

Einfluss von Induktion und Inhibition der Hämoxxygenase-1
auf Leukozytenmigration und Endothelpermeabilität im
akuten Lungenversagen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Braun, Stefan Franz

2015

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. J. Reutershan

2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Riessen

Meiner Mutter gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Acute Respiratory Distress Syndrome	10
1.1 Epidemiologie des ARDS	10
1.2 Klinisches Erscheinungsbild	11
1.3 Ätiologie.....	12
1.4 Prognose und Risikofaktoren	13
1.5 Pathophysiologie	14
1.6 Pathomechanismus.....	16
1.6.1 Inflammation	16
1.6.2 LPS als experimenteller Auslöser der pulmonalen Inflammation	18
1.6.3 Humanes und murines zelluläres Immunsystem im Vergleich.....	19
1.6.4 Die Rolle der neutrophilen Granulozyten in der Inflammation.....	20
1.6.5 Endothel-Neutrophilen-Interaktion in den Lungen.....	21
1.6.6 Endotheliale Barrierefunktion und kapilläres Leck	25
1.6.7 Apoptose und Neutrophilen-Clearance	27
1.7 Therapeutische Konzepte.....	27
1.7.1 Nicht-pharmakologische Konzepte	28
1.7.2 Pharmakologische Konzepte	30
1.8 Konzepte zur Prophylaxe	32
2. Die Hämoxygenase-1, ein zytoprotektives Molekül.....	33
2.1 Die Metabolite der HO-1	36
2.1.1 Kohlenstoffmonoxid	36
2.1.2 Biliverdin und Bilirubin.....	37
2.1.3 Eisen.....	38
2.2 Enzymaktivität der Hämoxygenase	39
2.3 Regulation der HO-1 in der Lunge.....	39
2.4 Die pharmakologische Beeinflussung der HO-1	41
3. Material und Methoden	44
3.1 Material	44
3.1.1 Versuchstiere	44
3.1.2 Geräte.....	44
3.1.3 Verbrauchsmaterialien	45
3.1.4 Chemikalien	47

3.1.5 Medien	48
3.1.6 Enzyme	49
3.1.7 Medikamente	49
3.1.8 Antikörper	49
3.2 Methoden	50
3.2.1 Induktion einer pulmonalen Inflammation	50
3.2.2 Induktion und Inhibition der Hämoxigenase	51
3.2.3 Versuchskonditionen	52
3.2.4 Histologische Präparate	53
3.2.5 Immunhistologische Präparate	54
3.2.6 Differenzialblutbilder	59
3.2.7 Nachweis der pulmonalen Gefäßpermeabilität	60
3.2.8 Zellkultur und <i>in vitro</i> -Nachweis der Neutrophilenmigration	63
3.2.9 <i>In-vivo</i> -Nachweis der Neutrophilenmigration	67
3.2.10 Enzymaktivitäts- und Proteinbestimmung der HO-1	73
3.2.11 Zytokinbestimmung in der bronchoalveolären Lavage	76
3.2.12 Statistik	77
4. Ergebnisse	78
4.1 Histologische Untersuchung von Lungenparenchym	78
4.2 Immunhistologische Untersuchung von Lungenparenchym	81
4.3 Differenzialblutbilder	84
4.4 Pulmonale Gefäßpermeabilität	90
4.5 <i>In vitro</i> -Transmigration neutrophiler Granulozyten	92
4.6 <i>In vivo</i> -Migration neutrophiler Granulozyten	94
4.7 Induktion und Inhibition der HO-1-Aktivität	96
4.8 Zytokinbestimmung in der BAL	97
5. Diskussion	99
5.1 Die Rolle der HO-1 bei der Migration neutrophiler Granulozyten	99
5.2 Wirkung von Induktion und Inhibition auf die Enzymaktivität der HO-1	105
5.3 Einfluss der HO-1 auf die Gefäßpermeabilität und die Zytokinlevel	106
5.4 Fazit	108
6. Zusammenfassung	110
7. Literaturverzeichnis	113

8. Abbildungsverzeichnis	128
9. Tabellenverzeichnis	130
10. Erklärung zum Eigenanteil	130
11. Danksagung.....	132

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
A. dest.	Aqua destillata
AECC	Amerikanisch-Europäische Konsensuskonferenz
Ak	Antikörper
ALI	Acute lung injury
AP-1	Aktivatorprotein-1
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
ATP	Adenosintriphosphat
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BCA	Bicinchoninsäure
BN	Stabkerniger neutrophiler Granulozyt
BR	Bilirubin
BV	Biliverdin
Ca ²⁺	Kalzium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CF	Zystische Fibrose
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CO	Kohlenstoffmonoxid
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CoPP	Kobalt-Protoporphyrin
CORM	Carbon Monoxide-Releasing Molecules
CXCR1	Chemokinrezeptor 1
CXCR2	Chemokinrezeptor 2
DAB	3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DGIIN	Deutsche Gesellschaft für internistische Intensivmedizin und Notfallmedizin
DIVI	Deutsche interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

EB	Evans blue
ECMO	Extrakorporale Membranoxygenierung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Fe	Eisen
FK	Feuchte Kammer
FSGO	Fischhautölgelatine
G-CSF	Granulocyte-Colony-Stimulating-Factor
HBSS ⁺	Hank´s Balanced Salt Solution mit Mg ²⁺ /Ca ²⁺
HFOV	Hochfrequenzoszillationsventilation
HIF-1	Hypoxie-induzierender Faktor 1
HMVEC-L	Human Microvascular Endothelial Cells - Lung
HO-1	Hämoxygenase-1
HO-2	Hämoxygenase-2
HRP	Horseradish-Peroxydase
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
iNO	inhalatives Stickstoffmonoxid
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IPF	Idiopathische pulmonale Fibrose
IPS	Intensivpflegestation
KC	Keratinocyte-derived Chemokine
KG	Körpergewicht
LPS	Lipopolysaccharid
Mio	Million
MIP-2	Macrophage-Inflammatory-Protein-2
MSC	Mesenchymale Stammzelle
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, oxidiert
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, reduziert
NFκB	Kernfaktor κB
NO	Stickstoffmonoxid
OT	Objektträger

p.i.	post infectionem
paO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PBS ⁻	Phosphate buffered saline ohne Mg ²⁺ /Ca ²⁺
PCWP	Pulmonalarterieller Verschlussdruck
PEEP	Positiver endexpiratorischer Druck
PMN	Polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SIRS	Generalisiertes Inflammationssyndrom
SnPP	Zinn-Protoporphyrin
Tab.	Tabelle
TLR-4	Toll-like-Rezeptor-4
TNF α	Tumornekrosefaktor α
VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1. Acute Respiratory Distress Syndrome

Die akute respiratorische Insuffizienz (ARDS) bezeichnet ein Krankheitsbild, welches ätiologisch bis heute nicht vollständig geklärt ist. Das Hauptsymptom ist eine rasch progrediente pulmonale Gasaustauschstörung, auf die eine schwere Hypoxie folgt. Die pharmakologische bzw. nicht-pharmakologische Beeinflussung der pathophysiologischen Abläufe, die zu diesem schweren Krankheitsbild führen, sind Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten und stellen die Intensivmedizin bis heute vor eine große Herausforderung.

1.1 Epidemiologie des ARDS

Das Krankheitsbild ARDS, im deutschen Sprachraum allgemein als akutes Lungenversagen bezeichnet, ist in Mitteleuropa mit einer Inzidenz von etwa 5 pro 100.000 Einwohner/Jahr eine seltene, jedoch schwer verlaufende und in bis zu 60 % letal endende Erkrankung [1]. Weltweit differieren die Inzidenzen für das ARDS erheblich und reichen bis 64 pro 100.000 Einwohner/Jahr [2]. Zambon und Vincent berichten im Rahmen einer großen Metaanalyse von einer Letalität von durchschnittlich 43% [3]. Rund 9% aller maschinell beatmeten Patienten erfüllen bereits zu Beginn der Beatmung die Diagnosekriterien der Amerikanisch-Europäischen Konsensuskonferenz (AECC) 1994 für ein ARDS [4]. Die Aufwendungen des Gesundheitssystems (Finnland, 2007) betragen durchschnittlich rund 20.700 €/Fall. Maßgeblich für die Aufwendungen ist die Dauer der mechanischen Beatmung. In über 10% der untersuchten Fälle entstehen Kosten von über 50.000 €/Fall [5].

Li et al. berichten von einer deutlich rückläufigen Inzidenzrate von 81% im Jahr 2001 auf 38,3% im Jahr 2008 auf Intensivpflegestationen (IPS) an der Mayo Clinic in Rochester/Minnesota. Zu einem Rückgang der Letalität kommt es in dieser Zeit jedoch nicht. Als ursächlich für den Inzidenzrückgang nennen die Autoren Fortschritte in der Intensivmedizin: Ventilation mit niedrigen Tidalvolumina, restriktive Handhabung von Bluttransfusionen sowie forcierte Pneumonie- und Sepsistherapie. Interessanterweise haben über den

Beobachtungszeitraum die Erkrankungsschwere und die Komorbiditäten der betroffenen Patienten zugenommen [6].

Trotz einiger Fortschritte im Verständnis der Pathophysiologie des ARDS und technischer Weiterentwicklungen im Beatmungsmanagement dämpfen Fergusson und Mitarbeiter die Euphorie. Die Letalität des ARDS ist den Autoren zufolge seit 1994 nahezu unverändert [7].

1.2 Klinisches Erscheinungsbild

Das klinische Erscheinungsbild des ARDS ist gekennzeichnet durch eine rasch progrediente und therapierefraktäre Hypoxämie, eine pulmonale Hypertension, eine herabgesetzte pulmonale Compliance und eine diffuse bilaterale Infiltration in der Röntgenthoraxaufnahme. Die Schwierigkeit bei der Diagnosestellung besteht darin, dass die einzelnen Befunde nicht spezifisch für ein ARDS sind. Erschwerend kommt der rasche Krankheitsverlauf hinzu. Von einem pathologischen Röntgenthoraxbefund bis zum lebensbedrohlichen Krankheitsbild vergehen im Durchschnitt nur 12 bis 72 Stunden [8].

Die Diagnosestellung erfolgt nach den Definitionen der AECC für das ARDS [9;10], sowie in Deutschland in Ergänzung dazu nach den Leitlinien der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI). Demnach ist das ARDS gekennzeichnet durch einen akuten Beginn, eine Oxygenierungsstörung $\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 \leq 200$ mmHg, bilaterale Infiltrate in der Röntgenthoraxaufnahme und einen pulmonalarteriellen Verschlussdruck PCWP ≤ 18 mmHg. Für die Diagnosestellung eines ARDS muss eine kardiale Ursache für die pulmonalen Infiltrate ausgeschlossen werden [11]. Die AECC unterscheidet bezüglich des Grades der vorliegenden Oxygenierungsstörung einen mittleren Schweregrad, Acute Lung Injury (ALI) ($\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 \leq 300$ mmHg), und einen hohen Schweregrad, ARDS ($\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 \leq 200$ mmHg) [9;10]. Der Beginn eines ARDS zeichnet sich durch klinische Symptome wie zunehmende Dyspnoe, Tachypnoe und therapierefraktäre Hypoxie aus, welche letztendlich eine intensivmedizinische Therapie des Patienten unabdingbar machen.

Trotz der weitläufigen Anwendung der AECC-Definitionen sind die Kriterien zur Diagnosestellung des ARDS nicht ausreichend validiert. In einer Publikation aus dem Jahr 2004 werden Obduktionsergebnisse mit den ARDS-Definitionen der AECC verglichen und kritisch beurteilt. Es wird festgestellt, dass die Kriterien nur ungenau zutreffen und insbesondere Patienten mit pulmonalen Risikofaktoren mit einer schlechten Sensitivität (61%) und Spezifität (69%) erfasst werden [4]. Eine weitere klinisch-pathologische Studie belegt, dass nur bei etwa der Hälfte der klinisch diagnostizierten und verstorbenen ARDS-Fälle die klassische alveoläre Schädigung durch eine Obduktion bestätigt werden kann [12].

Seit 2012 liegt die sogenannte *Berlin- Definition* zum ARDS auf Grundlage einer Metaanalyse von über 4.000 Patienten vor. Darin sollen einige Limitationen der Definition nach AECC ausgeglichen werden. So werden nun drei anstatt bisher zwei Schweregrade zugrunde gelegt [13;14]. Außerdem kann das neu definierte schwere Lungenversagen ($\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 \leq 100 \text{ mmHg}$) nochmals genauer anhand weiterer Parameter wie beispielsweise dem positiven endexpiratorischen Druck (PEEP), der pulmonalen Compliance und dem Ausprägungsgrad des radiologischen Thoraxbefundes spezifiziert werden. Zudem finden sich in der *Berlin-Definition*, verglichen mit der Definition nach AECC, differenziertere Vorhersagewerte bezüglich der Letalität und eine Auflistung von Risikofaktoren [14]. Die Anwendung der *Berlin-Definition* wird durch die Fachgesellschaften, unter anderem die Deutsche Gesellschaft für internistische Intensiv- und Notfallmedizin (DGIIN) empfohlen [15].

Im Verlauf eines ARDS ist nicht immer die Hypoxie direkt todesursächlich, sondern in zahlreichen Fällen ein Multiorganversagen [16-18].

1.3 Ätiologie

Während sich die Symptomatik des ARDS uniform darstellt, so können die Faktoren, welche zu dieser Erkrankung führen, sehr vielfältig sein.

Bereits in der Beschreibung des ARDS durch Ashbaugh et al. wurden drei auslösende Primärursachen dokumentiert: Pankreatitis, virale Infektion und schweres Trauma [19].

Heute wird zwischen pulmonalen und extrapulmonalen Ursachen unterschieden (siehe Tabelle 1). Dabei sind die pulmonalen (direkten) Ursachen für 57-76% der ARDS-Fälle verantwortlich. Dabei dominieren viral oder bakteriell bedingte Pneumonien [20]. Extrapulmonale (indirekte) Ursachen liegen 24-43% der ARDS-Fälle zugrunde. 7% der Erkrankungen haben gleichzeitig eine pulmonale und eine extrapulmonale Ursache [21].

Pulmonale Ursache	Extrapulmonale Ursache
Pneumonie	Sepsis
Aspiration	Polytrauma
Reizgasinhalation	Schockgeschehen
Lungenkontusion	Akute Pankreatitis
Fettembolie	Kardiopulmonaler Bypass
Beinahe-Ertrinken	Transfusionsschaden
Reperfusionsschaden	Verbrennung
	Schädel-Hirn-Trauma

Tab. 1: Pulmonale und extrapulmonale Ursachen des ARDS [11;21]

Pulmonale Ursachen führen rascher zur Ausbildung des Vollbildes eines ARDS als extrapulmonale Ursachen [7].

1.4 Prognose und Risikofaktoren

Ein besonders schlechtes Outcome zeigen ARDS-Patienten mit Aspirationspneumonie, systemischer Inflammation (SIRS) und maligner hämatologischer Erkrankung als Ursache. Erhöhte Letalitäten liegen auch bei Patienten mit Alkohol- und Nikotinabusus vor [22;23]. Erniedrigte Immunkompetenz, Veränderungen am Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), verringerte antioxidative Kapazität und reduzierte alveolär-epitheliale Zellfunktion sowie hereditäre Ursachen wie beispielsweise Alterationen an proinflammatorischen Zytokinen erhöhen unabhängig von der ARDS-Ursache die Letalität [24;25]. In 21% der Fälle liegt mehr als ein Risikofaktor vor [21].

Steinberg et al. belegen in einer klinischen Studie einen Zusammenhang zwischen der Anzahl der in die Lungen migrierten polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) und dem Outcome der Patienten [26]. Eine dauerhaft erhöhte PMN-Akkumulation in der bronchoalveolären Lavage (BAL) ist mit einer erhöhten Letalität assoziiert. Patienten, bei denen eine Sepsis ursächlich für das ARDS ist neigen zu höherer PMN-Akkumulation in der BAL über längere Zeit. Patienten mit Trauma als Ursache für ein ARDS weisen erhöhte PMN-Level in der BAL meist nur über eine kurze Dauer auf. Demnach weisen ARDS-Patienten mit schwerem Trauma eine Letalität von 24% auf. Im Vergleich dazu versterben 56% der ARDS-Patienten mit schwerer Sepsis bei pulmonalem Infektionsherd [2].

Das Überleben polytraumatisierter Patienten hängt entscheidend davon ab, ob ein ARDS verhindert werden kann. Das Patientenalter spielt in diesen Fällen eine untergeordnete Rolle. Im Gegensatz dazu korreliert das Überleben nicht traumatisch bedingter ARDS-Fälle mit dem Patientenalter, der Grunderkrankung und der Liegedauer auf der Intensivpflegestation [27].

1.5 Pathophysiologie

Die wichtigste pathophysiologische Veränderung im akuten Krankheitsgeschehen ist die gestörte Gasaustauschfunktion mit der Folge einer Hypoxämie. Da nur noch wenige Lungenareale normale Ventilations-Perfusionsverhältnisse aufweisen, kann auch eine stetige Erhöhung der inspiratorischen Sauerstofffraktion (FiO_2) keine ausreichende Besserung der Oxygenierung herbeiführen. Der Grad dieser Veränderung kann über das Verhältnis Sauerstoffpartialdruck / inspiratorische Sauerstofffraktion (PaO_2 / FiO_2), dem Horowitz-Index, zum Ausdruck gebracht werden.

Folgen einer Gasaustauschstörung sind ein zunehmender Rechts-Links-Shunt und ein erhöhter Widerstand in der pulmonal-kapillären Strombahn. Diese Widerstandserhöhung ist bedingt durch die Obstruktion von Lungenkapillaren durch Mikrothromben und durch reaktive Vasokonstriktion.

Auf Grund dieser hämodynamischen Veränderungen kommt es zur pulmonalen Hypertension. Diese ist zusammen mit der erhöhten Gefäßpermeabilität im inflammatorisch veränderten Gefäßbett für die entstehenden Lungeninfiltrate

verantwortlich. Das Lungenödem seinerseits führt durch schwerkraftabhängige Kompression zur weiteren Einschränkung des Ventilations-Perfusionsverhältnisses. Zudem kommt es beim alveolären Lungenödem zur Auswaschung von Surfactant und damit zur Atelektase von Alveolen. In schweren Fällen ist nur noch über 20 – 30 % der alveolären Oberfläche ein normaler Gasaustausch möglich [28].

Das Exsudat formiert sich weiter zu hyaline Membranen, die den Übergang zum chronischen Stadium des ARDS kennzeichnen. Zerstörtes Parenchym organisiert sich, Fibrozyten wandern ein und differenzieren sich zu Fibroblasten. Das chronische Stadium endet in einer ausgedehnten Fibrose, also dem Ersatz von Parenchym durch Bindegewebe. Die Fibrose des chronischen Stadiums ist nach überstandenen ARDS der Grund einer irreversibel herabgesetzten Lungenfunktion [16].

1.6 Pathomechanismus

1.6.1 Inflammation

Die Inflammation ist eine komplexe Reaktion des Immunsystems in vaskularisierten Geweben im Falle von Infektion, Toxineinwirkung und Zellschaden [29]. Es handelt sich um einen körpereigenen Schutzmechanismus, welcher zur Verminderung der Erregerausbreitung durch Elimination, Verdünnung der Erregerkonzentration und Erregerabtransport mit der Lymphe dient.

Kommt es beispielsweise zur inhalativen Aufnahme bakterieller Erreger, bilden nach dem Flimmerepithel der Atemwege die Alveolarmakrophagen eine weitere immunologische Barriere. Makrophagen und deren Vorläuferzellen, die Monozyten, sind zum Großteil gewebeständig, gehören zum zellulären angeborenen Immunsystem, bewirken durch Phagozytose die Antigeninaktivierung und setzen Zytokine frei. Makrophagen zerstören im Phagolysosom Mikroorganismen durch antimikrobielle Peptide, Superoxidanionen (O_2^-) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Dieser Prozess wird als „respiratory burst“ bezeichnet. Zudem sind Makrophagen zur Antigenpräsentation befähigt.

Durch den Erregerstrom und den Einstrom antigenpräsentierender Makrophagen in den Lymphknoten kommt es letztendlich auch zur Aktivierung des adaptiven zellulären Immunsystems, der B- und T-Lymphozyten. Dieser Aktivierungsvorgang nimmt wesentlich mehr Zeit in Anspruch.

Weitere Immunzellen sind die neutrophilen Granulozyten (kurz: Neutrophile), welche im Gegensatz zu den Makrophagen nur in geringer Zahl gewebeständig sind. Neutrophile können Antigene nicht präsentieren, sie sterben nach der Phagozytose ab und bilden bei pyogenen Erregern den Eiter [30].

Die Antigenbindung erfolgt über Rezeptoren auf der Oberfläche von Neutrophilen oder Makrophagen, beispielsweise über den CD14-Rezeptor zur

Erkennung von Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien, den Scavenger-Rezeptor zur Bindung von Lipoteichonsäure grampositiver Bakterien und den Toll-like-Rezeptor-4 (TLR-4), der zusammen mit dem CD14-Rezeptor beispielsweise Lipopolisaccharid (LPS) erkennt und bindet [31]. Dem TLR-4 kommt bei der LPS-induzierten Infektion eine große Rolle zu: Zum einen triggert der Rezeptor über intrazelluläre Signalwege die Aktivierung myeloider Abwehrzellen, wie beispielsweise neutrophile Granulozyten, zum anderen führt er zur Synthese und Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren wie Zytokine und Adhäsionsmoleküle [32]. Auch die Expression der Hämooxygenase-1 (HO-1) kann über TLR-4 induziert werden [33]. Schlussendlich führt ein negativer Feedbackmechanismus zur Regulation der inflammatorischen Immunantwort [29].

Die von den Makrophagen freigesetzten Zytokine sind Proteine, welche Zellwachstum und -differenzierung beeinflussen. Sie lassen sich in mehrere Gruppen einteilen, beispielsweise Interleukine, Tumornekrosefaktoren und Interferone. Eine weitere Gruppe stellen spezielle Zytokine dar, welche chemotaktisch auf Zellen wirken. Diese sogenannten Chemokine können weitere Immunzellen, z. B. Neutrophile, entlang ihres Konzentrationsgradienten an den Infektionsort locken.

