defence response in the progression and outcome of ARDS: pathophysiological correlations and response to glucocorticoid treatment. *Eur Respir J*. 1996;9(12):2650-2670.
- (141) Meduri GU, Headley S, Kohler G et al. Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. Plasma IL-1 beta and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time. *Chest*. 1995;107(4):1062-1073.
- (142) Meduri GU, Kohler G, Headley S et al. Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS. Persistent elevation over time predicts poor outcome. *Chest*. 1995;108(5):1303-1314.

- (143) Mehta S. The effects of nitric oxide in acute lung injury. *Vascul Pharmacol*. 2005;43(6):390-403.
- (144) Meyrick B. Pathology of the adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Clin*. 1986;2(3):405-428.
- (145) Michie HR, Manogue KR, Spriggs DR et al. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N Engl J Med*. 1988;318(23):1481-1486.
- (146) Mikawa K, Akamatsu H, Nishina K et al. Inhibitory effect of local anaesthetics on reactive oxygen species production by human neutrophils. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1997;41(4):524-528.
- (147) Mikawa K, Maekawa N, Nishina K et al. Effect of lidocaine pretreatment on endotoxin-induced lung injury in rabbits. *Anesthesiology*. 1994;81(3):689-699.
- (148) Mikawa K, Nishina K, Maekawa N, Obara H. Attenuation of hyperoxic lung injury in rabbits with superoxide dismutase: effects on inflammatory mediators. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1995;39(3):317-322.
- (149) Mikawa K, Nishina K, Tamada M et al. Aminoguanidine attenuates endotoxin-induced acute lung injury in rabbits. *Crit Care Med*. 1998;26(5):905-911.
- (150) Minneci PC, Deans KJ, Banks SM et al. Should we continue to target the platelet-activating factor pathway in septic patients? *Crit Care Med*. 2004;32(2):585-588.
- (151) Moore SA, Strieter RM, Rolfe MW et al. Expression and regulation of human alveolar macrophage-derived interleukin-1 receptor antagonist. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1992;6(6):569-575.
- (152) Moser R, Schleiffenbaum B, Groscurth P, Fehr J. Interleukin 1 and tumor necrosis factor stimulate human vascular endothelial cells to promote transendothelial neutrophil passage. *J Clin Invest*. 1989;83(2):444-455.
- (153) Muers MF. Overview of nebuliser treatment. *Thorax*. 1997;52 Suppl 2:S25-S30.
- (154) Murakami K, Okajima K, Uchiba M. The prevention of lipopolysaccharide-induced pulmonary vascular injury by pretreatment with cepharanthine in rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(1):57-63.
- (155) Murray MJ, Kumar M, Gregory TJ et al. Select dietary fatty acids attenuate cardiopulmonary dysfunction during acute lung injury in pigs. *Am J Physiol*. 1995;269(6 Pt 2):H2090-H2099.
- (156) Mutunga M, Fulton B, Bullock R et al. Circulating endothelial cells in patients with septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(1):195-200.
- (157) Nambu A, Nakae S, Iwakura Y. IL-1{beta}, but not IL-1{alpha}, is required for antigen-specific T cell activation and the induction of local inflammation in the delayed-type hypersensitivity responses. *Int Immunol*. 2006;18(5):701-712.
- (158) Neame PB, Kelton JG, Walker IR et al. Thrombocytopenia in septicemia: the role of disseminated intravascular coagulation. *Blood*. 1980;56(1):88-92.