Bei bakteriellen Infektionen und auch bei LPS-induzierter Lungeninflammation spielen die Zytokine Interleukin-1 (IL-1), IL-6, TNF α und Macrophage-Inflammatory-Protein-2 (MIP-2) eine wichtige Rolle. Zusätzlich ist IL-8 ein wichtiges proinflammatorisches Zytokin beim Menschen. Beim Nager ist es an Stelle von IL-8 das sogenannte Keratinocyte-derived Chemokine (KC). Siehe hierzu auch Kapitel 1.6.3. IL-1 und TNF α sind frühe Zytokine im akuten Lungenversagen und werden von Makrophagen sezerniert [34]. Von besonderer Bedeutung jedoch sind TNF α , MIP-2 und KC, da diese jeweils eine sehr starke chemotaktische Wirkung auf Neutrophile aufweisen [35-37]. Die murinen Chemokine MIP-2 und KC haben zudem eine systemische Wirkung, indem sie für sich alleine als auch zusammen mit Granulocyte-Colony-Stimulating-Factor (G-CSF) für die Neutrophilenfreisetzung aus dem Knochenmark verantwortlich sind [38]. Den bedeutenden Einfluss von MIP-2

und KC belegen Wengner et al. in einer tierexperimentellen Studie, in der bei akuter Peritonitis die Zahl zirkulierender Neutrophiler um über 80 % gesenkt werden kann, wenn MIP-2 und KC durch entsprechende Antikörper neutralisiert werden [38]. Die MIP-2-Konzentration im Plasma in Zuständen der Inflammation unterliegt starken zeitlichen Schwankungen [39] und steigt proportional zur intratracheal applizierten LPS-Dosis [40]. *In vitro* besteht ebenfalls eine positive Korrelation zwischen der applizierten LPS-Dosis und der Freisetzung der Zytokine MIP-2 und TNF α [41]. Arnardottier et al. belegen in ihrer *in vivo*-Studie nach intraperitonealer LPS-Applikation an Mäusen einen raschen Konzentrationsanstieg von TNF α , MIP-2 und IL-6 im Serum innerhalb von ein bis zwei Stunden post infectionem. Der Abfall von TNF α auf das Basallevel erfolgt besonders rasch innerhalb von weiteren drei Stunden, die anderen Zytokine fallen innerhalb von zwölf Stunden wieder auf den Ausgangswert ab [42]. Zytokine haben also zwei Aufgaben: Akkumulation und Migration Neutrophiler sowie die Mobilisation einer großen Anzahl Neutrophiler aus dem Knochenmark.

Nach Antigenexposition kommt zudem der humorale Anteil des angeborenen Immunsystems, das Komplementsystem, zum Einsatz. Bereits in der frühen Phase einer bakteriellen Infektion wird mindestens einer der drei Wege der Komplementkaskade besprochen. Alle drei Wege münden in eine gemeinsame Endstrecke, die mit der C3-Konvertase beginnt. Hierbei werden wichtige entzündungsfördernde Peptide abgespalten, das C3a und das wirkungsstärkere C5a. Beide Peptide locken Makrophagen an, die Rezeptoren für diese Opsine enthalten und den Erreger inaktivieren. Alternativ erfolgt die Lyse des Erregers durch das Komplementsystem selbst.

1.6.2 LPS als experimenteller Auslöser der pulmonalen Inflammation

Lipopolysaccharid (LPS) ist als Endotoxin ein stark pathogener Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien wie beispielsweise Salmonella oder Escherichia coli, zweier relevanter Erreger humaner Enteritiden. Endotoxine wie LPS haben die Eigenschaft, starke Stimulatoren der Zytokinsynthese vor allem von TNF α zu sein. Speziell die Wechselwirkung von TNF α mit Endothel

aktiviert die Endothelzellen, so dass diese rasch Weibel-Palade-Körperchen freisetzen, welche das P-Selektin enthalten. P-Selektin startet die Endothel-Neutrophilen-Interaktion [43]. Siehe hierzu Kapitel 1.6.5.

1.6.3 Humanes und murines zelluläres Immunsystem im Vergleich

In dieser Arbeit wird ein Mausmodell verwendet. Aus diesem Grund wird im Folgenden auf das Mausmodell eingegangen.

Im Grunde sind sich das humane und das murine Genom ähnlich, ca. 80% der Gene sind in beiden Gattungen identisch.

Zudem ist der Aufbau des zellulären Immunsystems der Maus dem des Menschen sehr ähnlich. Ein bedeutender Unterschied findet sich jedoch bei den Neutrophilen. Im menschlichen Differenzialblutbild überwiegt die Anzahl der Neutrophilen im Vergleich zu den Lymphozyten (50 – 70 % versus 30 – 50 %). In der Maus dominiert die Lymphozytenzahl mit über 90 % deutlich über der Neutrophilenzahl [44]. Nur 1 – 2 % der Neutrophilen zirkulieren in der murinen Blutbahn. Etwa 98 % der reifen Neutrophilen sind im Knochenmark lokalisiert und können im Falle einer Immunantwort rasch in die Blutbahn freigesetzt werden [45-47]. Im Rahmen einer Inflammation kann innerhalb kürzester Zeit die Zahl zirkulierende Neutrophiler auf ein Vielfaches des Ausgangswertes steigen [48]. Die gesunde C57Bl/6-Maus, wie sie auch für die Versuche in dieser Arbeit verwendet wird, enthält im Knochenmark von Femur und Tibia etwa $6 \text{ bis } 12 \cdot 10^6/\text{ml}$ Neutrophile, im Rahmen einer Infektion hingegen bis zu $40 \cdot 10^6/\text{ml}$ [49].

Die Lebensdauer der Neutrophilen ist bei Mäusen gegenüber dem Menschen deutlich kürzer, 0,5 Tage versus 5,4 Tage. Befinden sich Neutrophile allerdings in einem aktivierten Zustand, so verlängert sich ihre Lebenszeit [50].

Die Konzentration Neutrophiler im peripheren Blut der Maus liegt bei etwa 500 bis 2.000/ μl . Beim Menschen finden sich Mittelwerte von etwa 4.300/ μl . Die Konzentrationen unterscheiden sich bei der Maus wie auch beim Menschen je nach Ethnie und Geschlecht.

Eine weitere Abweichung beim Vergleich des humanen und murinen Immunsystems zeigt sich bei den Neutrophilen selbst. Während humane

Neutrophile antimikrobielle Peptide, sogenannte Defensine, sezernieren, so sind murine Neutrophile dazu nicht in der Lage. IL-8 spielt im humanen Immunsystem eine bedeutende Rolle, im murinen hingegen KC (Keratinocyte-derived Chemokine) [44]. Mäuse besitzen ein ausgeprägtes bronchial lokalisiertes lymphoides Gewebe, Menschen hingegen nicht in dieser Ausprägung [51].

1.6.4 Die Rolle der neutrophilen Granulozyten in der Inflammation

Im Rahmen einer Inflammation sezernieren Endothelzellen, Makrophagen und andere Immunzellen G-CSF. G-CSF ist ein Glykoprotein, das auf das Knochenmark wirkt, zum einen die Granulopoese induziert und zum anderen Neutrophile aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf mobilisiert [47;52]. Nach bakterieller Infektion kommt es innerhalb weniger Stunden zur starken Freisetzung von G-CSF in den Blutkreislauf [39]. Es besteht eine Assoziation zwischen erhöhten G-CSF-Level und Inflammation [53;54]. Diese hohen Plasma-Level bleiben über viele Stunden auf einem hohen Niveau [42]. Zusätzlich haben proinflammatorische Zytokine direkten Einfluss auf die Neutrophilenfreisetzung aus dem Knochenmark [42;47]. Dementsprechend zeigen Arnadottir et al. in einer Studie mit Mäusen nach intraperitonealer LPS-Applikation eine rasche Erschöpfung knochenmarkständiger Neutrophiler und eine sehr zögerliche Erholung über 48 Stunden post infectionem [42]. Die folgende Abbildung 1 zeigt eine Gegenüberstellung knochenmarkständiger und zirkulierender Neutrophiler im peripheren Blut nach LPS-Applikation.

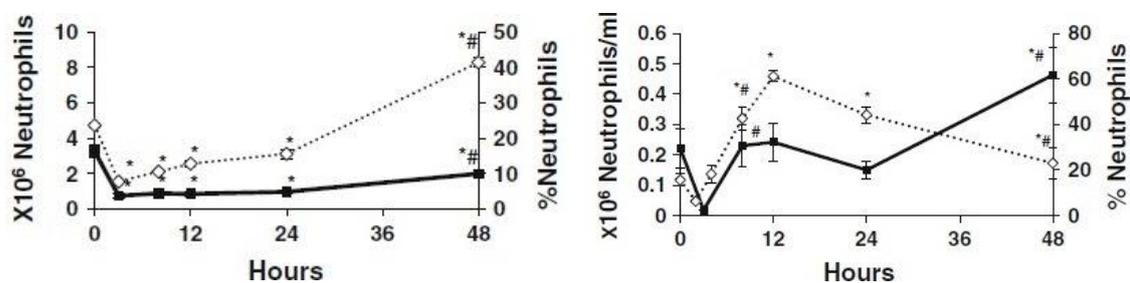


Abb. 1: Verlaufskurven Neutrophiler in Knochenmark (linkes Diagramm) und Serum (rechtes Diagramm) nach LPS-Applikation bei der Maus. Durchgezogene Linie: Absolute Zellzahl; punktierte Linie: prozentualer Anteil [42].

Aktiviert Neutrophile sind für die Immunabwehr unabdingbar. Aufgrund ihrer Abwehrmechanismen, wie Phagozytose von Pathogenen oder Sekretion von zytotoxischen Enzymen, z.B. Myeloperoxydase, Neutrophilenelelastase oder Matrixmetalloproteinase, können sie protektiv oder auch schädlich auf den Organismus wirken. Neutrophile eliminieren die vorhandenen Erreger und begrenzen so im besten Fall eine Inflammation lokal. Dieselben Immunzellen können jedoch bei unkontrolliertem, massenhaftem Übertritt ins Gewebe dieses irreversibel zerstören. Freitas et al. zeigen im Sepsis-Modell, dass eine zu geringe Migration Neutrophiler in inflammatorisches Gewebe ebenso nachteilig sein kann, da dadurch die Immunabwehr geschwächt wird und die Erreger disseminieren können [55].

1.6.5 Endothel-Neutrophilen-Interaktion in den Lungen

Die Extravasation von Neutrophilen erfolgt normalerweise in den postkapillären Venolen. In den Lungen erfolgt dieser Vorgang, im Gegensatz zu anderen Organen, in den Kapillaren [56]. Zusätzlich bieten die Lungen noch weitere Besonderheiten, die im Hinblick auf die Neutrophilenmigration von großer Bedeutung sind. So befindet sich in den Lungen ein ausgeprägtes Kapillarbett, wobei sich eine Arteriole in 40 bis 100 Kapillare aufteilt. Dies hat zur Folge, dass in den Lungen eine 20- bis 60-fach erhöhte Konzentration von Neutrophilen im Vergleich zu den großen systemischen Blutgefäßen vorzufinden ist. Die Transitzeiten Neutrophiler durch das pulmonale Kapillarbett ist mit bis zu 40 s deutlich höher als beispielsweise für Erythrozyten mit 1,5 bis 4 s [57]. Der Grund hierfür ist die für die Passage notwendige Formänderung der Neutrophilen [57-59].

Im Rahmen einer Inflammation verlieren die Neutrophilen durch Umorganisation der intrazellulären Aktinfilamente ihre Verformungseigenschaften, was dann eine verlängerte Verweildauer im pulmonalen Kapillarbett zur Folge hat, die sogenannte Neutrophilen-Sequestration. Die Migration in das Lungenparenchym wird hierdurch erleichtert. Drost et al. betrachten *in vitro* die Auswirkungen auf die Verformungseigenschaften von Neutrophilen, welche mit proinflammatorischen

Substanzen behandelt werden. Unter anderem verringert IL-8 die Verformbarkeit. $\text{TNF}\alpha$ hat hingegen nur geringe Auswirkungen auf die Verformungseigenschaften [35]. Saito et al. untersuchen in ihrer Arbeit die mechanischen Eigenschaften Neutrophiler und zeigen, dass Neutrophile, welche auf Grund inflammatorischer Stimuli aus dem Knochenmark freigesetzt werden, in ihren Verformungseigenschaften steifer sind als bereits zirkulierende Neutrophile. Sie sequestrieren daher leichter im pulmonalen Kapillarbett. Dieser Effekt ist sogar so stark ausgeprägt, dass sich eine signifikante Differenz der absoluten Neutrophilenzahlen im venösen und arteriellen Blut ergibt [60].

Die Migration von Leukozyten in infiziertes Gewebe wird durch Adhäsionsmoleküle induziert. Aktivierte Endothelzellen exprimieren P- und E-Selektine, die interzellulären Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und -2 sowie das vaskuläre Adhäsionsmolekül VCAM-1 auf ihren Oberflächen [61].

VCAM-1 ist induzierbar und wird von den Endothelien großer und kleiner Blutgefäße exprimiert. Es vermittelt die Adhäsion von Immunzellen wie Lymphozyten, Monozyten und Leukozyten an der Gefäßwand [62].

P-Selektin, welches innerhalb von Minuten nach endothelialer Interaktion mit proinflammatorischen Zytokinen wie $\text{TNF}\alpha$ oder IL-6, beziehungsweise nach direkter Interaktion von LPS mit Weibel-Palade-Körperchen exprimiert wird, induziert die Synthese von E-Selektin, welches von aktivierten Endothelzellen innerhalb von 90 Minuten neu synthetisiert wird. Beide Selektine maximieren das Rollen und die Adhärenz Neutrophiler am Endothel [43;63]. Ein Defizit bei den P- und E-Selektinen führt zu einer verstärkten Infektanfälligkeit [64;65]. Ebenso führt ein Fehlen von Rezeptoren für $\text{TNF}\alpha$ und IL-6 auf Endothelzellen zu drastisch reduzierten Proteinkonzentrationen von ICAM-1, VCAM-1, P- und E-Selektin [66]. Sepsispatienten zeigen erhöhte Level von E-Selektin und ICAM-1. Hohe Level dieser Marker sind mit einem schlechteren Outcome verbunden [67;68].

Ein weiteres Selektin, das L-Selektin, wird von Neutrophilen exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Adhäsion bereits rollender Leukozyten an der Gefäßwand [63;69].

Die Migration der Neutrophilen durch das Endothel kann prinzipiell auf zwei verschiedene Arten ablaufen, der parazellulären und der transendothelialen Route. Siehe folgende Abbildung 2.

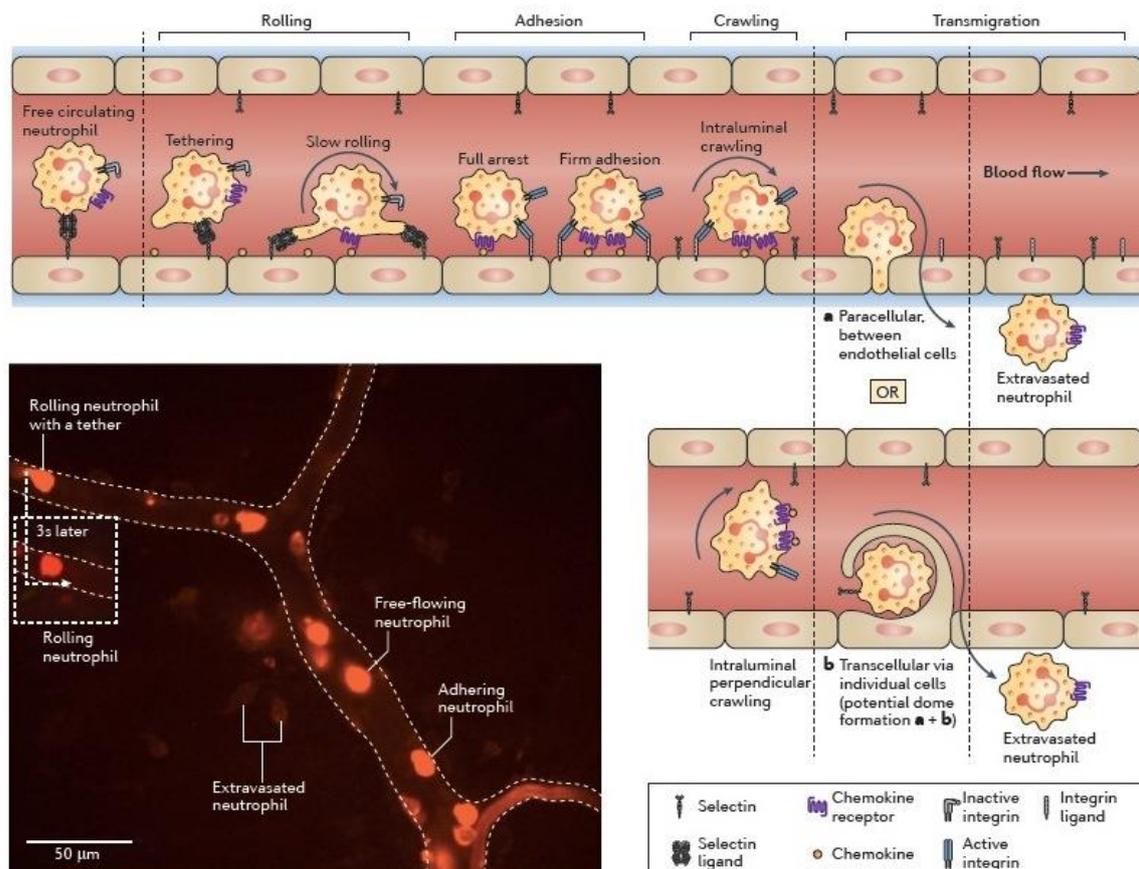


Abb. 2: Neutrophilenmigration aus dem Intravasalraum in das Gewebe [63].

Bereits beim Rollen der Neutrophilen am Endothel kommt es durch weitere komplexe biochemische Vorgänge zum intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg in Endothelzellen, wodurch diese kontrahieren und einen parazellulären Durchtritt Neutrophiler in das Interstitium erleichtern. Zudem werden durch die Neutrophilen-Elastase Zell-Zell-Kontakte gelöst [56]. Letztlich sezernieren aktivierte Neutrophile auch die Gewebshormone Prostaglandin E und F, welche über den Arachidonsäuremetabolismus und das Enzym Cyclooxygenase

reaktive Sauerstoffspezies (ROS) hervorbringen, die über ihre zytotoxische Wirkung ebenfalls Zell-Zell-Kontakte zerstören können [56]. Auch Scherspannungen durch das Rollen Neutrophiler an der Gefäßwand dehnt diese und erleichtert den Durchtritt Neutrophiler [63]. Der Vorgang der Extravasation Neutrophiler wird als Diapedese bezeichnet.

Bei der transendothelialen Migrationsroute formen ICAM-1-haltige vesikulo-vakuoläre Organellen intrazellulär einen Kanal, durch den Neutrophile migrieren können. Die transendotheliale Neutrophilenmigration erfolgt vor allem in Bereichen, in denen das Endothel dünn ist [56].

Die Migration der Neutrophilen durch die endotheliale Basalmembran und die Perizytenhülle der Kapillaren geschieht mittels Neutrophilenelastase und Matrixmetalloproteasen. Im physiologischen Zustand sind diese durch körpereigene Proteaseinhibitoren geblockt [56].

Während der gesamten Migration werden die Neutrophilen per Chemotaxis zum Infektionsherd geleitet. Vor allem das von aktivierten Makrophagen in großen Mengen freigesetzte IL-8 bewirkt so einen chemotaktischen Konzentrationsgradienten, entlang dessen die Neutrophilen zum Infektionsherd gelangen können. Kurdowska und Mitautoren zeigen, dass eine hohe Konzentration an IL-8 in der humanen BAL mit einem schlechten Outcome beim ARDS assoziiert ist [70]. Nicht zuletzt rekrutieren aktivierte Neutrophile selbst durch Synthese und Sekretion von Chemokinen weitere Neutrophile [63].

In einer tierexperimentellen Arbeit untersuchen Reutershan et al. den zeitlichen Ablauf der Migration Neutrophiler nach LPS-Inhalation in den Lungen der Maus. Die intravaskuläre Neutrophilen-Konzentration im pulmonalen Kapillarbett erreicht 4 Stunden nach LPS-Inhalation ihren Maximalwert und fällt danach wieder ab. Während dieser Zeit erfolgt bereits die Migration in das Interstitium, erreicht dort nach 12 Stunden sein Maximum und stagniert danach. Der größte Anstieg der Neutrophilenzahlen im Alveolarraum erfolgt zwischen

der zweiten und vierten Stunde nach LPS-Exposition und steigt daraufhin kontinuierlich weiter an [71]. Siehe Abbildung 3.

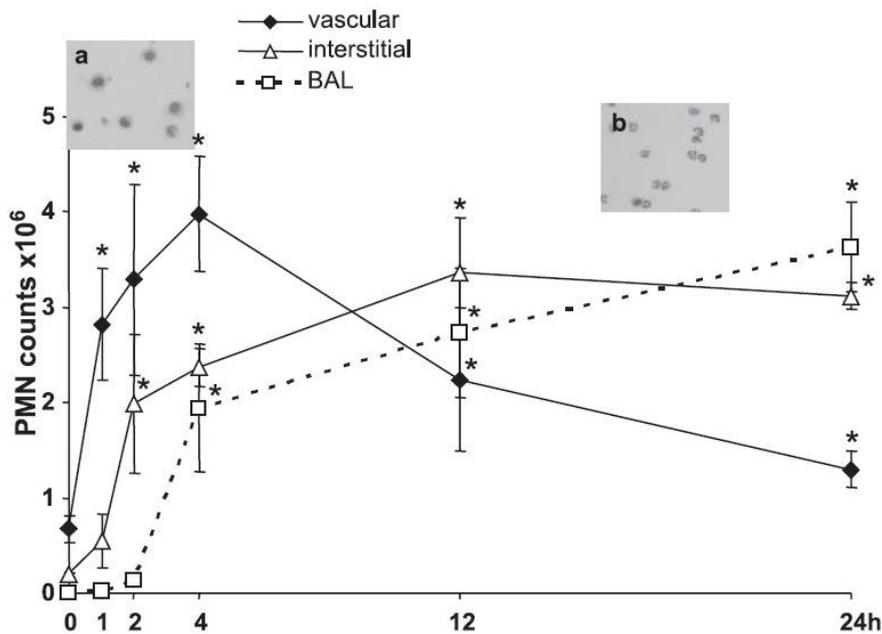


Abb. 3: Zeitlicher Verlauf der Migration Neutrophiler in die Kompartimente der Lunge: Intravasalraum, Interstitium und Alveolarraum. BAL = Bronchoalveoläre Lavage, PMN = Polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt [71].

1.6.6 Endotheliale Barrierefunktion und kapilläres Leck

Das Endothel bildet die innerste Schicht der Blutgefäße und hat damit mehrere wichtige Funktionen wie beispielsweise bei der Blutgerinnung, Angiogenese und Inflammation. Unter physiologischen Bedingungen findet eine geringfügige Migration von Neutrophilen und Makrophagen statt. Persistiert hingegen eine massenhafte Migration Neutrophiler durch pulmonales Endothel, beispielsweise im Rahmen einer Inflammation, so kann dies unter anderem zur Entstehung bilateraler proteinreicher Lungeninfiltrate wie beim ARDS führen [72].

Interzelluläre endotheliale Verbindungen bestehen aus Tight Junctions, Adherens Junctions und weiteren Adhäsionsmolekülen. Diese interzellulären Verbindungen stehen über die Proteine Occludin und Claudin beziehungsweise Cadherin und Catenin in Kontakt mit intrazellulären Membranproteinen und gewährleisten so die endotheliale Barriere [73;74]. Das Endothel stellt eine

größenselektive Barriere dar, wobei den Adherens Junctions, die eher basal angeordnet sind, die tragende Rolle bei der endothelialen Barriere zukommt [75;76].

Einige lösliche Faktoren wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS), TNF α , LPS und viele andere sind bekannt dafür, die endotheliale Permeabilität zu erhöhen. Diese Faktoren binden an Plasmamembranrezeptoren, erhöhen unter anderem den intrazellulären Ca²⁺-Gehalt in den Endothelzellen und verursachen damit eine Störung der Endothelbarriere [73]. Insbesondere den ROS kommt eine wichtige Rolle in der Ödembildung bei entzündlichen Vorgängen zu [77]. ROS werden von aktivierten Neutrophilen in erheblicher Menge gebildet und zerstören direkt endotheliale Zell-Zell-Kontakte [78].

Zudem sezernieren aktivierte Neutrophile, wie unter 1.6.5 bereits beschrieben, verschiedene Enzyme, welche zytotoxischen Charakter besitzen, beispielsweise Neutrophilenelelastase, Myeloperoxidase, Defensine, Matrix-Metalloproteinasen und Lysozyme [56;72]. *In vitro* können Hermant et al. die Destruktion des Cadherin durch Neutrophilenelelastase nachweisen [79]. Matrix-Metalloproteasen zerstören die Basalmembran [80].

Im Gegensatz zur endothelialen Barriere ist über die epitheliale Barriere nur wenig bekannt. Zwei Forschergruppen können jedoch zeigen, dass eine destruierte endotheliale Barriere auch die epitheliale Barriere destabilisiert [81;82]. In einer weiteren Studie von Wang et al. wird besonders auf die Interaktion beider Barrieren eingegangen. So können die Autoren *in vitro* an humanen Endothel- und Epithelzellen eine verringerte Migration neutrophiler Granulozyten und geringere Permeabilität durch einen Bilayer, bestehend aus beiden Zellarten, nachweisen. Ein Monolayer aus Endothelzellen zeigt unter Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen oder LPS wenig Widerstand gegenüber Neutrophilenmigration und zeigt zudem eine stark zunehmende Permeabilität [83].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aktivierte Neutrophile in Interaktion mit dem Endothel durch mehrere oben beschriebene Mechanismen die endotheliale Barriere direkt oder indirekt schädigen.

1.6.7 Apoptose und Neutrophilen-Clearance

Der programmierte Zelltod reguliert die Funktion des Immunsystems. So werden zum Beispiel Immunreaktionen beendet, indem Immunzellen nach erfolgreich bekämpfter Infektion beseitigt werden. Die Apoptose ist ein geregelter Vorgang und kann auf zwei Wegen induziert werden, wobei beide Wege in eine gemeinsame Endstrecke münden, der Aktivierung spezieller Proteasen [84].

Die eine Möglichkeit ist der *intrinsische* Weg, bei dem die Apoptose aufgrund schädlicher Reize wie Chemotherapeutika oder UV-Strahlung ausgelöst wird.

Eine andere Möglichkeit ist der rezeptorvermittelte Signalweg, der sogenannte *extrinsische* Weg. Über letztgenannte Möglichkeit kann auch TNF α zur Aktivierung der Apoptose führen, als Ligand am Tumornekrosefaktor-Rezeptor-1 (TNFR-1) [43].

In der BAL von ARDS-Patienten kann eine verzögerte Neutrophilenapoptose nachgewiesen werden. So supprimieren erhöhte Level von G-CSF und IL-8 in der BAL die Neutrophilen-Apoptose [85;86].

Zudem werden Neutrophile aus der Zirkulation entfernt, indem durch Organe wie Milz, Leber und Knochenmark eine Neutrophilen-Clearance zu jeweils etwa 30% erfolgt. In diesen Organen entfernen Makrophagen gealterte Neutrophile [48;87].

1.7 Therapeutische Konzepte

Trotz intensiver Forschungen zum Thema ARDS kann bislang keine spezifische Therapie empfohlen werden. Die Behandlungskonzepte sind lediglich supportiv. Parallel zu den supportiven Maßnahmen muss der Auslöser

therapiert werden, da ansonsten das akute Lungenversagen persistiert und nicht überwunden werden kann.

1.7.1 Nicht-pharmakologische Konzepte

In einer neueren Übersichtsarbeit von Shafeeq et al. wird die lungenprotektive Beatmung bereits in einem frühen Stadium des ARDS neben der kausalen Therapie bei bekanntem Fokus, z.B. der antibiotischen Therapie bei Pneumonie, als die bis heute einzige effektive therapeutische Möglichkeit gesehen [88].

Die Beatmungsstrategien haben sich über die Jahre mit dem Zugewinn an Erfahrungen und technischen Weiterentwicklungen geändert. Während Burchardi 1987 noch größere Beatmungsvolumina empfiehlt [16], so strebt man heute Beatmungsvolumina von ≤ 6 ml/kg KG sowie niedrige Spitzendrücke von < 30 cm H₂O an. Durch die Anwendung dieser Beatmungsparameter kann das Outcome der Patienten, unter anderem durch die verringerte Gefahr eines Barotraumas, verbessert werden [89;90].

Eine weitere mögliche Strategie bei ARDS-Patienten ist die Hochfrequenzoszillationsventilation (HFOV). Dabei werden sehr niedrige Beatmungsvolumina von 1 bis 3 ml/kg KG mit sehr hohen Beatmungsfrequenzen von 60 bis 360 min⁻¹ kombiniert. Dadurch kann ein verbessertes Alveolarrekrutment erreicht, ein endexpiratorischer Alveolarkollaps vermieden und die intrapulmonalen Scherkräfte reduziert werden [89]. Bein et al. untersuchen in einer prospektiven, randomisierten Studie Tidalvolumina von etwa 3 ml/kg KG in Verbindung mit einer extrakorporalen Membranoxygenierung (ECMO). Es lassen sich nach Angaben der Autoren die Anzahl der Beatmungstage und die Aufenthaltsdauer auf der IPS verringern [91]. Aktuelle Studien widerlegen allerdings einen Überlebensvorteil bei Anwendung der HFOV. In der OSCAR-Studie berichten die Autoren von keinerlei Vorteil der HFOV-behandelten Patienten gegenüber den konventionell ventilierten Patienten [92]. Die OSCILLATE-Studie der Canadian Critical Care Trials Group musste abgebrochen werden, da die Letalität unter den HFOV-Patienten signifikant höher war als unter den Kontrollpatienten [93]. Die Deutsche Gesellschaft für

internistische Intensivmedizin und Notfallmedizin (DGIIN) rät bei der Ventilation von ARDS-Patienten deshalb von der HFOV ab.

Die PEEP-Beatmung findet in heutigen Beatmungsstrategien auf Intensivstationen praktisch immer Anwendung. Bereits 1967 wurde die Beatmung mittels PEEP beim ARDS beschrieben [19]. Der klinische Standard ist heute die Festlegung des PEEP-Niveaus anhand von Druck-Volumenbeziehungen der jeweiligen Patientenlunge und erfolgt somit unter Berücksichtigung der individuellen Patientenverhältnisse [94]. Briel und Mitautoren können in einer Metaanalyse für Patienten im schweren Lungenversagen ($\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 < 200$) einen Überlebensvorteil bei höheren PEEP-Werten nachweisen [95].

Ein weiteres nicht-pharmakologisches Konzept ist die Bauchlagerung, die auch in der entsprechenden AWMF-Leitlinie zum Ausdruck kommt [96]. Dadurch soll die Rekrutierung atelektatischer Lungenareale verbessert werden. So werden der Rechts-Links-Shunt durch Vergrößerung der Gasaustauschfläche und dadurch wiederum die Hypoxämie reduziert. Die Bauchlagerung birgt jedoch Risiken: Extubation, Verlust des ZVKs, Arrhythmie, Hypotension und Erbrechen [97;98].

Einen Nutzen der Bauchlagerung beim ARDS können Reutershan et al. nachweisen [99]. Eine Reduktion der Letalität wird von Guérin et al. in der PROSEVA-Studie nachgewiesen [100]. Danach wird insbesondere beim schweren Lungenversagen eine intermittierende Bauchlagerung empfohlen.

Bei progredientem Krankheitsverlauf und ausbleibendem Erfolg auf oben beschriebenen Maßnahmen hinsichtlich ausreichender Oxygenierung und CO_2 -Elimination kann die extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO) zum Einsatz kommen. Diese Maßnahme ist mit hohem technischem und personellem Aufwand verbunden und obliegt daher spezialisierten Zentren. Die Anwendung der ECMO kann bei geeigneten ARDS-Patienten nachweislich die

Letalität senken und erlaubt überdies oftmals erst die Verwendung einer lungenschonenden Beatmung [101].

1.7.2 Pharmakologische Konzepte

Bis heute können keine wirkungsvollen arzneimittelbasierten Therapiekonzepte zur Behandlung des ARDS genannt werden. Den Grund für das Fehlen derartiger Konzepte sehen verschiedene Autoren in den mannigfaltigen Ätiologien sowie bei der nach wie vor unklaren Pathophysiologie [102;103].

Glukokortikoide nehmen einen großen Stellenwert bei der Erforschung pharmakologischer Interventionsmöglichkeiten beim ARDS ein, da diese durch ihre immunsupprimierende Wirkung einen positiven Effekt im Krankheitsverlauf des ARDS erwarten lassen. Heute wird unter Fachleuten der Nutzen von Glukokortikoiden sowie Empfehlungen zu Dosis und Behandlungsdauer beim ARDS kontrovers diskutiert. Mehrere Studien der vergangenen Jahre kommen zu völlig unterschiedlichen Ergebnissen. Einige Autoren können eine vorteilhafte Wirkung von Glukokortikoiden weder stützen noch widerlegen [104-106]. Lavrovsky et al. belegen in ihrer Studie eine Downregulation der HO-Gen-Transkription durch Glukokortikoide [107]. Eine Übersichtsarbeit von Shafeeq und Lat sieht Fragen zum Therapiebeginn, der optimalen Dosierung und der Therapiedauer bis heute als unbeantwortet [88].

Nahezu ebenso häufig und kontrovers diskutiert wird der Einsatz von Muskelrelaxantien, welche eine optimierte lungenprotektive Beatmung gewährleisten. Verschiedene Studien können bei Einsatz von Cis-Atracurium eine verbesserte Überlebensrate, weniger Beatmungstage und eine verkürzte Liegedauer auf der IPS nachweisen. Zudem soll die Inzidenz von Barotraumen gesenkt werden. Dies gilt insbesondere für schwere Verlaufsformen des ARDS [108-110].

Da die Neutrophilenelastase im Pathomechanismus des ARDS eine erhebliche Rolle spielt, wird versucht, mittels Neutrophilenelastase-Inhibitor Sivelestat die Exazerbation des ARDS zu verringern. Vor allem in Japan wird Sivelestat in

großem Umfang zur Therapie des ARDS eingesetzt. Dabei kann die Applikation bei ARDS-Patienten die Aktivität der Neutrophilenelelastase im Plasma signifikant senken. Eine positive Auswirkung auf das Outcome von ARDS-Patienten ergab sich jedoch nicht [111]. Eine Metaanalyse von Iwata et al. kann außer einer geringfügigen Verbesserung bei der Oxygenierung keine Reduzierung der Beatmungstage nachweisen und dementsprechend den Einsatz von Sivelestat nicht empfehlen [112].

Intratracheal instilliertes rekombinantes Surfactant-Protein-C verbessert unabhängig von der Ätiologie des ARDS die Oxygenierung. Ein Überlebensvorteil durch die Surfactantbehandlung zeigte sich jedoch nur bei Patienten mit ursächlicher Pneumonie oder Aspirationsereignis [113]. Spragg und Mitarbeiter sehen hingegen keine Verbesserungen hinsichtlich der Letalität und beatmungsfreier Tage und empfehlen daher die Surfactantapplikation nicht für die Routineanwendung [114].

Eine neuere tierexperimentelle Studie von Hall et al. zeigt einen protektiven Einfluss nach Applikation mesenchymaler Stammzellen (MSC) nach Induktion einer Sepsis bei HO-1-defizienten als auch -kompetenten Mäusen. Es ergibt sich ein signifikanter Überlebensvorteil für Tiere beider Gruppen, welche MSC erhalten. Dabei finden die Autoren heraus, dass MSC, unabhängig vom Vorhandensein der HO-1 die Phagozytoseaktivität der Neutrophilen signifikant erhöht und damit die Clearance von Pathogenen beschleunigt [115]. Zudem ist bekannt, dass MSC immunregulatorisch wirken. So sinkt nach MSC-Applikation der Serum-Level an den proinflammatorischen Zytokinen TNF α und IL-6, der Level an antiinflammatorischem IL-10 steigt hingegen [116].

Weitere Studien beschreiben eine Behandlungsmöglichkeit des ARDS mit inhalativem Stickstoffmonoxid (iNO). Trotz initial besserer Oxygenierung zeigt sich bei derartiger Intervention keine Verbesserung der Überlebensrate. Lediglich als ultima ratio bei schwerer therapierefraktärer Hypoxie wird die iNO-Therapie empfohlen [117].

Alle vorgenannten Konzepte einer pharmakologischen Intervention in das Krankheitsgeschehen des ARDS bringen noch nicht die erhoffte Reduktion der Letalität. Dies kann, neben der kausalen Fokussanierung, derzeit nur durch eine supportive Maßnahme, der Optimierung der mechanischen Beatmung, erreicht werden [88;102].

1.8 Konzepte zur Prophylaxe

Möglichkeiten der Prophylaxe ergeben sich aus den Risikofaktoren und Auslösern des ARDS. Das Erkennen von Risikopatienten bereits zum Zeitpunkt der Hospitalisierung kann dazu beitragen, die Entstehung eines ARDS zu verhindern oder durch Früherkennung die Erkrankungsschwere abzumildern und letztendlich die Letalität zu senken. Die kurze Entstehungszeit eines schweren Lungenversagens von nur 12 Stunden erfordert schnelles und gezieltes Handeln [8]. Entsprechend der DIVI-Leitlinien ist außer dem sicheren Erkennen möglicher Risikofaktoren der umgehende Einsatz prophylaktischer Maßnahmen wie beispielsweise die Pneumonieprophylaxe in pharmakologischem als auch pflegerischem bzw. physiotherapeutischem Sinne, gegebenenfalls zügige chirurgische Fokussanierung, adäquate Antibiotikabehandlung, Unterstützung der Atemfunktion und die effiziente Volumentherapie mit strenger Bilanzierung erforderlich [11]. Präventiv kann auch das Screening von Risikopatienten auf eine genetische Prädisposition sein, soweit gesetzliche Vorgaben die Möglichkeit dazu geben [118].

2. Die Hämoxygenase-1, ein zytoprotektives Molekül

Durch forcierte Forschungsaktivitäten in den vergangenen Jahren sind für das induzierbare Enzym Hämoxygenase-1 (HO-1) zyto- und gewebeprotective Eigenschaften *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen worden. So konnten protective Eigenschaften gegen oxidativen Stress als auch modulatorische Eigenschaften gegenüber inflammatorischen Prozessen belegt werden [119]. Mit heutigem Wissen spielt die HO-1 eine immunmodulatorische Schlüsselrolle durch zellspezifische Effekte auf myeloide Zellen und Endothelzellen [29]. Die Hämoxygenase (HO) liegt in Form dreier Isoenzyme mit Molekulargewichten von 32 bis 34 kDa im Organismus vor. Die induzierbare Hämoxygenase-1 (HO-1) kommt ubiquitär in allen Geweben vor und zeigt unter physiologischen Bedingungen nur wenig katalytische Aktivität. Eine Ausnahme stellt die Milz dar, in der die HO-1 kontinuierlich hochaktiv ist. Das Isoenzym HO-2 ist konstitutiv aktiv und ebenfalls in den meisten Organen präsent, vor allem in der Milz, den Nieren, den Hoden, der Leber und dem Gehirn. Dem dritten Isoenzym, der HO-3, wird nur eine sehr geringe katalytische Aktivität zugeschrieben [120-122]. Alle drei HO-Isoenzyme unterscheiden sich in den Substratbindungseigenschaften und werden durch eigene Gene codiert, wobei die Aminosäuresequenzen zu etwa 40% homolog sind [123]. Die HO-Proteine besitzen am C-Terminus eine hydrophobe Region, die der Verankerung in der Zellmembran dient. Die HO katalysiert geschwindigkeitsbestimmend und Sauerstoff- und NADPH-abhängig vor allem in den retikuloendothelialen Organen Milz, Leber und Knochenmark den Hämabbau [121]. Dabei entstehen in äquimolaren Mengen Biliverdin, Kohlenstoffmonoxid (CO) und Eisen (Fe) (siehe Abbildung 4). Zudem wird der Proteinanteil des Hämoglobins, das Globin, freigesetzt und im weiteren Verlauf von Proteasen abgebaut. Freies Fe ist unlöslich, sehr reaktiv und wirkt in höherer Konzentration toxisch. Es wird deshalb an das Eisenspeicher- bzw. Akutphaseprotein Ferritin gebunden und steht für den weiteren Stoffwechsel zur Verfügung. CO ist wasserlöslich und hat unter anderem vasodilatative Eigenschaften. Biliverdin wird durch ein weiteres Enzym, die Biliverdinreduktase, NADPH-abhängig in Bilirubin

umgewandelt. In der Leber wird das wasserunlösliche Bilirubin glucuronidiert und gelangt daraufhin in die Galle.

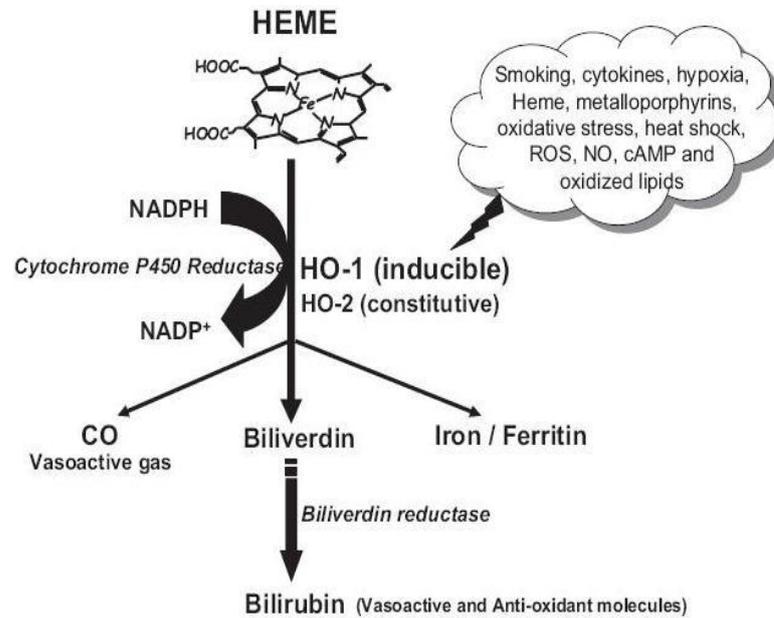


Abb. 4: Hämoxigenase und die katalysierte Reaktion

Abbildung entnommen aus [120]. Abkürzungen zu Abb. 5: cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat; CO: Kohlenstoffmonoxid; NADPH: reduziertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat; NADP⁺: oxidiertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat; NO: Stickstoffmonoxid

Die Induktion der HO-1 ist beispielsweise durch Endotoxine, Metalloporphyrine, Häm, Schwermetalle, Hypoxie, Hyperoxie, Prostaglandine und UV-Strahlung möglich [124-133]. In einer älteren Studie zeigen Oshiro et al. an murinen Zellen der Milz, der Leber und der Nieren nach LPS-Applikation eine deutliche Zunahme der HO-Gen-Transkription und der Proteinmenge im zeitlichen Verlauf [134]. Siehe folgende Abbildung 5.

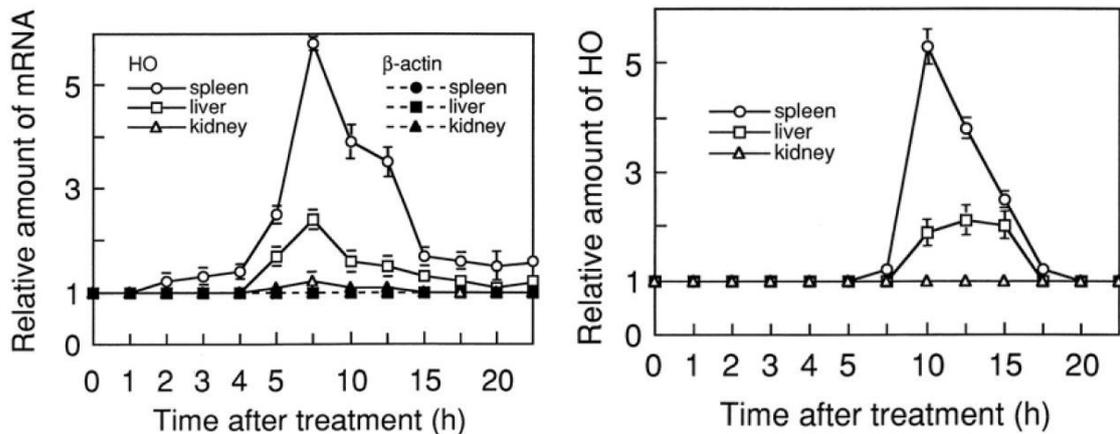


Abb. 5: Zeitlicher Verlauf der HO - mRNA und des HO-Proteins in verschiedenen Organen nach LPS-Behandlung [134].