- (159) Neff MJ. The epidemiology and definition of the acute respiratory distress syndrome. *Respir Care Clin N Am*. 2003;9(3):273-282.
- (160) Nellgard P, Jonsson A, Bojo L et al. Small-bowel obstruction and the effects of lidocaine, atropine and hexamethonium on inflammation and fluid losses. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1996;40(3):287-292.
- (161) Nishina K, Mikawa K, Maekawa N et al. Does early posttreatment with lidocaine attenuate endotoxin-induced acute injury in rabbits? *Anesthesiology*. 1995;83(1):169-177.
- (162) 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(3):399-407.
- (163) Nishina K, Mikawa K, Takao Y et al. Intravenous lidocaine attenuates acute lung injury induced by hydrochloric acid aspiration in rabbits. *Anesthesiology*. 1998;88(5):1300-1309.
- (164) Oberholzer A, Souza SM, Tschoeke SK et al. Plasma cytokine measurements augment prognostic scores as indicators of outcome in patients with severe sepsis. *Shock*. 2005;23(6):488-493.
- (165) Obot CJ, Morandi MT, Beebe TP et al. Surface components of airborne particulate matter induce macrophage apoptosis through scavenger receptors. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2002;184(2):98-106.
- (166) Oh-Ishi S, Ishida H, Ueno A. Role of synergistic action of PAF and kinin in bacterial endotoxin-induced hypotension in rats. *Adv Exp Med Biol*. 1996;416:235-238.
- (167) Olson NC, Hellyer PW, Dodam JR. Mediators and vascular effects in response to endotoxin. *Br Vet J*. 1995;151(5):489-522.
- (168) Opal S, Laterre PF, Abraham E et al. Recombinant human platelet-activating factor acetylhydrolase for treatment of severe sepsis: results of a phase III, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. *Crit Care Med*. 2004;32(2):332-341.
- (169) Oppenheimer L, Hryniuk WM, Bishop AJ. Thrombocytopenia in severe bacterial infections. *J Surg Res*. 1976;20(3):211-214.
- (170) Pallua N, Low JF, von Heimburg D. Pathogenic role of interleukin-6 in the development of sepsis. Part II: Significance of anti-interleukin-6 and anti-soluble interleukin-6 receptor-alpha antibodies in a standardized murine contact burn model. *Crit Care Med*. 2003;31(5):1495-1501.
- (171) Parsey MV, Tudor RM, Abraham E. Neutrophils are major contributors to intraparenchymal lung IL-1 beta expression after hemorrhage and endotoxemia. *J Immunol*. 1998;160(2):1007-1013.
- (172) Patel RT, Deen KI, Youngs D et al. Interleukin 6 is a prognostic indicator of outcome in severe intra-abdominal sepsis. *Br J Surg*. 1994;81(9):1306-1308.

- (173) Pecher S, Bottiger BW, Graf B, Hollmann MW. ["Alternative" effects of local anesthetic agents]. *Anaesthetist*. 2004;53(4):316-325.
- (174) Philippakis GE, Lazaris AC, Papathomas TG et al. Adrenaline attenuates the acute lung injury after intratracheal lipopolysaccharide instillation: an experimental study. *Inhal Toxicol*. 2008;20(4):445-453.
- (175) Pinkerton KE, Gallen JT, Mercer RR et al. Aerosolized fluorescent microspheres detected in the lung using confocal scanning laser microscopy. *Microsc Res Tech*. 1993;26(5):437-443.
- (176) Pittet D, Harbarth S, Suter PM et al. Impact of immunomodulating therapy on morbidity in patients with severe sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(3):852-857.
- (177) Pittet JF, Mackersie RC, Martin TR, Matthay MA. Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155(4):1187-1205.
- (178) Post C. Studies on the pharmacokinetic function of the lung with special reference to lidocaine. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*. 1979;44 Suppl 1:1-53.
- (179) Post C, Andersson RG, Ryrfeldt A, Nilsson E. Physico-chemical modification of lidocaine uptake in rat lung tissue. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*. 1979;44(2):103-109.
- (180) Prewitt RM, Wood LD. Effect of sodium nitroprusside on cardiovascular function and pulmonary shunt in canine oleic acid pulmonary edema. *Anesthesiology*. 1981;55(5):537-541.
- (181) Procopio MA, Rassias AJ, DeLeo JA et al. The in vivo effects of general and epidural anesthesia on human immune function. *Anesth Analg*. 2001;93(2):460-5, 4th.
- (182) Pugin J, Ricou B, Steinberg KP et al. Proinflammatory activity in bronchoalveolar lavage fluids from patients with ARDS, a prominent role for interleukin-1. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;153(6 Pt 1):1850-1856.
- (183) Raab OG, Yeh HC, Newton GJ et al. Deposition of inhaled monodisperse aerosols in small rodents. *Inhaled Part*. 1975;4 Pt 1:3-21.
- (184) Radermacher P, Santak B, Wust HJ et al. Prostacyclin for the treatment of pulmonary hypertension in the adult respiratory distress syndrome: effects on pulmonary capillary pressure and ventilation-perfusion distributions. *Anesthesiology*. 1990;72(2):238-244.
- (185) Raeburn D, Underwood SL, Villamil ME. Techniques for drug delivery to the airways, and the assessment of lung function in animal models. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1992;27(3):143-159.
- (186) Renzi PM, Ginns LC. Natural killer activity is present in rat lung lavage and inhibited by lidocaine. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 1990;12(3):389-415.

- (187) Riedemann NC, Neff TA, Guo RF et al. Protective effects of IL-6 blockade in sepsis are linked to reduced C5a receptor expression. *J Immunol.* 2003;170(1):503-507.
- (188) Riedler J, Robertson CF. Effect of tidal volume on the output and particle size distribution of hypertonic saline from an ultrasonic nebulizer. *Eur Respir J.* 1994;7(5):998-1002.
- (189) Rimback G, Cassuto J, Wallin G, Westlander G. Inhibition of peritonitis by amide local anesthetics. *Anesthesiology.* 1988;69(6):881-886.
- (190) Rinaldo JE, Dauber JH, Christman J, Rogers RM. Neutrophil alveolitis following endotoxemia. Enhancement by previous exposure to hyperoxia. *Am Rev Respir Dis.* 1984;130(6):1065-1071.
- (191) Rockey DC, Chung JJ. Regulation of inducible nitric oxide synthase in hepatic sinusoidal endothelial cells. *Am J Physiol.* 1996;271(2 Pt 1):G260-G267.
- (192) Roten R, Markert M, Feihl F et al. Plasma levels of tumor necrosis factor in the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis.* 1991;143(3):590-592.
- (193) Rubbo H, Darley-Usmar V, Freeman BA. Nitric oxide regulation of tissue free radical injury. *Chem Res Toxicol.* 1996;9(5):809-820.
- (194) Rubenstein HS, Fine J, Coons AH. Localization of endotoxin in the walls of the peripheral vascular system during lethal endotoxemia. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1962;111:458-467.
- (195) Said SI, Foda HD. Pharmacologic modulation of lung injury. *Am Rev Respir Dis.* 1989;139(6):1553-1564.
- (196) Salvemini D, Korbut R, Anggard E, Vane J. Immediate release of a nitric oxide-like factor from bovine aortic endothelial cells by Escherichia coli lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(7):2593-2597.
- (197) Sasagawa S. Inhibitory effects of local anesthetics on migration, extracellular release of lysosomal enzyme, and superoxide anion production in human polymorphonuclear leukocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 1991;13(4):607-622.
- (198) Schmidt W, Schmidt H, Bauer H et al. Influence of lidocaine on endotoxin-induced leukocyte-endothelial cell adhesion and macromolecular leakage in vivo. *Anesthesiology.* 1997;87(3):617-624.
- (199) Schreiner A, Hopen G. Adhesion and locomotion of human leukocytes in vitro; importance of protein coating; effect of lidocain, ethanol and endotoxin. *Acta Pathol Microbiol Scand [C].* 1979;87(5):333-340.
- (200) Schuster DP, Metzler M, Opal S et al. Recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase to prevent acute respiratory distress syndrome and mortality in severe sepsis: Phase IIb, multicenter, randomized, placebo-controlled, clinical trial. *Crit Care Med.* 2003;31(6):1612-1619.