Donnelly et al. können zudem eine Enzyminduktion durch proinflammatorische Zytokine wie beispielsweise $\text{TNF}\alpha$ oder $\text{IL}1\beta$ nachweisen [135]. Mumby et al. untersuchen die HO-1-Proteinmenge in der BAL von ARDS-Patienten und können erhöhte HO-1-Level in diesem Patientengut feststellen. Die Genese der ARDS-Erkrankungen war dabei unterschiedlich, beispielsweise Sepsis, Pneumonie, post-OP oder Trauma [136]. Tracz et al. unterstreichen den zytoprotektiven Charakter der HO-1 in einer tierexperimentellen Studie. So können die Autoren zeigen, dass in HO-1-defizienten Mäusen ($\text{HO-1}^{-/-}$) die Serum-Level sämtlicher proinflammatorischer Zytokine ($\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-2, IL-6, KC, MIP-2) nach intravenöser LPS-Applikation im Vergleich zu HO-1-kompetenten Mäusen dramatisch ansteigen [137]. Wiesel et al. finden in einer tierexperimentellen Sepsis-Studie mit HO-1-defizienten und heterozygoten Mäusen ($\text{HO-1}^{+/-}$) heraus, dass eine vollständig fehlende HO-1 ($\text{HO-1}^{-/-}$) mit einer erhöhten Letalität durch Multiorganversagen assoziiert ist [138].

Der Fokus soll im Folgenden auf die drei Metabolite Biliverdin, Bilirubin und CO sowie deren antiinflammatorische bzw. vasoaktive Eigenschaften gerichtet sein. Des Weiteren wird nur noch die HO-1 betrachtet, da diese als induzierbares Enzym von besonderem pharmakologischem Interesse ist.

2.1 Die Metabolite der HO-1

Durch den Hämoglobinabbau über die Hämoxigenase-1 entstehen in äquimolaren Mengen CO, Biliverdin, Fe und der Proteinrest Globin. Die drei erstgenannten Metabolite haben einen protektiven Charakter [139], welche im Folgenden und in Abbildung 6 in der Zusammenschau dargestellt werden.

2.1.1 Kohlenstoffmonoxid

Dem Kohlenstoffmonoxid (CO) kommt eine außerordentlich große Bedeutung im Rahmen inflammatorischer Vorgänge zu. Endogen entsteht CO zu über 80% beim Hämoglobinabbau. Dabei liegt eine Korrelation zwischen der HO-1-Enzymaktivität und der Plasma-CO-Konzentration vor. Weitere 20% entstehen HO-unabhängig, beispielsweise durch Lipidperoxidation und Arzneimetabolismus [120;140;141].

Takaki et al. beobachten bei Patienten mit schwerer Sepsis gesteigerte HO-1-Aktivität und höhere CO-Plasmalevel [142]. Ähnliche Studienergebnisse erzielen Zegdi et al. ebenfalls bei Sepsis-Patienten [143]. Beide Forschergruppen können bei kritisch Kranken und erhöhter endogener CO-Produktion einen Überlebensvorteil nachweisen. Allerdings zeigen Melley et al. bei Intensivpatienten nach kardiochirurgischer OP, dass eine exzessiv induzierte HO-1 für das Patientenoutcome ebenso schädlich ist wie eine wenig induzierte HO-1 [144].

CO kann auch exogen in therapeutischem Sinne zugeführt werden. So berichten Sarady et al. am Rattenmodell mit LPS-induziertem Lungenversagen bei CO-Behandlung (1h, 250 ppm) versus ohne CO-Behandlung von einer signifikanten Steigerung der 70-Stunden-Überlebensrate [145]. Eine weitere Studie zeigt unter Zufuhr physiologischer und supraphysiologischer Mengen CO *in vitro* verringertes Rollen und verminderte Adhärenz von Neutrophilen am Endothel [146].

Otterbein et al. zeigen, dass exogene CO-Beaufschlagung von kultivierten Makrophagen die LPS-induzierte Produktion proinflammatorischer Zytokine wie beispielsweise TNF α und IL-1 inhibiert und das antiinflammatorische Zytokin IL-10 induziert [147].

Ein alternativer Applikationsweg für CO wird seit Jahren ebenfalls untersucht und stellt ein interessantes Forschungsgebiet dar. Sogenannte wasserlösliche CORMs (Carbon Monoxide-Releasing Molecules) zeigen in etlichen Tiermodellen bei Sepsis, ARDS und kardiovaskulären Erkrankungen Vorteile ähnlich der inhalativen CO-Zufuhr. Vorteile der CORMs gegenüber dem inhalativen CO sind die direkte Wirkung an den Zielgeweben und die geringere Entstehung von MetHb [119;148-153].

Vasodilatative Eigenschaften des CO

CO ist, alternativ zum Stickstoffmonoxid (NO), ein Induktor der löslichen Guanylatzyklase (sGC). Allerdings ist die Affinität von CO zum Enzym um den Faktor 300 geringer im Vergleich zu NO. Über die induzierte sGC wird vermehrt zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) freigesetzt, welches über intrazelluläre Signalkaskaden vasodilatatorisch auf die Gefäßmuskulatur wirkt. Dieser Effekt kann nach Ischämie/Reperfusionen-(I/R)-Schäden an verschiedenen Organsystemen zu einer verbesserten Durchblutung führen [141].

Sonstige Eigenschaften des CO

CO inhibiert *in vitro* die TNF α -induzierte Apoptose. [154;155]. Zudem wird die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und Wachstumshormonen durch CO gesenkt [147;156-158]. Zhou und Mitarbeiter zeigen *in vivo* am Mausmodell und *in vitro* an fetalen Lungenfibroblasten außerdem einen antiproliferativen Effekt von CO [159].

2.1.2 Biliverdin und Bilirubin

Biliverdin (BV) und Bilirubin (BR) sind Radikalfänger und haben somit antioxidative bzw. zytoprotektive Eigenschaften [160]. So zeigen Sarady-Andrews et al. in einer tierexperimentellen Studie an Ratten nach Applikation letaler LPS-Dosen, dass die Applikation von Biliverdin über eine Reduktion proinflammatorischer und einer Induktion antiinflammatorischer Zytokine zu einem verlängerten Überleben führt [161]. Im Gegensatz zum CO korrelieren bei kritisch kranken Patienten BV und BR nicht mit der HO-1-Aktivität, da bei

diesen Patienten Leberfunktions- und Transportstörungen einen viel größeren Einfluss auf die jeweiligen Plasmakonzentrationen haben als die HO-1. Aus diesem Grund sind beide Metaboliten im Vergleich zu CO als Marker des Häm-Metabolismus wenig geeignet [142;162]. Für beide Reaktionsprodukte wurde auch ein immunmodulatorischer Effekt nachgewiesen. So führen sie zur Inhibition des Kernfaktors κ B (NF κ B) und der IL-2-Produktion in den T-Helferzellen [163].

2.1.3 Eisen

Freies Eisen aus dem Häm-Abbau induziert die Synthese von Ferritin, welches Fe (III) bindet. Damit kommt dem Eisen (Fe) indirekt ein zytoprotektiver Effekt zu [141]. Zudem verringert die *in vitro*-Vorbehandlung von Epithelzellen mit CO die intrazelluläre Fe-Aufnahme, wodurch der intrazelluläre Fe-Gehalt und somit der oxidative Einfluss des Fe vermindert wird [164]. Allerdings steigt mit exzessiver Induktion der HO-1 (> 15-fach) auch der Anteil an freiem Eisen exzessiv, was den Anteil zytotoxischer Sauerstoffradikale erhöht. Die Zytoprotektion durch Ferritin wird dabei aufgehoben und es kommt zu oxidativem Stress mit Gewebeschäden [165].

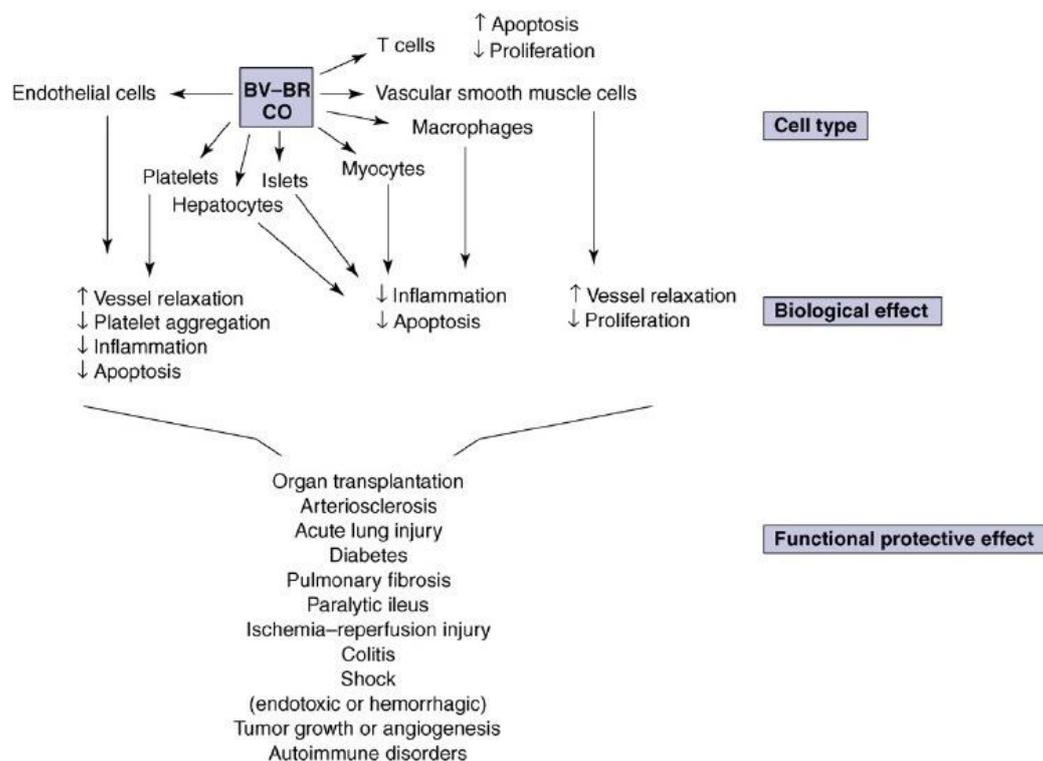


Abb. 6: Eigenschaften der Metaboliten der HO-1

Abbildung entnommen aus [166]. Abkürzungen zu Abb. 6: BV: Biliverdin; BR: Bilirubin, CO: Kohlenstoffmonoxid.

2.2 Enzymaktivität der Hämoxigenase

Maines benennt für verschiedene Organe der Ratte die Aktivitäten der Hämoxigenase und der NADPH-Reduktase. Die höchste gemessene HO-Aktivität weist die Milz auf. Die Lunge zeigt hingegen nur etwa 1/5 der Aktivität der Milz. NADPH ist ein essentiell wichtiger Reaktionspartner sowohl der Hämoxigenase als auch der Biliverdinreduktase [167].

2.3 Regulation der HO-1 in der Lunge

Die HO-1 kommt in verschiedenen pulmonalen Zelltypen vor, beispielsweise in den Epithel- und Endothelzellen, in den Fibroblasten des Interstitiums und in den Alveolarmakrophagen [168]. Als Stimulus kommen Endotoxine, Metalloporphyrine, Zytokine, NO, UV-Licht, Hypoxie, Hyperoxie, Hydrogenperoxid, Häm und Schwermetalle in Betracht. Allen Stimuli ist gemeinsam, dass sie oxidativen Stress auslösen können [122;169].

Eine Hochregulation kann auch im Rahmen von Erkrankungen erfolgen, wie beispielsweise dem ARDS, der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD), der Zystischen Fibrose (CF) und der Idiopathischen Pulmonalen Fibrose (IPF) oder nach Lungentransplantation. Die Regulation erfolgt auf transkriptioneller Ebene. Hier unterscheiden sich die Transkriptionsfaktoren bei Mensch und Maus. Die humane HO-1 wird durch den Transkriptionsfaktor NF κ B am Promotor induziert, wohingegen distale bzw. proximale Enhancer vermutlich keine Rolle spielen [170;171]. Bei der Maus spielen zwei distale Enhancersequenzen bei 4 kB (SX2, 268 bp) und bei 10 kB (AB1, 161 bp) upstream vom Transkriptionsstartpunkt eine Rolle [172;173]. Der Promotor selbst spielt bei der murinen HO-1 hingegen keine Rolle [168;174]. Beide Enhancer besitzen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie Aktivatorprotein-1 (AP-1), Onkoproteine und Faktoren aus der Familie der Leucin-Zipper. Endotoxine wie Lipopolysaccharid bewirken primär über die distalen Enhancer die Transkriptionsverstärkung. Jeder Stimulus wirkt auf eine andere Weise induzierend auf die Transkription. Beispielsweise erfolgt eine hypoxiebedingte HO-1-Aktivierung über den Transkriptionsfaktor HIF-1, AP-1 und NF κ B [175]. Zusätzlich sind zwei weitere Transkriptionsfaktoren bekannt: Transkriptionsinduzierender Nrf2 (NF-E2-related factor 2) und transkriptionsinhibierender Bach1 (BTB and CNC homologue 1). Beide Transkriptionsfaktoren sind im physiologischen Zustand zueinander ausgewogen an die Enhancer gebunden. Häm als HO-1-Induktor kann beispielsweise die DNA-Bindungsaktivität des Bach1 verringern und den Kernexport von Bach1 veranlassen. Gleichzeitig verringert Häm die proteasomale Degradation des induzierenden Nrf2 (siehe Abbildung 7). Shan und Mitarbeiter können an humanen Leberkrebszellen (Huh-7) nachweisen, dass der HO-1-Aktivator Cobalt-Protoporphyrin (CoPP) den Transkriptionsfaktor Bach1 inhibiert und destabilisiert, Nrf2 hingegen induziert und stabilisiert [176].

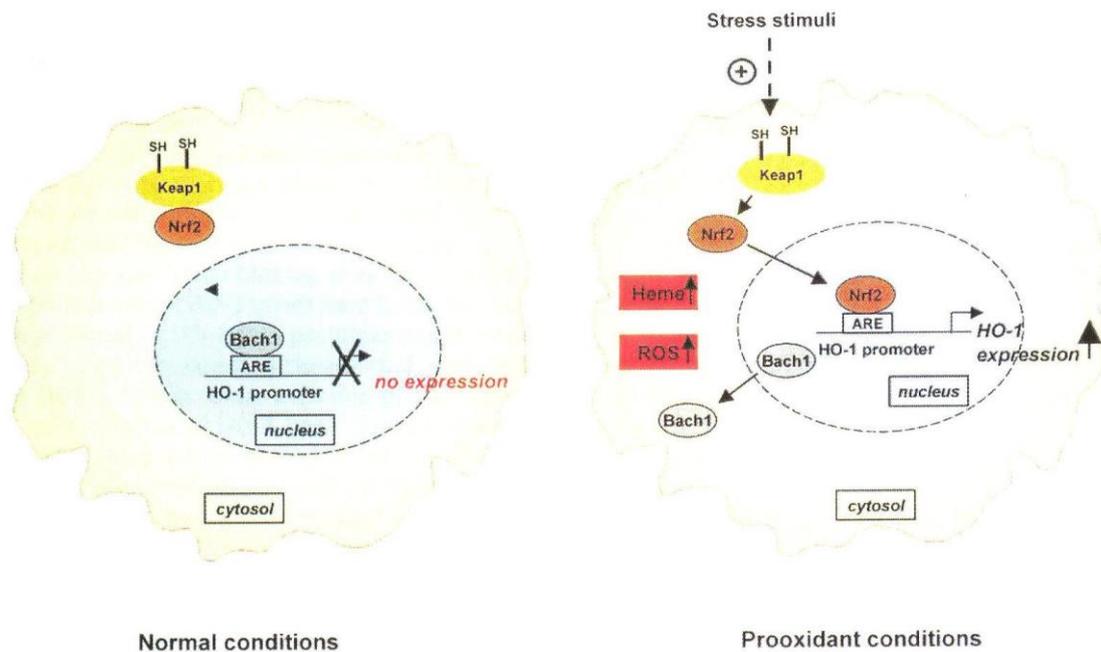


Abb. 7: Regulation des HO-1-Gens durch die Transkriptionsfaktoren Nrf2 und Bach1.

Abbildung entnommen aus [29] Abkürzungen zu Abb. 7: ARE: Antioxidant response element; Bach1: BTB and CNC homologue 1; HO-1: Hämoxxygenase-1; Keap1: Kelch-like ECH-associated protein; Nrf2: NF-E2-related factor; ROS: Reaktive Sauerstoffspezies.

2.4 Die pharmakologische Beeinflussung der HO-1

Insbesondere der immunmodulatorische Effekt der HO-1 auf myeloide Zellen wie Granulozyten, Makrophagen, Monozyten und dendritische Zellen und auf Endothelzellen wird in der Literatur diskutiert [29]. Zahlreiche Studien der letzten Jahre legen eine antiinflammatorische Wirkung der induzierten HO-1 beim ARDS als auch bei anderen schweren Erkrankungen wie beispielsweise hämorrhagischer Schock, Sepsis, Peritonitis, COPD oder Graft-versus-Host-Reaktion *in vivo* im Tiermodell und *in vitro* nahe [29;118;119;121;139;169;177]. Dies bekräftigt Bestrebungen, die auf eine pharmakologisch bedingte Induktion der HO-1 unter anderem zur Therapie bei der pulmonalen Inflammation abzielen.

Die Induktion und Inhibition kann auf vielerlei Art und Weise geschehen (siehe Abbildung 4). CoPP ist ein experimenteller Induktor. Zinn- und Zink-Protoporphyrin (SnPP und ZnPP) sind häufig verwendete Inhibitoren [126;132].

Hämin stellt einen weiteren Induktor dar, welcher experimentell zunehmend Anwendung findet [133].

Die inhibierende Wirkung des SnPP wird durch eine kompetitive Bindung an das katalytische Zentrum des HO-1-Enzyms hervorgerufen. Dadurch wird das Enzym gehemmt, gleichzeitig jedoch die Transkription verstärkt. Neu synthetisiertes Enzym wird unmittelbar gehemmt, so dass die Zunahme an Enzym mit einer gleichzeitigen Abnahme an funktionsfähigem Enzym einhergeht [132].

Sardana et al. untersuchen in ihrer Arbeit die HO-Aktivität in der Leber der Ratte. Dabei wird die HO mittels SnPP inhibiert, mittels CoPP induziert (siehe Abbildung 8). Subcutan appliziertes SnPP vermindert die HO-Aktivität innerhalb von 30 min auf etwa 10% der Ausgangsaktivität, wobei der Enzymgehalt aufgrund mRNA-Syntheseinduktion innerhalb von 12 Stunden zunimmt. Sowohl Synthesesteigerung als auch Enzyminhibition persistieren während der folgenden 24 Stunden.

Nach CoPP-Applikation kommt es wie beim SnPP zur mRNA-Synthesesteigerung und ebenfalls zur kompetitiven Hemmung des fertigen HO-Enzyms durch das CoPP, jedoch überwiegt die induzierende Eigenschaft. [132].

In hohen Dosen kann jedoch die hemmende Wirkung des CoPP überwiegen. Diese Beobachtung machen Woo et al. in einer tierexperimentellen Untersuchung zur Graft-versus-host-Reaktion, wenn bei Überschreitung einer kritischen Dosis das Überleben der Tiere wieder abnimmt [178].

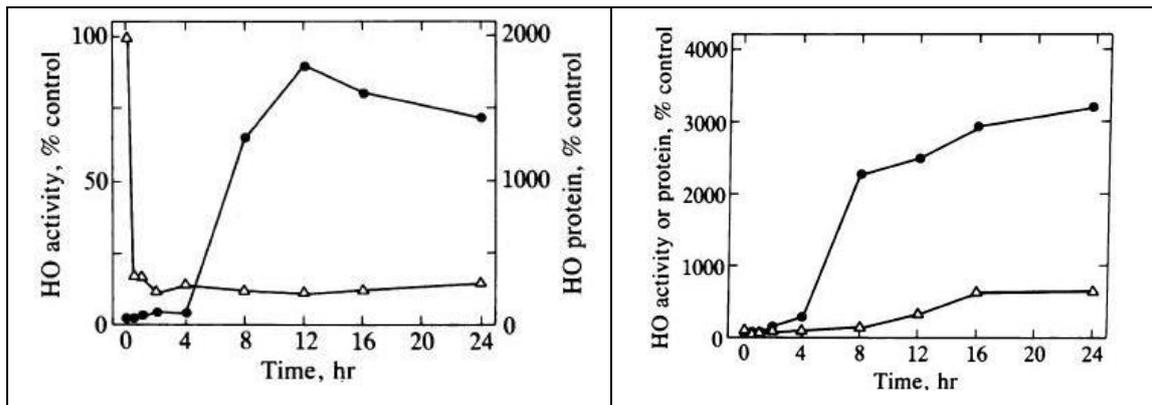


Abb. 8: Induktion und Inhibition der HO-Aktivität. Applikation von SnPP, links; Applikation von CoPP, rechts. Δ = Enzymaktivität, ● = Enzymgehalt [132]

Des Weiteren besteht die Möglichkeit der transgenen Expression der HO-1 mittels Adenoviren, jedoch ist eine derartige Therapie schlecht steuerbar und deshalb in ihren Konsequenzen unvorhersehbar [179].

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Versuchstiere

Für *in vivo*-Versuche werden Wildtypmäuse C57BL/6 von der Firma Charles River in Sulzbach bezogen. Eine Genehmigung aller in dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche durch das Regierungspräsidium Tübingen mit der Genehmigungsnummer A3/10 liegt vor. Die Tiere werden in Käfigen zu vier Stück bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 45 bis 55 % und einer Raumtemperatur (RT) von 23 bis 25 °C gehalten. Ein 12-stündiger Hell-Dunkel-Zyklus ist gewährleistet. Bei Durchführung der Versuche sind die Tiere acht bis zwölf Wochen alt und 20 bis 26 g schwer.