- (201) Schutte H, Lohmeyer J, Rosseau S et al. Bronchoalveolar and systemic cytokine profiles in patients with ARDS, severe pneumonia and cardiogenic pulmonary oedema. *Eur Respir J*. 1996;9(9):1858-1867.
- (202) Sheng WH, Chiang BL, Chang SC et al. Clinical manifestations and inflammatory cytokine responses in patients with severe acute respiratory syndrome. *J Formos Med Assoc*. 2005;104(10):715-723.
- (203) Sheu JR, Hung WC, Wu CH et al. Reduction in lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia by triflavin in a rat model of septicemia. *Circulation*. 1999;99(23):3056-3062.
- (204) Sibille Y, Reynolds HY. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am Rev Respir Dis*. 1990;141(2):471-501.
- (205) Siler TM, Swierkosz JE, Hyers TM et al. Immunoreactive interleukin-1 in bronchoalveolar lavage fluid of high-risk patients and patients with the adult respiratory distress syndrome. *Exp Lung Res*. 1989;15(6):881-894.
- (206) Sinclair R, Eriksson AS, Gretzer C et al. Inhibitory effects of amide local anaesthetics on stimulus-induced human leukocyte metabolic activation, LTB₄ release and IL-1 secretion in vitro. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1993;37(2):159-165.
- (207) Slutsky AS. Lung injury caused by mechanical ventilation. *Chest*. 1999;116(1 Suppl):9S-15S.
- (208) Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985;150(1):76-85.
- (209) Snyder LS, Hertz MI, Peterson MS et al. Acute lung injury. Pathogenesis of intraalveolar fibrosis. *J Clin Invest*. 1991;88(2):663-673.
- (210) Song M, Kellum JA. Interleukin-6. *Crit Care Med*. 2005;33(12 Suppl):S463-S465.
- (211) Steinberg KP, Milberg JA, Martin TR et al. Evolution of bronchoalveolar cell populations in the adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;150(1):113-122.
- (212) Strieter RM, Kunkel SL. Acute lung injury: the role of cytokines in the elicitation of neutrophils. *J Investig Med*. 1994;42(4):640-651.
- (213) Stuber F, Wrigge H, Schroeder S et al. Kinetic and reversibility of mechanical ventilation-associated pulmonary and systemic inflammatory response in patients with acute lung injury. *Intensive Care Med*. 2002;28(7):834-841.
- (214) Stuehr DJ, Marletta MA. Synthesis of nitrite and nitrate in murine macrophage cell lines. *Cancer Res*. 1987;47(21):5590-5594.
- (215) Suter PM, Suter S, Girardin E et al. High bronchoalveolar levels of tumor necrosis factor and its inhibitors, interleukin-1, interferon, and elastase, in patients with adult respiratory distress syndrome after trauma, shock, or sepsis. *Am Rev Respir Dis*. 1992;145(5):1016-1022.

- (216) Sweeney TD, Brain JD, LeMott S. Anesthesia alters the pattern of aerosol retention in hamsters. *J Appl Physiol.* 1983;54(1):37-44.
- (217) Takao Y, Mikawa K, Nishina K et al. Lidocaine attenuates hyperoxic lung injury in rabbits. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1996;40(3):318-325.
- (218) Tanaka A, Minoguchi K, Oda N et al. Inhibitory effect of lidocaine on T cells from patients with allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;109(3):485-490.
- (219) Terzano C, Colombo P. State of the art and new perspectives on dry powder inhalers. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 1999;3(6):247-254.
- (220) Tran VN, Misset B, Lebargy F et al. Expression of tumor necrosis factor-alpha gene in alveolar macrophages from patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis.* 1993;147(6 Pt 1):1585-1589.
- (221) Ulevitch RJ, Cochrane CG, Henson PM et al. Mediation systems in bacterial lipopolysaccharide-induced hypotension and disseminated intravascular coagulation. I. The role of complement. *J Exp Med.* 1975;142(6):1570-1590.
- (222) Ulevitch RJ, Tobias PS. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol.* 1995;13:437-457.
- (223) van d, V, Cross CE. Oxidants, nitrosants, and the lung. *Am J Med.* 2000;109(5):398-421.
- (224) Wang J, Zhang L, Walther SM. Administration of aerosolized terbutaline and budesonide reduces chlorine gas-induced acute lung injury. *J Trauma.* 2004;56(4):850-862.
- (225) Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 2000;342(18):1334-1349.
- (226) Warner RL, Paine R, III, Christensen PJ et al. Lung sources and cytokine requirements for in vivo expression of inducible nitric oxide synthase. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995;12(6):649-661.
- (227) Warren HS, Glennon ML, Wainwright N et al. Binding and neutralization of endotoxin by Limulus antilipopolysaccharide factor. *Infect Immun.* 1992;60(6):2506-2513.
- (228) Warren HS, Novitsky TJ, Bucklin A et al. Endotoxin neutralization with rabbit antisera to Escherichia coli J5 and other gram-negative bacteria. *Infect Immun.* 1987;55(7):1668-1673.
- (229) Weinstein MP, Maderazo E, Tilton R et al. Further observations on the antimicrobial effects of local anesthetic agents. *Curr Ther Res Clin Exp.* 1975;17(4):369-374.
- (230) Welty-Wolf KE, Carraway MS, Idell S et al. Tissue factor in experimental acute lung injury. *Semin Hematol.* 2001;38(4 Suppl 12):35-38.
- (231) Wigley FW, Londono JH, Wood SH et al. Insulin across respiratory mucosae by aerosol delivery. *Diabetes.* 1971;20(8):552-556.