3.1.2 Geräte

Produktbezeichnung	Hersteller
Absaugpumpe Vario Vaccubrand BVC 21	Vacuubrand, Wertheim
Brutschrank cytoperm2	Haraeus, Hanau
Dispergierantrieb MICCRA D-9	ART Prozess- und Labortechnik, Müllheim
Dispergierwerkzeug DS-8/P	ART Prozess- und Labortechnik, Müllheim
Durchflusszytometer FACSort	Becton&Dickinson, Heidelberg
Eismaschine AF-10	Scotsman, Sprockhoevel
Gewebeinfiltrationsautomat TP1050	Leica biosystems, Nussloch
Histoembedder EG 11160	Leica biosystems, Nussloch
Inkubationswasserbad Typ 1003	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Labor-pH-Meter 526	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim
Mehrkanalpipette (3114000158)	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Leica DM-IRB	Leica, Wetzlar
Mikrowelle Cookmate	DEAWOO, Butzbach
Multipette Plus (4981000.019)	Eppendorf, Hamburg
Photometer GENios	Tecan, Crailsheim
Photometer Ultraspec 3000 pro	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Pinzetten (BD312R, BD311R)	Aesculap, Tuttlingen
PipetBoy acu (155000)	INTEGRA Bioscience, Fernwald
Pipetten (0.1-2500 µl)	Eppendorf, Hamburg
Plate washer Columbus Plus	Tecan, Crailsheim
Präzisionswaage HR-120-EC	A&D Instruments, Ltd., Ahrensburg
Rotationsmikrotom RM 2235	Leica biosystems, Nussloch
Scheren (BC590R, BC060R)	Aesculap, Tuttlingen
Steril Bank Leimin-Air HB 2472	Hareaus, Hanau
Thermoschüttler AK 82	INFPORS AG, Bottmingen (CH)
Ultraschall Sonoplus GM 70	Bandelin electronic, Berlin
Vernebler MICRO-A-I-R U22	OMRON Healthcare, Illinois (USA)
Vortex K-55-GE	Bender und Hobein AG, Zürich (CH)
Waage Scout II	Ohaus, Kirchheim
Wärmeplatte HI 1220	Leica biosystems, Nussloch
Wasserbad HI 1210	Leica biosystems, Nussloch
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Hareaus, Hanau

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Produktbezeichnung	Hersteller
Cell culture tube 12 ml, steril (163160)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Citrat-Monovetten	Sarstedt, Nürnberg
Combitips Plus 10 ml (0030069.269)	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser (01-2460/1)	R.Langenbrinck, Emmendingen
Einbettkassetten Rotilapo (K.113.1)	Carl Roth, Karlsruhe
Einweg-Pasteurpipetten (EA70.1)	Carl Roth, Karlsruhe
Färbeeinsatz (11-0002)	R.Langenbrinck, Emmendingen
Färbeküvette (11-0001)	R.Langenbrinck, Emmendingen
GAZIN Mullkompressen (18501)	Lohmann & Rauscher, Neuwied
GAZIN Mullkompressen steril (13620)	Lohmann & Rauscher, Neuwied
Glas Röhrchen No.2775/6 75 x 12 mm	Assistent, Sondheim
Glaspasteurpipetten 150 mm	WU, Mainz
Handschuhe DermaClean (PFC4303971)	Ansell, München
ImmEdge Hydrophobic Barrier Pen (H-4000)	Vector Labs, Peterborough (UK)
Kanüle Safty-Multifly 21G (851638235)	Sarstedt, Nürnberg
Kanülen Microlance 20 G (301300)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Kanülen Microlance 24 G (304100)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Kanülen Microlance 25 G (300400)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Kanülen Microlance 27 G (302200)	Becton&Dickinson, Heidelberg

Kryoröhrchen 1.8 ml Nunc (368632)	Thermo Scientific, Bonn
Mikrotiterplatte Mikroplate (655101)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Mikrotiterplatte Nunc Maxisorp (442404)	Thermo Scientific, Bonn
Mikrotomklinge S35	Feather, Tokjo (J)
Nähgarn Mercifil No 50 (M3541)	Amann und Söhne, Bönningheim
Objektträger (03-0004)	R.Langenbrinck, Emmendingen
Objektträger Superfrost Plus (03-0060)	R.Langenbrinck, Emmendingen
Parafilm	Parafilm
Petrischalen Cellstar (627160)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Petrischalen Cellstar (628160)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Petrischalen Cellstar (633171)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen 10 µl (70.1115)	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen 1000 µl (686290)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen 200 µl (0030.000.870)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 200 µl (70760002)	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen 2000 µl (K315.1)	Carl Roth, Karlsruhe
Polypropylenröhrchen 15 ml (188271)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Polypropylenröhrchen 50 ml (352070)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Polystyrenröhrchen 5 ml (352052)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Quarzglasküvetten (105-200-QS)	Hellma, Müllheim
Reaction-tubes 1.5 ml (616201)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Reagent Reservoir 50 ml (4870)	Corning Incorporated, NY (USA)
Multi-SafeSeal Tubes (7083.1)	Carl Roth, Karlsruhe
Safe-lock tubes 0.5 ml (0030121023)	Eppendorf, Hamburg
Spritze 1 ml (300013)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Spritze Injekt 10 ml (4606108V)	Braun, Melsungen
Spritze Injekt 2 ml (4606027V)	Braun, Melsungen
Spritze Injekt 5 ml (4606051V)	Braun, Melsungen
Stripetten 1 ml (356521)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Stripetten 10 ml (356551)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Stripetten 25 ml (356525)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Stripetten 5 ml (356543)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Transwell Plate 24 well (3472-Clesar)	Corning Incorporated, Wiesbaden
SealPlate (100-SEAL-PLT)	Excel Scientific, Victorville (U.S.A)
Venenkatheter Insyte 22 G (381223)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Zählkammer C-Chip (DHC-N01)	Digital Bio, Seoul (ROK)
Zellkulturflasche für A549 (90076)	TPP, Trasadingen (CH)
Zellkulturflasche für HMVEC-L (3290)	Corning Incorporated, NY (USA)
Zellsiebe Cell Strainer 70 µm (352350)	Becton&Dickinson, Heidelberg

3.1.4 Chemikalien

Produktbezeichnung	Hersteller
ABTS (A1888-2G)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Citronensäure (818707)	Merck, Darmstadt
DAB Chromogen (S3000)	Dako, Hamburg
EDTA (ED4S)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Evans Blue (206334-10G)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formamid (F9037)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
H ₂ SO ₄ (100731)	Merck, Darmstadt
KCl (4936)	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄ (4873)	Merck, Darmstadt
Na ₂ -EDTA (A2937)	AppliChem, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄ (6580)	Merck, Darmstadt
Na-Citrat (35801)	Carl Roth, Karlsruhe
NaCl (106404)	Merck, Darmstadt
NaHCO ₃ (K10720529)	Merck, Darmstadt
NaOH (9913)	Merck, Darmstadt
NH ₄ Cl (A0988)	AppliChem, Darmstadt
K ₂ H PO ₄	Lieferant (HO-Aktivität)
NaH ₂ PO ₄	Lieferant (HO-Aktivität)
MgCl	Lieferant (HO-Aktivität)
Co(III) Protoporphyrin IX chloride (Co654-9)	Frontier Scientific, Logan (U.S.A.)
Sn(IV) Protoporphyrin IX dichloride (Sn749-9)	Frontier Scientific, Logan (U.S.A.)
Chloroform CH-Cl ₃ (C2432)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Glucose-6-Phosphat (G7772)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
NADPH (N1630)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G4134)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
PBS (D5652)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PFA 4% (P6148)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sodium-Acid (S-8032)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid 30% (108597)	Merck, Darmstadt

3.1.5 Medien

Produktbezeichnung	Hersteller
1%-Antibiotic-Antimycotic-Solution (A5955)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Avidin Blocking Kit (SP-2001)	Vector Labs, Peterborough (UK)
Bluing Reagent (7301)	Thermo Scientific, Bonn
Bovine Serum Albumine BSA (A7906-100g)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Diff-Quick (130832)	Medion Diagnostics, Düdingen (CH)
DMSO (D5879)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DPBS without Mg/Ca (14190094)	Gibco, Invitrogen, Darmstadt
EBM-2 (CC-3156)	Lonza, Köln
Eosin (X883.2)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol absolut (A3678)	AppliChem, Darmstadt
Eukitt (03989)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
F-12 Ham's (21765)	Gibco, Invitrogen, Darmstadt
FBS (CC-4102B)	Lonza, Köln
FCS Gold (A15151)	PAA Laboratories, Cölbe
Formalin 4% (A3697)	AppliChem, Darmstadt
FSGO Gelatin (G7765)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
GA-1000 (CC-4381)	Lonza, Köln
Glycerin (1.04094)	Merck, Darmstadt
Hämatoxylin (GHS316)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HBSS (14025050)	Gibco, Invitrogen, Darmstadt
HBSS without Mg/Ca (14175053)	Gibco, Invitrogen, Darmstadt
Hydrocortisone (CC-4112B)	Lonza, Köln
ImmunoSet HO-1 (mouse) ELISA development set (ADI-960-071)	Enzo Life Sciences, Hines Drive (U.S.A.)
I-Glutamin (25030-24)	Gibco, Invitrogen, Darmstadt
LPS (L6011)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol (106009)	Merck, Darmstadt
Paraffin Rotiplast (6642.5)	Carl Roth, Karlsruhe
Percoll Plus (17-0891-01)	GE Healthcare, München
R ³ -IGF-1 (CC-4115B)	Lonza, Köln
Reagent Diluent (DY995)	R&D Systems, Wiesbaden
Recombinant murine MIP-2 (25015)	PeptoTech, Hamburg
rhEGF (CC-4317B)	Lonza, Köln
rhFGF (CC-4113B)	Lonza, Köln
RPMI-1640 (R7509)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Stop Solution (80-184)	Enzo Life Sciences, Hines Drive (U.S.A.)
Substrat Solution (DY999)	R&D Systems, Wiesbaden

TMB Substrate (80-1805)	Enzo Life Sciences, Hines Drive (U.S.A.)
Triton X-100 (A4975)	AppliChem, Darmstadt
Trypsin /EDTA Solution (CC-5012)	Lonza, Köln
Trypsin Neutralizing Solution (CC 5002)	Lonza, Köln
Türk'sche Lösung (109277)	Merck, Darmstadt
Unmasking Solution (H-3300)	Vector Labs, Peterborough (U.K.)
VEGF (CC-4114B)	Lonza, Köln
Xylol (9713.3)	Carl Roth, Karlsruhe

3.1.6 Enzyme

Produktbezeichnung	Hersteller
Collagenase XI (C7657)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNase (D4527)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hyaluronidase (H3506)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3.1.7 Medikamente

Produktbezeichnung	Hersteller
Atropinsulfat 0.5 mg/ml	Ratiopharm, Ulm
Desinfektionsspray Softasept	Braun, Melsungen
Heparin-Natrium 25000 I.E./5 ml	Ratiopharm, Ulm
Ketamin 50mg/ml	Ratiopharm, Ulm
NaCl 0.9% 10 ml	Braun, Melsungen
NaCl 0.9% 100 ml	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Rompun 2% (25ml Xylazin) 20mg/ml	Bayer, Leverkusen

3.1.8 Antikörper

Produktbezeichnung	Hersteller
7/4 FITC (MCA771F)	AbD Serotec, Düsseldorf
Biotinylated rabbit anti rat (BA-4001)	Vector Labs, Peterborough (UK)
CD45 PerCP (557235)	Becton&Dickinson, Heidelberg
DuoSet ELISA IL-6 (DY 406)	R&D Systems, Wiesbaden
DuoSet ELISA KC (DY 453)	R&D Systems, Wiesbaden
DuoSet ELISA MIP-2 (DY 452)	R&D Systems, Wiesbaden
DuoSet ELISA TNF- α (DY 410)	R&D Systems, Wiesbaden

Gr1-633	Lymphocyte Culture Center Core, University of Virginia, Charlottesville (USA)
IgG 2a FITC (553929)	Becton&Dickinson, Heidelberg
IgG 2b APC 553991)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Rat anti mouse neutrophils (MCA771GA)	AbD Serotec, Düsseldorf
Vectastain ABC-KIT (PK-4004)	Vector Labs, Peterborough (UK)

3.2 Methoden

3.2.1 Induktion einer pulmonalen Inflammation

Die Induktion einer pulmonalen Inflammation erfolgt mittels Inhalation von Lipopolysaccharid (LPS) von *Salmonella enteritidis*. Aus jeweils 7 ml einer wässrigen Lösung mit der LPS-Konzentration 0,5 mg/ml wird über einen Vernebler Aerosol hergestellt.

Durch die LPS-Inhalation wird eine reproduzierbare Inflammation aller Kompartimente der Lungen erreicht [71]. Es kommt zu einer vermehrten PMN-Migration, einer erhöhten mikrovaskulären Permeabilität und einem Anstieg proinflammatorischer Zytokine in der BAL [71;180].

LPS ist Bestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien. LPS wirkt stark antigen und in großen Mengen toxisch. Es wird als Endotoxin bezeichnet, da es vor allem beim bakteriellen Zerfall zum Tragen kommt [181].

Für die Versuchsdurchführung werden jeweils vier Tiere in eine durchsichtige Vernebelungskammer gesetzt (siehe Abbildung 9). Das LPS-Aerosol wird durch einen Vernebler (1) erzeugt, gelangt über einen Zuführschlauch (2) in die Vernebelungskammer (3) und wird an der gegenüberliegenden Seite über einen Absaugschlauch (4) aus der Kammer entfernt. Die Vernebelungskammer gewährleistet die gleichmäßige LPS-Inhalation der Tiere. Die Inhalation nimmt circa 30 Minuten in Anspruch.

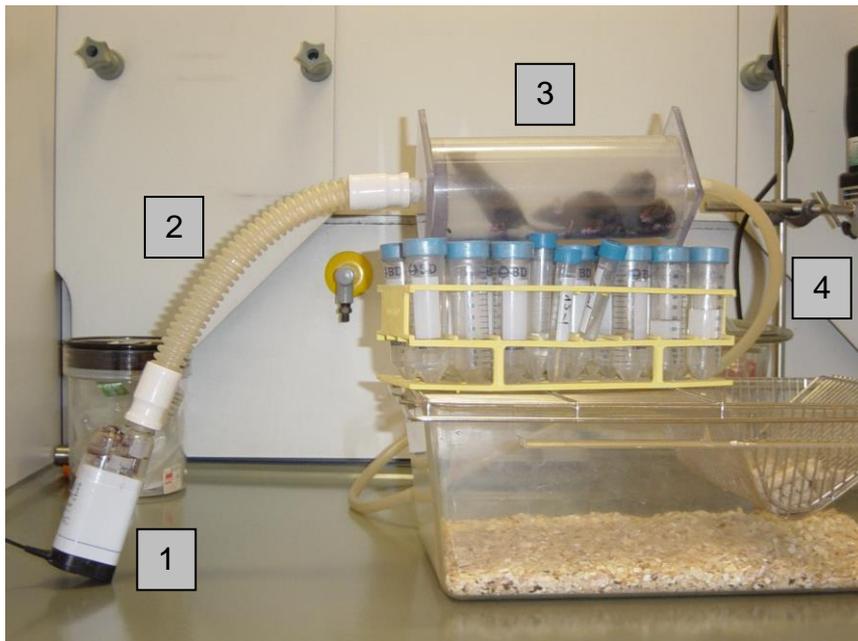


Abb. 9: Vernebelungskammer zur LPS-Inhalation. 1: Vernebler; 2: Zuführschlauch; 3: Vernebelungskammer (20cmx9cm); 4: Absaugschlauch

3.2.2 Induktion und Inhibition der Hämooxygenase

Cobalt(III)Protoporphyrin-IX-Chlorid

CoPP wird als Induktor der HO-1 in der Dosierung 5 mg/kg KG eingesetzt [182]. Damit wird die von Woo et al. genannte kritische Dosis von 5 mg/kg KG nicht überschritten [178]. Die Auflösung des CoPP-Pulvers erfolgt in 0,5 N NaOH in einer Stockkonzentration von 50 mg/ml. Diese Stocklösung wird 1:100 mit NaCl 0,9 % verdünnt und 10 µl/g KG 24 Stunden vor LPS- bzw. NaCl-Inhalation intraperitoneal injiziert.

Zinn(IV)Protoporphyrin-IX-Dichlorid

SnPP wird als Inhibitor der HO-1 in der Dosierung 50 µMol/kg KG eingesetzt [132;183]. Die Auflösung des SnPP-Pulvers erfolgt in 0,5 N NaOH in einer Stockkonzentration von 50 mg/ml. Diese Stocklösung wird 1:13.200 mit NaCl 0,9 % verdünnt und 10 µl/g KG eine Stunde vor LPS- bzw. NaCl-Inhalation intraperitoneal injiziert.

Kontrollgruppe

Tiere der Kontrollgruppe erhalten 0,5 N NaOH 1:100 verdünnt mit NaCl 0,9 % per intraperitonealer Injektion. Tiere, bei denen keine pulmonale Inflammation induziert werden soll, erhalten das Lösungsmittel NaCl 0,9 % über einen Vernebler.

3.2.3 Versuchskonditionen

Die Induktion einer pulmonalen Inflammation erfolgt jeweils mit LPS entsprechend den Ausführungen in Kapitel 3.2.1. Es werden der Induktor CoPP und der Inhibitor SnPP gemäß Kapitel 3.2.2 einzeln und in Kombination miteinander eingesetzt. Die Abbildung 10 stellt die dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuchskonditionen und den zeitlichen Ablauf der Versuche dar.

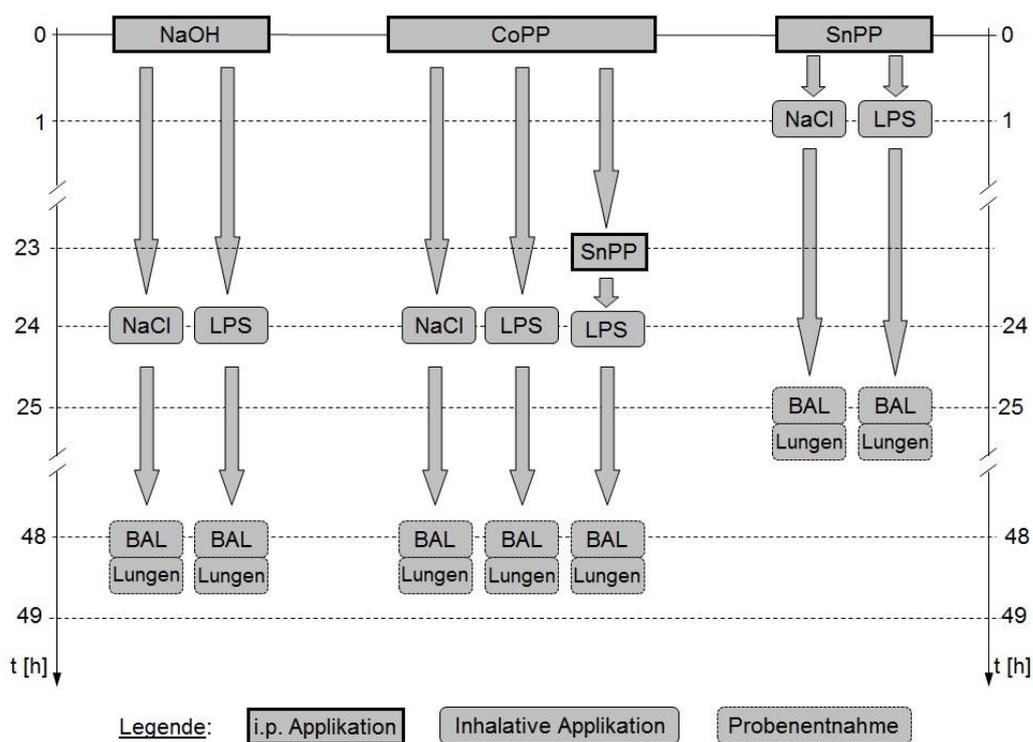


Abb. 10: Versuchskonditionen mit zeitlichen Abläufen. BAL: Bronchoalveoläre Lavage; LPS: Lipopolysaccharid; NaOH: Natronlauge; NaCl: Natriumchlorid; CoPP: Cobalt-Protoporphyrin; SnPP: Zinn-Protoporphyrin; i.p.: intraperitoneal.

3.2.4 Histologische Präparate

Gewebefixierung

Zu jeder Kondition werden Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbungen und immunhistologische Färbungen angefertigt. Hierzu werden die Lungen der Versuchstiere präpariert. Es werden pro Tier 300 µl Narkoselösung intraperitoneal appliziert. Die Narkoselösung setzt sich für drei Mäuse aus folgenden Substanzen und in folgendem Verhältnis zusammen: 200 µl Ketamin, 50 µl Xylazinhydrochlorid 2 % (Rompun[®] 2 %), 40 µl Atropin und 710 µl NaCl 0,9%. Fünf Minuten nach Narkoseeinleitung erfolgt die Thoraxeröffnung, die Präparation der unteren Hohlvene, deren Durchtrennung und die Spülung des noch schlagenden rechten Ventrikels mit PBS⁻. Anschließend erfolgt die Präparation der Trachea. Über eine Trachealkanüle werden die Lungen der Tiere mit Formalin 4 % mit einem Druck von 20 cm H₂O über 15 Minuten beaufschlagt. Anschließend werden beide Lungen aus dem Thorax entnommen und die Lungenflügel getrennt in Einbettkassetten überführt. Daraufhin werden die beschickten Einbettkassetten für mindestens 24 Stunden in Formalin 4% gelagert.

Im Anschluss an die Fixierung wird den Gewebeproben in 70%igem Ethanol über 60 Minuten Feuchtigkeit entzogen. Im Gewebeinfiltrationsautomaten TP 1150 werden die Präparate nach einem in den Gerätedaten hinterlegten, mehrstündigen Automatismus über Nacht mit Paraffin fixiert. Die Einbettung in Paraffin erfolgt am darauffolgenden Tag am Histoembedder EG 11160. Das Schneiden von 7 µm dicken Gewebeschichten erfolgt unter Kühlung der Proben auf Eis an einem Rotationsmikrotom RM 2235. In einem 37°C warmen Wasserbad werden die Schnitte vereinzelt und auf Objektträger überführt. Anschließend erfolgt die Trocknung der Schnitte über Nacht auf einer Wärmeplatte HI 1220.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die HE-Färbung ermöglicht die feingewebliche Differenzierung von Gewebepreparaten. Sie gehört in der Pathologie zu den

Routinefärbemethoden, da sie schnell und einfach durchführbar ist, sowohl an Paraffinschnitten als auch an Gefrierschnitten in der Schnellschnittdiagnostik.

Hämatoxylin ist basisch und färbt im Gewebeschnitt alle sauren (basophilen) Strukturen blau. Somit werden in der Regel die Zellkerne wegen der darin enthaltenen DNA und das Endoplasmatische Retikulum (ER) wegen der darin enthaltenen Ribosomen blau dargestellt.

Eosin ist ein vollsynthetischer Farbstoff, welcher alle basischen (azidophilen) Strukturen rot färbt. Dies trifft beispielsweise auf Zytoplasma und Kollagenfasern zu.

Zunächst werden die Gewebeschnitte vom Paraffin mittels zweimaligem, jeweils fünfminütigem Spülen der Objektträger (OT) im Xylolbad und anschließend jeweils dreiminütigen Spülvorgängen in Ethanolbädern absteigender Konzentrationen (100%, 96%, 70% und 50%) befreit. Daraufhin erfolgt der zehnminütige Färbevorgang im Hämatoxylin-Färbebad. Danach werden die OT für 15 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut und anschließend sofort für eine Minute im Eosin-Färbebad gefärbt. Es folgt dann die Dehydrierung der Gewebeschnitte in aufsteigenden Alkoholkonzentrationen für jeweils drei Minuten und zum Schluss für fünf Minuten im Xylol-Bad. Mit einem Eindeckmedium und Deckgläschen werden die Gewebeschnitte abschließend behandelt und bis zum Mikroskopieren lichtgeschützt und trocken gelagert.

3.2.5 Immunhistologische Präparate

Die Immunhistologie dient der Kenntlichmachung von Epitopen in einem feingeweblichen Schnitt. Ausschlaggebend ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, durch die es idealerweise zu einer hochaffinen und hochspezifischen Bindung zwischen einem Epitop und dem entsprechenden Antikörper kommt.

Im Rahmen dieser Arbeit kommt die indirekte Methode zur Anwendung. Das Epitop stellen PMNs dar. Hierbei richtet sich ein Primärantikörper gegen das Antigen, in diesem Fall ein normal-rat-IgG. Ein Sekundärantikörper, in diesem Fall ein anti-normal-rat-IgG, mit gekoppeltem Enzym, hier

Meerrettichperoxidase (HRP), richtet sich wiederum gegen den Primärantikörper. Durch Zugabe eines Substrates entsteht ein Farbstoff.

Es müssen unspezifische Bindungen zu antigenen Proteinen, welche in der Untersuchung nicht interessieren, reduziert werden. Dies kann mit einem Normalserum geschehen, welches von der Spezies genommen wird, aus der auch der sekundäre Antikörper gewonnen wird.

Bevor ein Antikörper an sein entsprechendes Antigen binden kann, müssen die Antigene demaskiert werden. Denn durch die Formalinfixierung und Paraffinierung der Gewebe geht die Immunreaktivität verloren, da es zu einer Quervernetzung antigener Proteine kommt. Die Antigen-Maskierung kann durch Proteolyse und Erhitzen mit einer käuflichen Unmaskingsolution wieder rückgängig gemacht werden (Antigen-Demaskierung).

Bei der immunhistologischen Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit kommt die signalverstärkende ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex-Methode) zur Anwendung. Avidin ist ein Glykoprotein aus dem Hühnerei, welches vier Biotinmoleküle binden kann. An Biotin ist Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt. Da der Sekundärantikörper biotiniert ist, kann eine freie Avidinbindestelle daran binden. Mittels DAB-Lösung (3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid) kommt es durch Braunfärbung zur Sichtbarmachung des gesuchten Antigens. Da wegen der vier Bindestellen am Avidin entsprechend viel HRP am Sekundärantikörper gebunden wird, ist die Färbung intensiv ausgebildet. Siehe Abbildung 11.

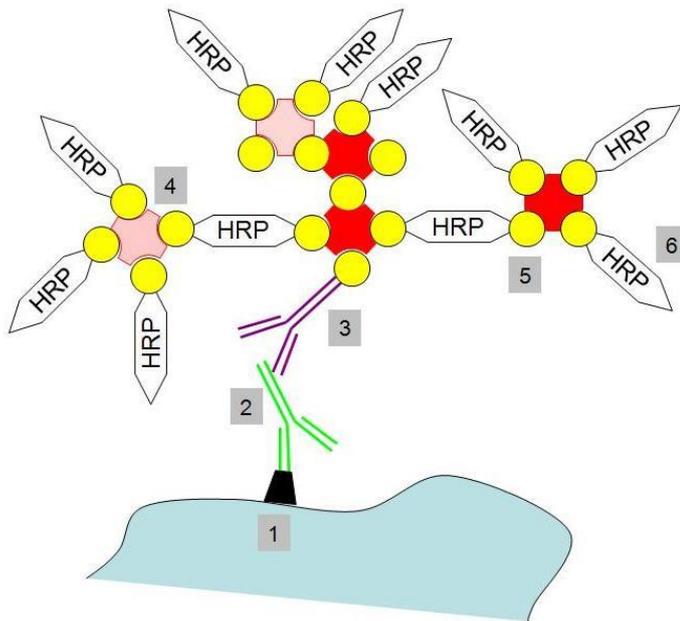


Abb. 11: ABC-Methode. 1. Antigen; 2. Primärantikörper; 3. Sekundärantikörper; 4. Avidin; 5. Biotin; 6. Meerrettichperoxidase (HRP)

Zur Herstellung der immunhistologischen Schnitte werden die auf OT aufgebracht und getrockneten Gewebeproben identisch wie die HE-Färbungen von Paraffin befreit (siehe Kapitel 3.2.4.). Nach zweimaligem fünfminütigem Spülen mit Aqua dest. wird für 30 Minuten in einer Methanol-Wasserstoffperoxidlösung die endogene Peroxidase in den Gewebeschnitten geblockt.

Diese Lösung wird erst unmittelbar vor Gebrauch angesetzt.

Methanol	200 ml
Wasserstoffperoxid	3 ml

Im Anschluss an die Inkubationszeit werden die OT mit A. dest. gespült.

Nun werden die OT in Unmaskingsolution verbracht und 20 min in einer Mikrowelle gekocht.

Unmasking Solution wird mit A. dest. wie folgt angesetzt:

A. dest.	480 ml
Unmasking Solution	4,5 ml

Die Abkühlung der OT in der Unmasking Solution erfolgt bei RT über eine Stunde. Anschließend werden die OT mit PBS⁻ gespült. Mit einem Fettstift werden die Gewebeproben auf dem Objektträger zueinander abgegrenzt. Siehe Abbildung 12.

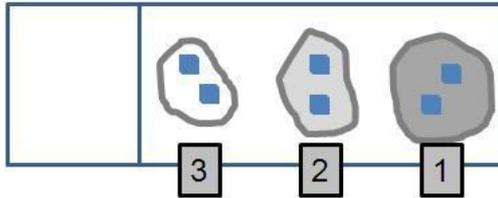


Abb. 12: Objektträger mit Gewebeproben. 1: Rat-Anti-Mouse-6B.2 Alloantigen (spezifische Bindung an Neutrophile); 2: Normal rat IgG (IgG-Kontrolle, unspezifische Bindung an verschiedene Epitope); 3: kein Antikörper

Die OT werden nun in eine feuchte Kammer (FK) überführt und alle eingekreisten Gewebeproben mit Blocking Solution bedeckt. Es folgt eine Inkubation über 60 min.

Blocking Solution ist eine Lösung aus folgenden Substanzen

0,5% FSGO/PBS ⁻	1 ml
Normal rabbit serum (NRS)	100 µl
Avidin Blocking Solution	4 Tropfen

Anschließend wird die Blocking Solution entfernt und die OT fünf Minuten mit PBS⁻ gespült.

Nun erfolgt die Aufbringung des Primärantikörpers in Biotin Blocking Solution.

Die Vorbereitung des Primärantikörpers geschieht wie folgt:

Primär-Antikörper (1 µg/ml)	1 µl
0.5% FSGO/PBS ⁻	1 ml
Normal rabbit serum (NRS)	100 µl
Biotin Blocking Solution	4 Tropfen

Die OT inkubieren über Nacht bei 4°C in der FK.

Am darauffolgenden Morgen wird der Primärantikörper entfernt und die OT fünf Minuten lang mit FSGO/PBS⁻ 5% gespült.

Es folgt nun die Auftragung des Sekundärantikörpers und die erneute Inkubation in der FK für eine Stunde.

Die Vorbereitung des Sekundärantikörpers geschieht wie folgt:

Sekundär-Antikörper	10 µl
0,5% FSGO/PBS ⁻	1 ml
Normal rabbit serum (NRS)	100 µl

Nach der Inkubation wird der Sekundärantikörper entfernt und die OT mit FSGO/PBS⁻ 5% gespült.

Nun wird die ABC-Lösung auf die Präparate aufgebracht und in der FK 30 min inkubiert. Nicht benötigte ABC-Lösung wird für einen Reaktionstest mit DAB-Lösung aufgehoben (siehe unten).

Die Vorbereitung pro 1 ml ABC-Lösung geschieht wie folgt:

PBS ⁻	1 ml
Solution A	20 µl
Solution B	20 µl

Zur Bildung eines AB-Komplexes muss die Lösung 30 Minuten wippen.

Anschließend werden die OT mit PBS⁻ fünf Minuten gespült.

Bereits während der Inkubationszeit wird die DAB-Lösung wie folgt in einem Falcon-Röhrchen mit 10 ml PBS⁻ angesetzt:

Es wird nun eine DAB-Tablette zugegeben, das Falcon-Röhrchen in Alufolie einschlagen und 30 Minuten über Kopf gemischt. Unmittelbar vor Gebrauch der DAB-Lösung werden 10 µl Wasserstoffperoxid (H₂O₂) zugesetzt.

Dann erfolgt ein Reaktionstest von ABC- und DAB-Lösung. Wird jeweils eine kleine Menge der beiden Lösungen zusammengebracht, so sollte das Endprodukt unmittelbar in eine dunkelbraune Farbe umschlagen. Sollte dies nicht der Fall sein, so werden zur DAB-Lösung nochmals 5 µl Wasserstoffperoxid zugesetzt und der Test wiederholt.

Nach erfolgreichem Reaktionstest werden die Gewebeproben mit DAB-Lösung bedeckt. Es folgt eine fünfminütige Inkubation der Proben.

Nach der Inkubation erfolgt eine Spülung mit Aqua dest.

Abschließend erfolgt die Gegenfärbung mit Mayers-Hämatoxylin für 15 Sekunden, ein dreiminütiges Spülen unter fließendem Leitungswasser und ein einminütiges Bläuen mit Bluing Reagent.

Vor dem Eindecken der Objekte mit Eindeckmedium und Deckgläschen werden die Gewebe mittels Alkohol in aufsteigenden Konzentrationen und abschließend mit Xylol dehydriert, wie oben bereits beschrieben.

3.2.6 Differenzialblutbilder

Zur Differenzierung und quantitativen Bestimmung der Zellpopulationen im peripheren Blut werden Differenzialblutbilder zu den verschiedenen Versuchsbedingungen angefertigt. Jeweils vier Versuchstieren wird zu den entsprechenden Zeitpunkten kapilläres Mischblut aus den Schwanzgefäßen entnommen. Der Schwanz wird im relevanten Bereich mit 70%igem Ethanol 30 Sekunden desinfiziert. Während dieser Zeit wird der Schwanz unter einer Infrarotlampe erwärmt, damit sich die Blutgefäße erweitern. Mit einer Mullkompressen wird der Entnahmebereich trocken getupft und mit einer Schere ca. 3 mm des Schwanzendes abgetrennt. Der erste Blutropfen wird verworfen, dann wird mittels einer Pipette 10 µl Blut aufgenommen, in ein Eppendorf-Cup zu 90 µl Türk'scher Lösung überführt und gut vermischt. Die Auszählung erfolgt mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer DHC-N01 bei 20-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop DM-IRB. Ein weiterer Tropfen Blut wird auf einen beschrifteten Objektträger überführt. Mit einem Deckgläschen wird daraus ein Blutausschrieb hergestellt und an Luft getrocknet.

Getrocknete OT werden mittels Schnellfärbeset Diff Quick[®] entsprechend einer Pappenheim-Färbung gefärbt. Mit einer Pinzette werden die OT jeweils fünfmal hintereinander in Fixierlösung, Färbelösung 1, Färbelösung 2 und Spülung getaucht. Anschließend werden die OT an der Luft getrocknet.

Die Auszählung erfolgt mittels Lichtmikroskop DM-IRB bei 64-facher Vergrößerung mit einem Ölimmersionsobjektiv. Pro Objektträger werden 100 Zellen ausgezählt und der prozentuale Anteil der Zellpopulationen dokumentiert. Von jeweils vier Mäusen werden zu jedem Entnahmezeitpunkt der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Über die prozentualen

Anteile der Zellpopulationen und die ausgezählten Zellzahlen lassen sich die absoluten Werte der Zellpopulationen pro ml Blut angeben.

Die Berechnung der Zellzahlen erfolgt nach folgender Formel:

$$N = n \cdot 10 \cdot 2,5 \cdot 1.000$$

Verdünnungsfaktor: 10

Faktor: 2,5

Umrechnungsfaktor $\mu\text{l} \rightarrow \text{ml}$: 1.000

N = absolute Zellzahl in 1/ml

n = gezählte Zellzahl

3.2.7 Nachweis der pulmonalen Gefäßpermeabilität

Proinflammatorische Zytokine und die Migration von Neutrophilen destruieren das Endothel. In der vorliegenden Arbeit wird der Grad des kapillären Lecks durch Inflammationsvorgänge am Endothel durch die Evans-blue-Konzentrationen in Plasma und Lungenparenchym untersucht. Große Proteine wie mit Evans blue (EB) beladenes Albumin verlassen durch inflammatorisch verändertes Endothel den Intravasalraum und werden im Parenchym nachweisbar.

Evans blue, auch T-1824 genannt, ist ein synthetischer Farbstoff aus der Untergruppe der Azofarbstoffe. Wie auch alle anderen Azofarbstoffe ist EB sehr farbkraftig, farbstabil und lichtecht.

EB bindet mit hoher Affinität an Serumalbumin [184], weshalb es in der Forschung vielfach als Tracer für Serumalbumin eingesetzt wird [185]. Je Albumin-Molekül werden bis zu 14 EB-Moleküle gebunden [186]. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass der in dieser Arbeit eingesetzte HO-1-Inhibitor SnPP in der verwendeten Dosis das Serumalbumin in der ersten Stunde nach SnPP-Applikation um bis zu 25 % vermindern kann [183].

EB wird über die Leber metabolisiert und über die Galle ausgeschieden, innerhalb der ersten Stunde nach Injektion bis zu 4% des injizierten EB. Über die Nieren erfolgt keine EB-Elimination [187].

Zur Berechnung der EB-Konzentration pro Gramm Lungenparenchym bekommen die Tiere zu Beginn des Versuchs 20 µg EB / g KG in eine Schwanzvene injiziert.

Aus derselben EB-Lösung wird eine standardisierte Verdünnungsreihe angesetzt, um damit die Kalibrierung des Photometers durchzuführen und eine Ausgleichsgerade zu berechnen.

25 min nach EB-Injektion erfolgt die Narkose des Versuchstieres wie unter 3.2.4 beschrieben.

Fünf Minuten nach Narkoseeinleitung, also 30 min nach EB-Injektion, erfolgt die Eröffnung des Thorax. Aus dem rechten Ventrikel werden mittels heparinisierter Spritze (Na-Heparin) 250 µl Blut entnommen und in einem Eppendorf Cup auf Eis zwischengelagert. Es folgen die Durchtrennung der V. cava inferior und die Spülung des schlagenden rechten Ventrikels mit PBS⁻, solange bis die Lungen hell erscheinen. Dadurch soll das intravaskulär zirkulierende EB-haltige Blut im Lungenkreislauf entfernt werden, um eine möglichst geringe Verfälschung der Ergebnisse zu erhalten.

Nun wird das Herz-Lungen-Paket aus dem Thorax entnommen, die Lungen separiert und alle großen Atemwege vom Parenchym makroskopisch abpräpariert. Es erfolgt dann die Gewichtsermittlung der Lungen an der Präzisionswaage HR-120-EC und die Zwischenlagerung in Eppendorf Cups auf Eis.

Das Blut wird bei 13.000 U/min bei 4°C für zwölf Minuten zentrifugiert, das Plasma vorsichtig in ein neues Eppendorf-Cup pipettiert und bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

Die Lungenproben werden homogenisiert. 500 µl des Homogenisats werden zu 1.000 µl Formamid gegeben und 12 bis 18 Stunden bei 60°C inkubiert.

Nach der Inkubationszeit erfolgt die Zentrifugation der Lungenproben bei 5.000 U/min für 30 min bei RT.

Es folgt nun die Beschickung einer 96er-Mikroplatte mit Standardlösungen, Plasmen 1:5 verdünnt mit PBS⁻ und Überständen der zentrifugierten Lungenproben, jeweils als Triplet.

Die beschickte Mikroplatte wird in das Photometer verbracht. Es werden zwei Extinktionsmessungen, bei 620 nm und 740 nm, durchgeführt.

EB zeigt photometrisch bei $\lambda=620$ nm die höchste, bei $\lambda=740$ nm die niedrigste Absorption. Anschließend wird mit folgender Gleichung die Extinktion berechnet.

$$E_{620}(\text{EB}) = E_{620}(\text{Plasma+EB}) - [1,426 \cdot E_{740}(\text{Plasma}) + 0,03]$$

Die Gesamtextinktion einer Probe enthält die Extinktion des Plasmas und des EB. Aus diesem Grund muss die Plasmaextinktion von der Gesamtextinktion jeweils subtrahiert werden. Schlussendlich muss zu jeder Probe die Plasmaextinktion ermittelt werden, da sich ansonsten relevante Fehler für die Gesamtextinktion ergeben können. [188].

Funktionsweise der Photometrie

Der Photometrie liegt das Lambert-Beersche Gesetz zugrunde. Demnach spricht man dann von Extinktion bzw. optischer Dichte, wenn Strahlung beim Durchqueren eines Mediums abhängig von der Konzentration und der Schichtdicke abgeschwächt wird. Strahlungsabschwächend wirken Absorption, Streuung, Beugung und Reflexion. Bei chemischen Analysen sind Streuung und Beugung meist vernachlässigbar. Reflexionsverluste können über Leermessungen berücksichtigt werden.

Die Extinktion wird wie folgt berechnet:

$$E_{\lambda} = \log_{10}(I_0/I_1) = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

Hierbei beschreibt I_0 die Intensität des einfallenden Lichts, I_1 die Intensität des transmittierten Lichts. ϵ_{λ} ist der dekadische Extinktionskoeffizient, c die Konzentration und d die Schichtdicke. Die Extinktion ist proportional zur Konzentration.

Ein Photometer ermöglicht den qualitativen und quantitativen Nachweis als auch die Verlaufsdarstellung chemischer Prozesse von strahlungsabsorbierenden chemischen Verbindungen bei einer definierten Wellenlänge. Mit einem Spektralphotometer ist die Ausweitung des Grundprinzips möglich, d.h. es können bei sämtlichen Wellenlängen von

ultraviolett bis infrarot die Zusammensetzungen chemischer Verbindungen analysiert werden. Die Absorption von monochromatischem Licht in durchleuchteter farbstoffhaltiger Flüssigkeit hängt unter anderem von der Farbstoffkonzentration und der Länge des Lichtweges ab. Die Absorptionseigenschaften der durchleuchteten Flüssigkeit sind wellenlängenabhängig. Trägt man die bei verschiedenen bekannten Konzentrationen am Detektor gemessene Intensität über der Konzentration auf, so erhält man eine Standardgerade und die zugehörige Geradengleichung $f(x)=mx+b$. Anhand der Gleichung können dann unbekannte Konzentrationen ermittelt werden. Siehe Abbildung 13.

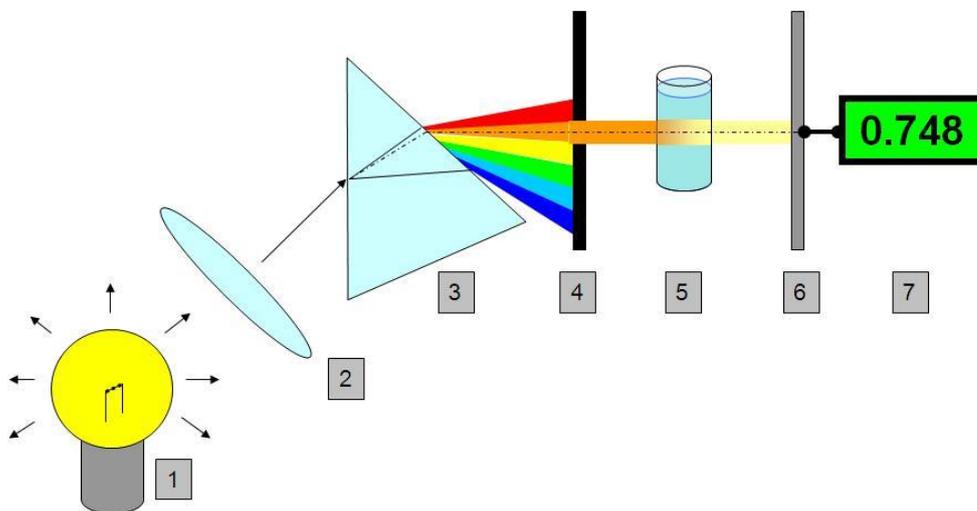


Abb. 13: Funktionsprinzip eines Photometers. 1: Halogenlampe; 2: Kollimatorlinse zur Herstellung eines parallelen Strahlenverlaufs; 3: Monochromator (Prisma oder Filter) zur Isolierung von Licht einer bestimmten Wellenlänge; 4: Aperturblende; 5: Probe; 6: Photodetektor; 7: Auswert-/Anzeigeeinheit. (modifiziert aus <http://chemwiki.ucdavis.edu> [10.12.2012])

3.2.8 Zellkultur und *in vitro*-Nachweis der Neutrophilenmigration

Für die Transmigrationsversuche mit humanen PMNs werden Epithel- und Endothelzellen kultiviert.