- (232) Willson DF, Thomas NJ, Markovitz BP et al. Effect of exogenous surfactant (calfactant) in pediatric acute lung injury: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2005;293(4):470-476.
- (233) Wind J, Versteegt J, Twisk J et al. Epidemiology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in The Netherlands: A survey. *Respir Med*. 2007.
- (234) Windsor AC, Walsh CJ, Mullen PG et al. Tumor necrosis factor-alpha blockade prevents neutrophil CD18 receptor upregulation and attenuates acute lung injury in porcine sepsis without inhibition of neutrophil oxygen radical generation. *J Clin Invest*. 1993;91(4):1459-1468.
- (235) Winsel K, Bergmann KC, Lachmann B. [Ultrasonic atomization of surface-active agents from lung tissue and lecithin dispersions with reference to the artificial spraying of lungs]. *Z Erkr Atmungsorgane*. 1974;140(2):151-158.
- (236) Wizemann TM, Gardner CR, Laskin JD et al. Production of nitric oxide and peroxynitrite in the lung during acute endotoxemia. *J Leukoc Biol*. 1994;56(6):759-768.
- (237) Xie Q, Nathan C. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *J Leukoc Biol*. 1994;56(5):576-582.
- (238) Yoshinari D, Takeyoshi I, Koibuchi Y et al. Effects of a dual inhibitor of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 on lipopolysaccharide-induced lung injury in rats: involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Crit Care Med*. 2001;29(3):628-634.
- (239) Yun JK, McCormick TS, Villabona C et al. Inflammatory mediators are perpetuated in macrophages resistant to apoptosis induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(25):13903-13908.

Danksagung

Nach Abschluß der Arbeit gilt mein besonderer Dank:

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

Herrn Dr. med. M. Flondor und Herrn Dr. med. C. Hofstetter für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und ihrem persönlichen Einsatz bei der Durchführung der Versuche. Unter ihrer Anleitung erlernte ich die Prinzipien wissenschaftlicher Arbeit. Sie weckten und förderten mein Interesse an der experimentellen Medizin.

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

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

Meinen Freunden und meiner Familie die mir Halt gegeben und mein Leben wertvoll gemacht haben durch viele besondere, herzliche Begegnungen.

GSD

LEBENS LAUF

Holger Walter Listle

Persönliche Angaben	Familienstand:	ledig
	Nationalität:	Deutsch
	Geburtstag:	01.06.1978
	Geburtsort:	München
	Eltern:	Hermann Listle, Brigitte Listle
Schulausbildung	1984 -1988	1. – 4. Klasse Grund- und Teilhauptschule Wörthsee
	1989 – 1997	5. – 13. Klasse Christoph-Probst Gymnasium Gilching
	Mai 1997	Allgemeine Hochschulreife
Zivildienst und Reisen	1997 – 1998	Zivildienst im KKH Fürstenfeldbruck, pflegerische Tätigkeiten
	1998 – 1999	Reisen durch Südamerika, Neuseeland, Australien, Südostasien
Studium	1999-2006	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
	August 2001	Ärztliche Vorprüfung
	August 2002	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	April 2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Praktisches Jahr	1.Tertial	Innere Medizin: Poliklinik der LMU München
	2.Tertial	Anästhesie: Hospital de San Juan d´Alacant/Spanien, Universität von Alicante
	3.Tertial	Chirurgie: Städtisches Krankenhaus München Harlaching
Studienabschluss	Mai 2006	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Berufliche Tätigkeit	Seit September 2006	Facharztausbildung an der LMU München, Abteilung für Anästhesie, unter Leitung von Prof. Dr. B. Zwißler