A-549 sind käufliche Epithelzellen, die aus einem humanen Adenokarzinom der Lunge stammen. Mit A-549-Zellen lassen sich *in vitro*-Modelle für Typ II Alveolarepithel realisieren.

Human Microvascular Endothelial Cells Lung (HMVEC-L) sind käuflich erhältliche Endothelzellen, die der menschlichen Lunge entstammen. Diese Zellen reagieren *in vitro* auf Zytokinstimulation und exprimieren Adhäsionsmoleküle.

Für die Kultivierung der Zellen im Brutschrank bei 37°C, 9% CO₂-Gehalt und 91% relativer Luftfeuchtigkeit werden folgende Medien verwendet, die dreimal pro Woche ausgetauscht werden müssen.

A-549-Zellen:	F-12 Ham´s	500	ml
	FCS Gold	50	ml
	1% Antibiotic-Antimycotic-Solution	5	ml
	I-Glutamin	2,5	ml

HMVEC-L:	EBM-2	500	ml
	FBS	25	ml
	rhFGF	2	ml
	rhEGF	0,5	ml
	VEGF	0,5	ml
	R ³ -IGF-1	0,5	ml
	Ascorbic Acid	0,5	ml
	GA-1000	0,5	ml
	Hydrocortison	0,2	ml

Zusätzlich werden die Zellkulturen zweimal pro Woche 1:3 passagiert.

Vor dem Einfrieren werden die Epithelzellen zunächst mit Accutase über 5-15 min, die Endothelzellen mit Trypsin/EDTA über 5-10 min abgelöst, in 20 ml Kulturmedium resuspendiert und bei 900 U/min bei 4°C für 15 min zentrifugiert. Anschließend werden die Zellen in 5 ml Einfriermedium resuspendiert und in vorgekühlte Kryoröhrchen aliquotiert. Zunächst werden die Proben bei -80°C eingefroren, danach erfolgt die Lagerung in flüssigem Stickstoff. Das Einfriermedium wird folgendermaßen zusammengestellt:

A-549-Zellen:	Medium wie oben aufgeführt	95	%
	DMSO	5	%

HMVEC-L	Medium wie oben aufgeführt	80	%
	FCS Gold	10	%
	DMSO	10	%

Das Auftauen der tiefgefrorenen Zellproben erfolgt im warmen Wasserbad bei 37°C. Die Zellsuspension wird sofort nach dem Auftauen in 15 ml Kulturmedium überführt und 8 min bei RT und 1.000 U/min zentrifugiert. Das Pellet wird in 15 ml vorgewärmtem Medium resuspendiert.

Vom resuspendierten Pellet werden nun jeweils 100 µl plus 1 ml Kulturmedium in die Inserts einer 24-Well-Platte überführt. Die Kultivierung erfolgt im Brutschrank unter den oben genannten Bedingungen für eine Woche.

Für die PMN-Isolation werden einem Freiwilligen ca. 30 ml venöses Blut in einer Citrat-Monovette entnommen. In einem Zentrifugenröhrchen werden 4 ml Percoll 72%, 4 ml Percoll 63% und abschließend 4 ml venöses Vollblut geschichtet. Es folgt eine 30-minütige Dichtegradientenzentrifugation bei RT und 1.700 U/min. Nach der Zentrifugation befinden sich unten im Röhrchen die Erythrozyten, darüber (zwischen den beiden Percoll-Phasen) die PMNs, und zwischen Percoll und Serum die Lympho- und Monozyten.

Mit einer Glaspipette werden die PMNs abgesaugt, in ein Falcongefäß überführt und durch Lyse die restlichen Erythrozyten degradiert. Die Lyse besteht aus folgenden Einzelsubstanzen:

NaHCO ₃	420	mg
NH ₄ Cl	4	g
EDTA	18,5	mg
A. dest.	500	ml

Der Lyse folgt ein weiterer Zentrifugationsvorgang bei 1.100 U/min und 4°C für 10 min. Anschließend werden die PMN-Pellets in 5 ml HBSS⁺ resuspendiert und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Die Zellzahl wird mit HBSS⁺ auf 10·10⁶ Zellen pro ml Zellsuspension eingestellt.

Beim nun folgenden Transmigrationsversuch können die Zellen isoliert oder kombiniert behandelt werden, um so die Auswirkungen auf die einzelne Zellart zu untersuchen:

Vorbehandlung der PMNs

Vorbehandlung der Epithel- bzw. Endothelzellen

Vorbehandlung der PMNs und der Epithel- bzw. Endothelzellen

Vor der Behandlung der Endothel- bzw. Epithelzellen wird das Medium aus den Wells abgesaugt und anschließend die Zellen mit CoPP in verschiedenen Konzentrationen bei 37°C für 30 min inkubiert.

In eine 24-Well-Platte werden jeweils 900 µl HBSS⁺ als Negativkontrolle oder MIP-2 (200 ng/ml) als Chemokin in die äußeren Wells pipettiert. Durch MIP-2 werden die PMNs zur Migration durch den Monolayer angeregt. Die Inserts werden entnommen und mit 37°C warmem HBSS⁺ gewaschen und jeweils 100 µl PMN-Suspension zugegeben. Es folgt bei 37°C eine einstündige Inkubation auf dem Thermoschüttler. Anschließend erfolgt die Zellvereinzellung mit je 50 µl Citrat und Triton X-100. Die Platte wird nun mit Parafilm verschlossen und die Zellen mittels Ultraschall lysiert. Es werden dann 50 µl Triplikate auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert.

Für die Erstellung einer Standardreihe werden 850 µl HBSS⁺, 50 µl PMN-Zellsuspension, 50 µl Citrat und 50 µl Triton X-100 zur ersten Standardprobe vermengt und mittels Ultraschall lysiert. Hieraus werden nun über eine Verdünnungsreihe insgesamt elf Standardproben hergestellt und als Duplikate auf eine 96 Well-Mikrotiterplatte pipettiert.

Zur Extinktionsmessung am Photometer werden unmittelbar vor der Messung in jedes Well 75 µl ABTS-Entwicklungsreagenz gegeben.

ABTS-Entwicklungsreagenz:	ABTS	28	mg
	Citrat	5	ml
	A. dest.	45	ml
	H ₂ O ₂	50	µl

3.2.9 *In-vivo*-Nachweis der Neutrophilenmigration

Durch den im Folgenden beschriebenen Versuch werden die migrierten PMNs den verschiedenen Lungenkompartimenten (intravaskulär, interstitiell und intraalveolär) zugeordnet.

Hierzu erfolgt eine durchflusszytometrische Untersuchung. PMNs können dabei folgendermaßen identifiziert werden: Typisches Verhalten im forward und side scatter, ihre Affinität zum CD45-Antikörper (CD45-Ak) und ihre Affinitäten zum 7/4-Ak und Gr1-Ak. Zur Isotypkontrolle werden Ak gegen IgG2a und IgG2b verwendet. CD45-Ak binden unselektiv an alle PMNs. Die Gesamtanzahl CD45⁺ Zellen entspricht der absoluten PMN-Zahl.

Es werden den Tieren 300 µl des mit Alexa Fluor 633 gefärbten Gr1-Ak in die Schwanzvene injiziert. Gr1-633-Ak-gekennzeichnete PMNs sind intravaskulär adhärenente PMNs in der Durchflusszytometrie.

Nach einer Inkubationszeit von drei Minuten wird 300 µl Narkoselösung wie oben beschrieben intraperitoneal appliziert.

Nach weiteren drei Minuten wird die Maus an den Extremitäten auf der Arbeitsfläche fixiert. Der Kopf des Tieres wird rekliniert fixiert. Thorax und Abdomen werden eröffnet und die V. cava inferior durchtrennt. Anschließend wird zum Ausspülen intravaskulär nicht-adhärenter PMNs der schlagende rechte Ventrikel mit 3 ml PBS⁻ perfundiert.

Die Trachea wird kanüliert und die bronchoalveoläre Lavage (BAL) mit insgesamt 7 x 1 ml PBS⁻ entnommen. Die BAL wird bei 300 g und 4°C zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet anschließend mit 1 ml Färbepuffer resuspendiert.

Der Färbepuffer wird vor dem Versuch aus folgenden Medien vorbereitet:

PBS ⁻	500	ml
BSA	5	g
Sodium Acide	2,5	ml

10 µl des resuspendierten Pellets werden zu 90 µl Türk'scher Lösung gegeben. Türk'sche Lösung lysiert vorhandene Erythrozyten. Die PMNs werden mittels

einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop bei 20-facher Vergrößerung gezählt. Anschließend erfolgt die Verdünnung oder Konzentrierung der Suspension auf eine Zellzahl von 200.000/100µl.

Das Herz-Lungenpaket wird mit einer atraumatischen Pinzette vorsichtig mobilisiert. Zur weiteren Präparation wird das Organpaket auf Zellstoff ausgelegt. Das Herz, die extraparenchymalen Luftwege und die Blutgefäße werden makroskopisch abpräpariert. In einer Petrischale werden beide Lungen grob zerkleinert und mittels Pasteurpipette in ein Falcon-Gefäß mit Enzym-Lösung überführt. Die Enzymlösung enthält ungefärbten Gr1-Ak, der extravasale PMNs markiert, welche nicht mit dem Gr1-633-Ak in Kontakt gekommen sind. Durch die Markierung mit ungefärbten oder gefärbten Gr1-Ak können die PMNs einem Kompartiment zum Zeitpunkt der Gr1-633-Injektion zugeordnet werden. Gr1-633- und 7/4-Ak-markierte PMNs waren zum Zeitpunkt der Injektion intravaskulär adherent (i.v. Kompartiment). Ausschließlich 7/4-Ak-markierte PMNs waren extravasal lokalisiert (interstitielles Kompartiment). Die Lungen werden in der Enzymlösung bei 37°C für 30 min zum Schutz des fotosensiblen Gr1-633-Ak abgedunkelt inkubiert.

Die Enzym-Lösung pro Maus besteht aus folgenden Medien:

PBS ⁻	500	ml
Gr1-Ak ungefärbt	100	µl
Collagenase XI	5	µl
Hyaluronidase	5	µl
DNAse	5	µl

Anschließend werden die Lungenteile mit einem Spritzenstempel durch ein 70 µm-Zellsieb gesiebt. Die Spülung des Siebs erfolgt zwischendurch bzw. abschließend mit insgesamt 20 ml PBS⁻. Dieses Gemisch wird bei 300 g und 4°C zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet wird mit 5 ml Lysepuffer resuspendiert und fünf Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert.

Der Lysepuffer wird aus folgenden Medien hergestellt:

NH ₄ Cl (1,5M)	10,03 g
NaHCO ₃ (0,1M)	1,05 g
Na ₂ -EDTA (0,01M)	465,00 mg
Aqua bidest.	125,00 ml

Abschließend wird der Lysepuffer mit Aqua bidest. 1:10 verdünnt.

Die Lyse wird mit 20 ml Färbepuffer gestoppt und die Lösung dann erneut bei 300 g und 4°C für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit 3 ml Färbepuffer resuspendiert und 10 µl dieser Lösung zu 90 µl Türk'scher Lösung in ein Eppendorf-Cup gegeben. Die Auszählung der PMNs erfolgt mittels einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop. Anschließend erfolgt die Verdünnung oder Konzentrierung der Suspension auf eine Zellzahl von 200.000/100µl.

Funktionsweise der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient der quantitativen Differenzierung von Zellen anhand ihrer Fluoreszenz- und Streulichtemissionen und stellt ein Routineverfahren in der Zellbiologie dar. Moderne Geräte ermöglichen die Echtzeit-Differenzierung von über 1.000 Zellen pro Sekunde. Ein Gerät zur Durchflusszytometrie besteht aus mehreren Komponenten (siehe Abbildung 14): Laserlichtquellen unterschiedlicher Wellenlänge, verschiedene Filter zur Differenzierung der Fluoreszenzsignale, Photomultiplier zur Detektion und Verstärkung eingehender Lichtsignale, eine Stahlkapillare zur Zellvereinzelung, eine Mikrokanalküvette zur Laserlichtbeaufschlagung des Zellstrahls und ein Rechnersystem.

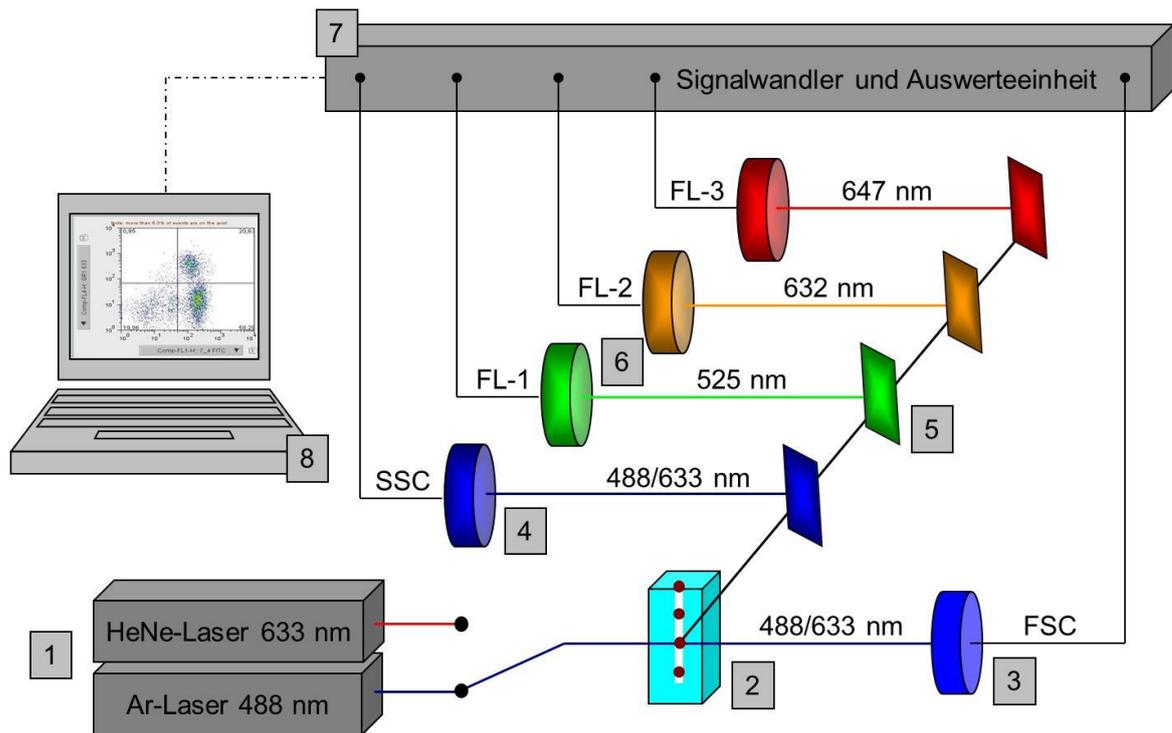


Abb. 14: Funktionsschema Durchflusszytometrie. 1: Laserlichtquellen; 2: Mikrokanalküvette; 3: FSC-Photomultiplier; 4: SSC-Photomultiplier; 5: teildurchlässige Umlenkspiegel spezifischer Wellenlängen; 6: Photomultiplier spezifischer Wellenlängen; 7: Signalwandler und Auswerteeinheit; 8: Rechner, Auswertesoftware und Visualisierung. Skizze modifiziert nach [189].

Zellen einer Zellsuspension werden durch die Stahlkapillare angesaugt und dadurch vereinzelt. Dieser Zellstrom wird in einer Messküvette durch einen Laserstrahl fokussiert, wobei jede Zelle einzeln analysiert wird. Die Oberflächenbeschaffenheit und die Größe einer Zelle führen zu individueller Streuung des Laserstrahls, welcher von Detektoren erfasst wird. Ebenso werden die Emissionen der Fluoreszenzfarbstoffe über Detektoren gemessen. Es wird ein Vorwärts- und ein Seitwärtsstreulicht unterschieden. Das Vorwärtsstreulicht (FSC/Forward Scatter) ist das Maß für die Lichtbeugung bei direkter Laserlichtbeaufschlagung einer Zelle; sie hängt hauptsächlich von der Größe einer Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht (SSC/Side Scatter) fällt geringer aus als das Vorwärtsstreulicht und ist das Maß für die Lichtbrechung orthogonal zum einfallenden Laserlichtstrahl. Es wird vor allem beeinflusst durch die Granularität, die Größe, die Beschaffenheit des Zellkerns und die Anzahl der intrazellulären Vesikel. Durch Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht

lassen sich Zellen gut differenzieren. Mittels rechnergestützter Datenaufbereitung lässt sich eine Zuordnung vieler unterschiedlicher Zelleigenschaften zu einzelnen Subtypen realisieren. Die Darstellung erfolgt in farbigen Standardpunktdiagrammen (dot plots, zwei Variablen) oder Histogrammen (eine Variable) [189].

Vor der Durchflusszytometrie werden die Zellen im Rahmen dieser Arbeit mittels Färbung markiert. Als Farbstoffe werden Fluorochrome verwendet, die Laserlicht einer charakteristischen Wellenlänge absorbieren und hierüber Elektronen in ein höheres Energieniveau befördern. In Folge dessen können Photonen emittiert werden, welche die eigentliche Fluoreszenz ausmachen. Jeder Farbstoff hat sein spezifisches Emissionsmaximum, das immer energieärmer und somit langwelliger als das anregende Laserlicht ist.

Die im vorliegenden Versuch verwendeten Fluorochrome FITC und PerCP werden von einem Argon-Laser bei 488 nm angeregt, Alexa 633 und APC hingegen von einem Helium-Neon-Laser mit einer Wellenlänge von 633 nm.

Die Wellenlängen der eingesetzten Fluorochrome sind wie folgt:

FITC	$\lambda_{\text{excitation,peak}} = 490 \text{ nm}$	$\lambda_{\text{emission,peak}} = 525 \text{ nm}$
PerCP	$\lambda_{\text{excitation,peak}} = 490 \text{ nm}$	$\lambda_{\text{emission,peak}} = 670 \text{ nm}$
Alexa 633	$\lambda_{\text{excitation,peak}} = 633 \text{ nm}$	$\lambda_{\text{emission,peak}} = 647 \text{ nm}$
APC	$\lambda_{\text{excitation,peak}} = 650 \text{ nm}$	$\lambda_{\text{emission,peak}} = 660 \text{ nm}$

Die Tabelle 2 zeigt den Färbeplan der Zellsuspensionen von BAL und Lunge. Die Proben 1 bis 5 stellen Einzelfärbungen zur Kompensation und zur Isotypkontrolle dar.

Probe	Antikörper	Färbung	Isotyp	Verdünnung
1	--	--	--	--
2	7/4	FITC	IgG _{2a}	1:5
3	CD45	PerCP	IgG _{2b}	1:10
4	Gr1	Alexa 633	IgG _{2b}	1:10
5	IgG _{2a} (Isotyp)	FITC	IgG _{2a}	1:25
	IgG _{2b} (Isotyp)	APC	IgG _{2b}	1:4
6	7/4	FITC	IgG _{2a}	1:5
	CD45	PerCP	IgG _{2b}	1:10
	Gr1 (nur BAL)	Alexa 633	IgG _{2b}	1:10

Tab. 2: Färbeplan

Für jede Zelle der Probe 6 werden insgesamt fünf Informationen ermittelt: FSC, SSC, sowie die Intensitäten der drei Fluoreszenzfarbstoffe FITC, PerCP und Alexa 633. Durch diese Informationen können PMNs erkannt und diese dem jeweiligen Kompartiment zugeordnet werden (siehe Abbildung 15):

Intravasale PMNs	7/4 FITC ⁺ , Gr1-633 ⁺
Interstitielle PMNs	7/4 FITC ⁺ , Gr1-633 ⁻
Intraalveoläre PMNs (PMNs in der BAL)	7/4 FITC ⁺ , Gr1-633 ⁺

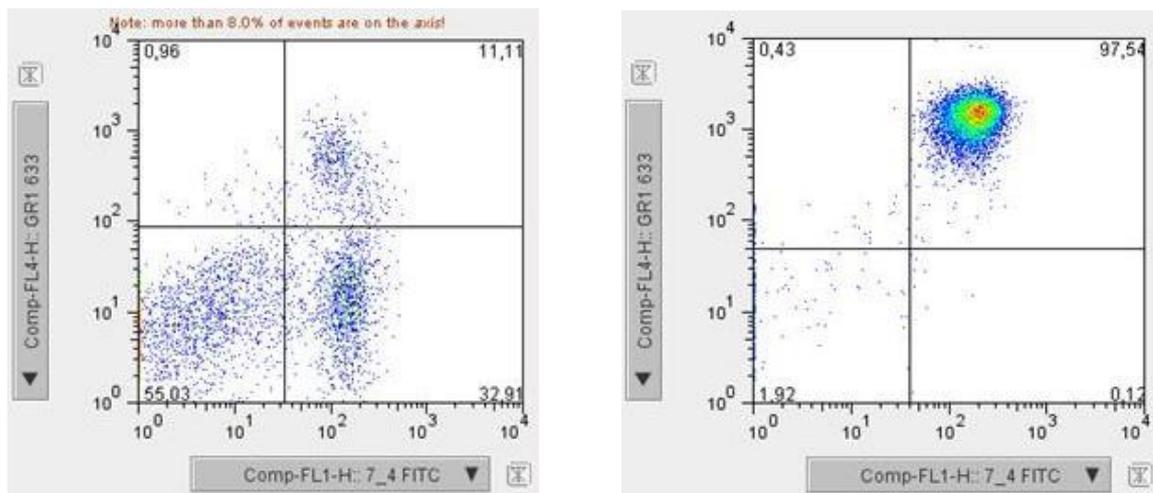


Abb. 15: Dot plot einer durchflusszytologischen Auswertung. Linkes Bild: Zellsuspension von Lungengewebe. PMN sind 7/4 positiv. Es erfolgt die Unterscheidung intravasal (Gr1-633 positiv, rechter oberer Quadrant) und interstitiell (Gr1-633 negativ, rechter unterer Quadrant). Rechtes Bild: Zellsuspension einer bronchoalveolären Lavage (BAL). Gr1-633 und 7/4 FITC positive PMNs (rechter oberer Quadrant).

3.2.10 Enzymaktivitäts- und Proteinbestimmung der HO-1

Zur Bestimmung der Enzymaktivität der HO-1 bezogen auf die Proteinmenge werden von Mäusen der verschiedenen Versuchsbedingungen nach den entsprechenden Inkubationszeiten 24 Stunden nach LPS- bzw. NaCl-Inhalation Lungen und Leber entnommen.

Die Organe werden gewogen, in Eppendorfcups überführt und es wird eiskalter HO-activity-buffer (4-fache Menge des zuvor ermittelten Organgewichtes) zugegeben. Danach werden die Organe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Die tiefgefrorenen Gewebeproben werden auf Eis aufgetaut und in leicht gefrorenem Zustand homogenisiert und anschließend für 10 s mit Ultraschallwellen behandelt. Nun werden die Proben in eine auf 4°C vorgekühlte Zentrifuge überführt und bei 18.000 g für 15 min zentrifugiert. Es folgt die Überführung des Überstandes in ein großes Eppendorf-Cup und die Homogenisierung mit einem Vortexer.

Für die Aktivitäts- und Proteinbestimmung werden aus dem Überstand Aliquots von jeweils 100 µl angesetzt, welche bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert werden können.

Für die Herstellung des Leberzytosols (Quelle für das Biliverdin) werden Tiere ohne Vorbehandlung nach 6-stündiger Nahrungskarenz verwendet. Es werden von den Tieren jeweils die Leber für das Zytosol und die Milz als Positivkontrolle entnommen. Nach der Homogenisierung der Leber mit HO-activity-buffer wird das Homogenisat in die Ultrazentrifuge überführt und bei 105.000 g und 4°C für 27 min zentrifugiert. Anschließend werden die Überstände in einem Falcon-Gefäß gepoolt. Bis zur Aktivitätsmessung wird das Leberzytosol bei -80°C gelagert. Die Milzen werden ebenso verarbeitet, gepoolt und gelagert.

Zur Bestimmung der HO-Aktivität werden die Proben aus Lungen-, Leber- und Milzüberstand auf Eis aufgetaut. Währenddessen werden 500 µl einer Reaktionslösung in einem Eppendorfcup vorbereitet, welche aus folgenden Substanzen besteht:

HO-activity buffer	131 µl
Leberzytosol	100 µl
Glucose-6-Phosphat 20 mM	50 µl
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase 0,2 U/µl	4 µl
NADPH 80 mM	5 µl
Hämin 1 mM	10 µl

Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und NADPH sind für den Ablauf der enzymatischen Reaktion notwendig und werden unmittelbar vor dem Test hinzugegeben. Hämin dient als Startsubstrat der enzymatischen Reaktion und wird als letztes in einem verdunkelten Raum zugefügt. NADPH darf bei der Negativkontrolle nicht zugegeben werden, um die Hintergrundaktivität der HO zu ermitteln. Abbildung 16 zeigt den Reaktionsablauf.

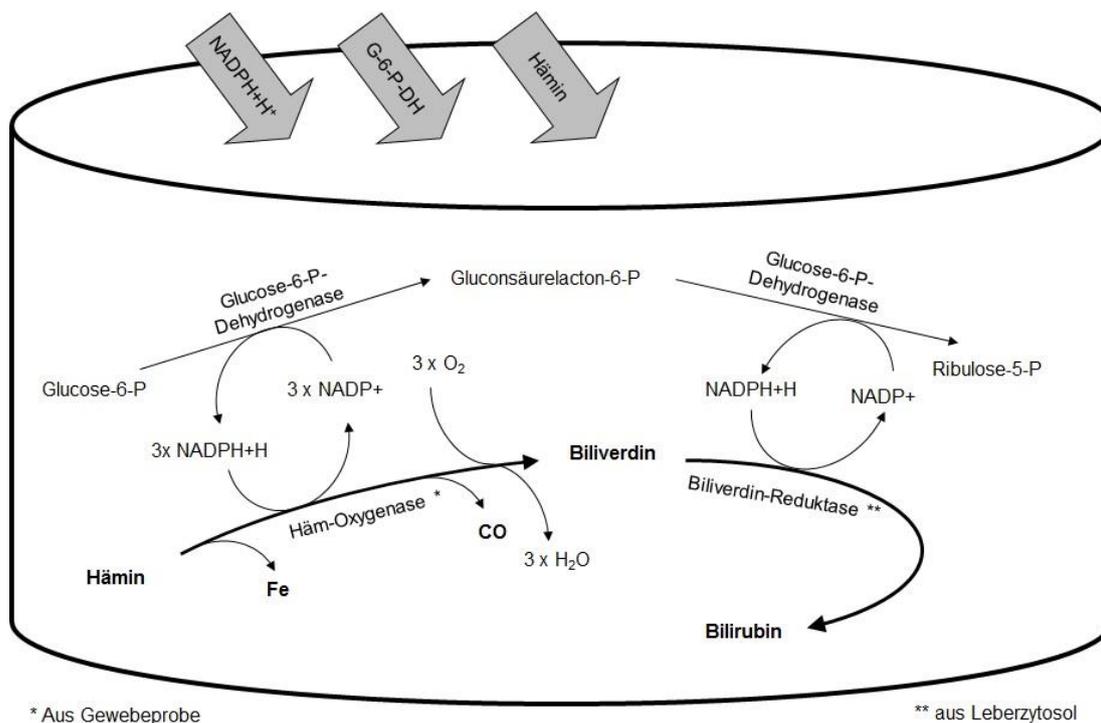


Abb. 16: Ablaufschema der enzymatischen Reaktion der Hämoxygenase und der Biliverdinreduktase (modifiziert aus [190]). Das entstehende Bilirubin lässt sich photometrisch nachweisen. NADPH+H⁺ wird bei der Negativkontrolle nicht zugegeben. Hämin wird zuletzt im Dunkeln dazu pipettiert.

Alle Proben werden nun bei 37°C im Dunkeln für eine Stunde inkubiert. Im Anschluss daran wird den Proben je 500 µl Chloroform zur Beendigung der Reaktion zugegeben. Zudem trennt Chloroform das Bilirubin vom restlichen Gemisch. Die Probengefäße werden für eine Stunde im Dunkeln geschüttelt und anschließend zur Phasentrennung bei 15.000 g und 4°C für 5 min zentrifugiert.

Die obere, rötliche Phase wird abgesaugt und verworfen. Die verbleibende untere Phase enthält das gelöste Bilirubin und das Chloroform; beides wird in eine Photometer-Küvette überführt.

Es werden anschließend die Extinktionen bei 464 nm und 530 nm ermittelt.

Die Bilirubin-Konzentration errechnet sich wie folgt:

$$c = \frac{464nm - 530nm \cdot mM \cdot cm}{1cm \cdot 40} = [pmol/(h \cdot mg)]$$

Von allen ermittelten Konzentrationswerten muss jeweils der Wert der Negativkontrolle ohne NADPH-Zusatz abgezogen werden.

Da die Enzymaktivität auf die Proteinmenge bezogen werden soll, muss die Proteinmenge ermittelt werden. Eine heute zunehmend angewandte Methode stellt der relativ einfach durchzuführende Bicinchonin-Assay nach Smith [191] (BCA-Methode nach Smith) dar. Diese gehört neben der Methode nach Lowry zu den kolorimetrischen Methoden und beruht auf der Fähigkeit einiger Aminosäuren und Peptidbindungen zweiwertiges Kupfer (Cu^{2+}) in einwertiges Kupfer (Cu^+) zu reduzieren. Das Cu^+ bildet mit Bicinchoninsäure (BCA) einen Farbkomplex mit einem Absorptionsmaximum von 562 nm [192]. Auch bei der Proteinbestimmung muss zunächst eine Standardgerade aus bekannten Proteinkonzentrationen bestimmt werden.

3.2.11 Zytokinbestimmung in der bronchoalveolären Lavage

Zum Nachweis der proinflammatorischen Zytokine $\text{TNF}\alpha$, IL-6, CXCL2/3 (MIP-2) und CXCL1 (KC) in der BAL wird ein ELISA verwendet. Hierbei kommt eine Sandwich-ELISA-Technik zum Einsatz. Der Capture Antibody (Primärantikörper) ist an die feste Phase in den Wells einer Mikrotiterplatte gebunden. Darauf wird die Suspension mit dem Antigen gegeben. Primärantikörper und Antigen gehen eine Bindung ein. Nach einer Inkubationszeit wird die Suspension aus den Wells der Mikrotiterplatte gewaschen und der Sekundärantikörper aufgebracht. Beide Antikörper binden an unterschiedliche Epitope des gleichen Antigens. Der Sekundärantikörper ist mit dem Enzym Meerrettichperoxydase (HRP) markiert. Durch Zugabe des Reaktionspartners Wasserstoffperoxid kommt es zu einem Farbumschlag, welcher nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz am Photometer detektiert wird. Über Verdünnungsreihen wird eine Standardgerade erstellt, anhand derer eine quantitative Bestimmung der Zytokine in den BAL-Proben ermöglicht wird. Drei Stunden nach LPS-Inhalation werden den Tieren exakt 2 ml BAL entnommen. Die Zytokin-Bestimmung erfolgt mittels käuflicher ELISA-Kits (DuoSets ELISA $\text{TNF}\alpha$, IL-6, MIP-2 und KC, Fa. R&D Systems, Wiesbaden).

3.2.12 Statistik

Statistische Analysen werden mit GraphPad Prism, Version 5.3 (Fa. GraphPad Software) durchgeführt. Statistische Analysen zwischen Kontrollgruppe und jeweiliger Versuchsgruppe erfolgen per one-way ANOVA und Bonferroni post hoc test. Signifikanz liegt vor, wenn $P < 0,05$. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt.

4. Ergebnisse

4.1 Histologische Untersuchung von Lungenparenchym

Die histologische Untersuchung von Gewebeschnitten durch Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung ermöglicht die Quantifizierung morphologisch-pathologischer Veränderungen am Parenchym.

Vorbehandlung mit CoPP

Das Parenchym CoPP-behandelter Tiere zeigt nach LPS-Inhalation weniger prominente Alveolarsepten als bei Tieren der Kontrollgruppe nach LPS-Inhalation. Die grundlegende Gewebemorphologie ist bei den Versuchsgruppen und bei der Kontrollgruppe erhalten. Siehe Abbildung 17.

Vorbehandlung mit CoPP+SnPP

Nach LPS-Inhalation kommt es zu einer Zellvermehrung und ödematös verbreiterten Alveolarsepten. Allerdings lassen sich zwischen der CoPP+SnPP-Gruppe und der Kontrollgruppe keine wesentlichen Unterschiede erkennen. Die gewebetypische Morphologie ist weitgehend erhalten. Siehe Abbildung 18.

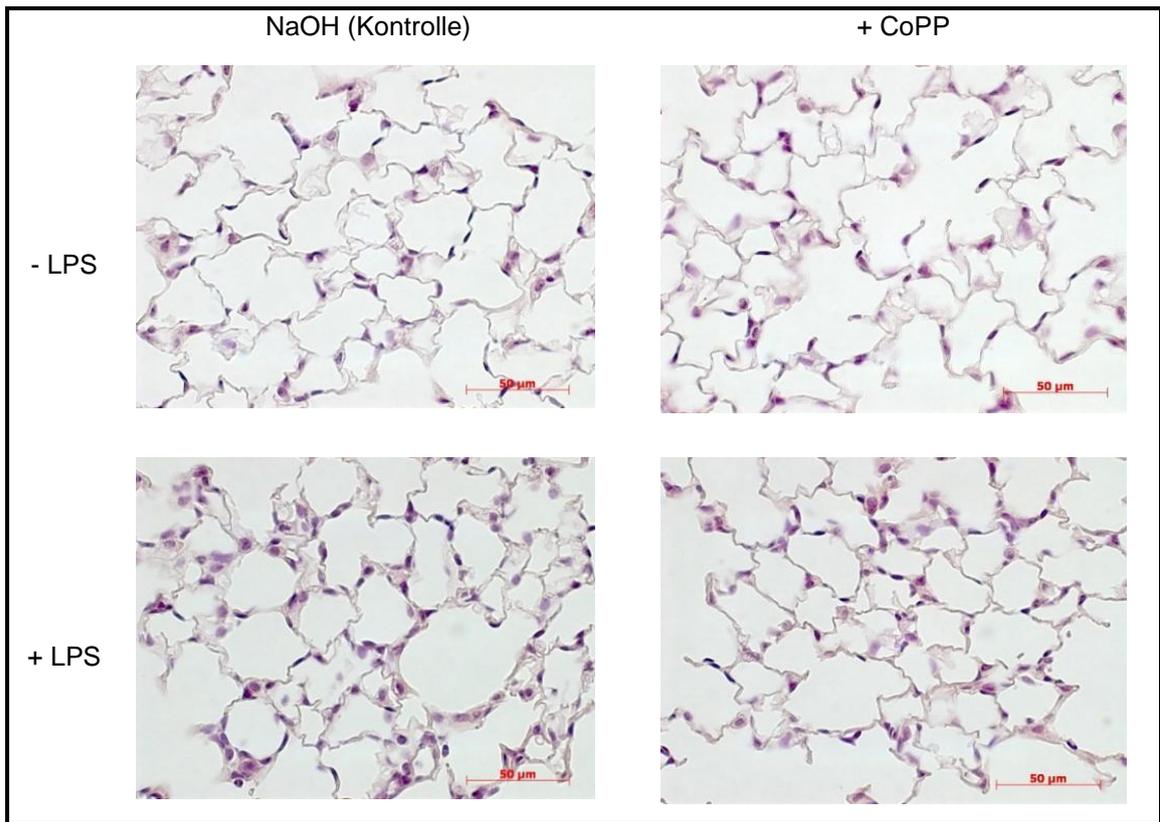
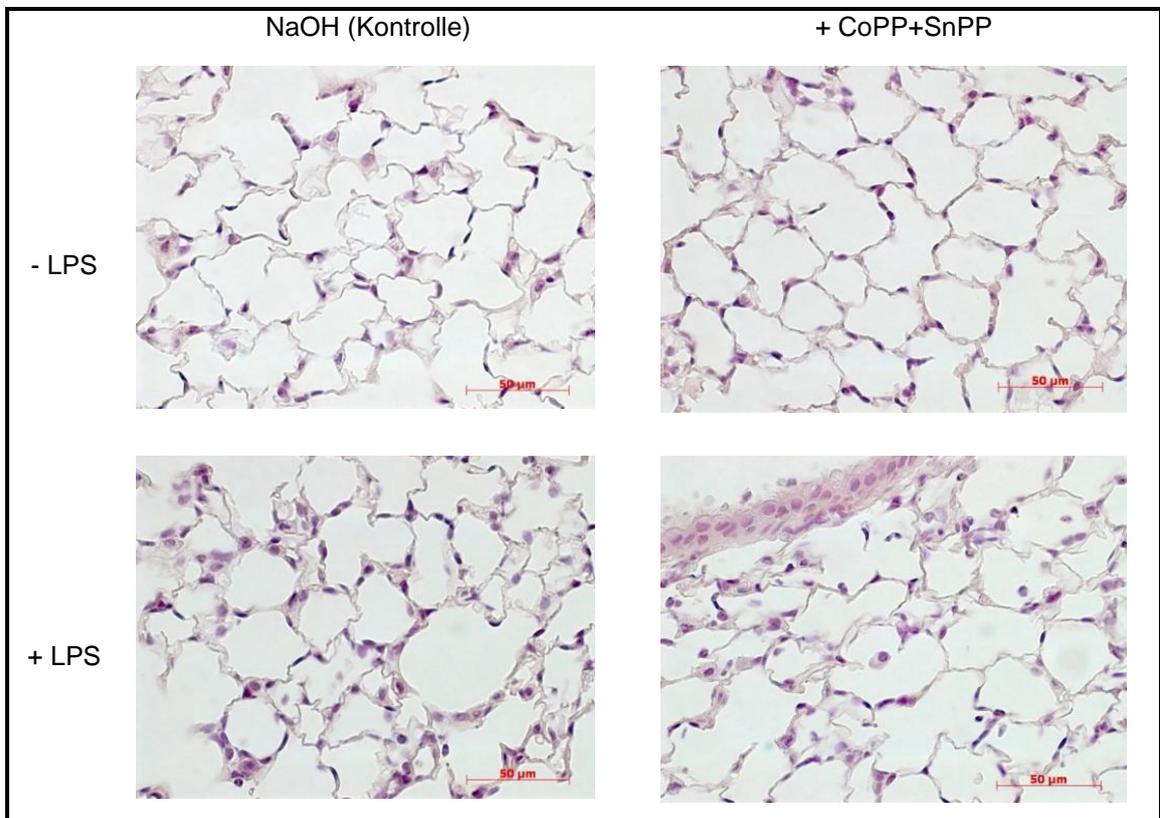


Abb. 17 u. 18: Lichtmikroskopie Lungenparenchym (HE-Färbung, 64-fach, Ölimmersion)



Vorbehandlung mit SnPP

Es zeigen sich beim Vergleich von Kontroll- und Versuchsgruppe ohne LPS keine Unterschiede. Nach LPS-Applikation zeigen SnPP-behandelte Tiere prominentere Alveolaresepten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ebenso scheint die Gewebemorphologie vermehrt in Mitleidenschaft gezogen. Zahlreiche alveoläre Kompartimente sind durch Destruktion der Alveolarwände miteinander verschmolzen. Siehe Abbildung 19.

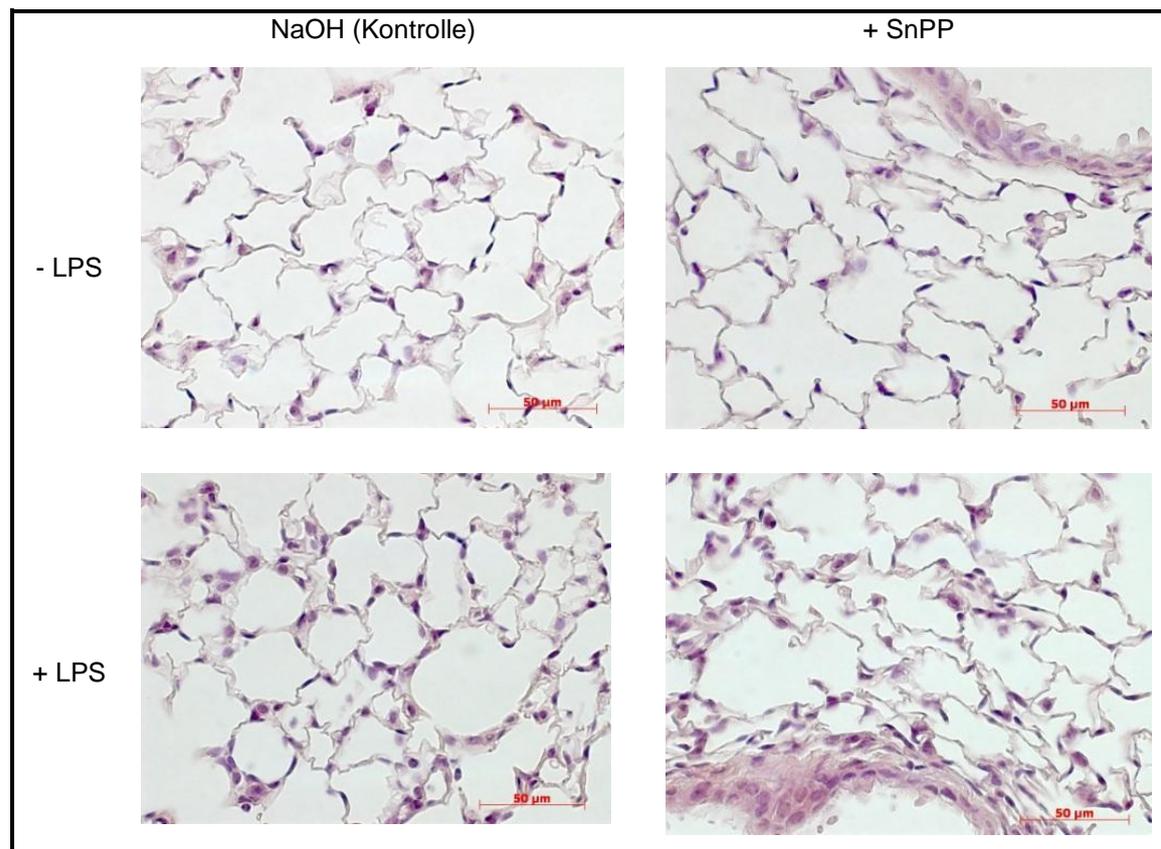


Abb. 19: Lichtmikroskopie Lungenparenchym (HE-Färbung, 64-fach, Ölimmersion)

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Lungen mit LPS behandelte Tiere eine Erhöhung der Zelldichte, septale Verdickungen durch Septumödem und teilweise Destruktionen der Gewebemorphologie aufweisen.

Zur Sichtbarmachung der neutrophilen Granulozyten im Parenchym erfolgen spezifische immunhistologische Untersuchungen.

4.2 Immunhistologische Untersuchung von Lungenparenchym

Die semiquantitative Darstellung der Neutrophilenmigration ins Lungenparenchym erfolgt durch immunhistologische Färbung, bei der Neutrophile braun gefärbt und lichtmikroskopisch sichtbar gemacht werden.

Vorbehandlung mit CoPP

Sowohl bei der Kontroll- als auch bei der Versuchsgruppe ohne LPS-Inhalation sind nur vereinzelt gewebeständige neutrophile Granulozyten erkennbar. Nach LPS-Inhalation steigt der Neutrophileninflux vor allem in der Kontrollgruppe stark an. Siehe Abbildung 20.

Vorbehandlung mit CoPP+SnPP

Ohne LPS-Inhalation zeigen sich sowohl in der Kontroll- als auch in der Versuchsgruppe keine morphologischen Unterschiede. 24 Stunden post infectionem (p.i.) zeigt sich im Parenchym der vorbehandelten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren eine verstärkte Neutrophilenakkumulation. Die Lokalisation der neutrophilen Granulozyten ist hauptsächlich gewebeständig im Bereich der interseptalen Verbindungen. Einzelne Neutrophile finden sich jedoch auch im alveolären Lumen. Siehe Abbildung 21.

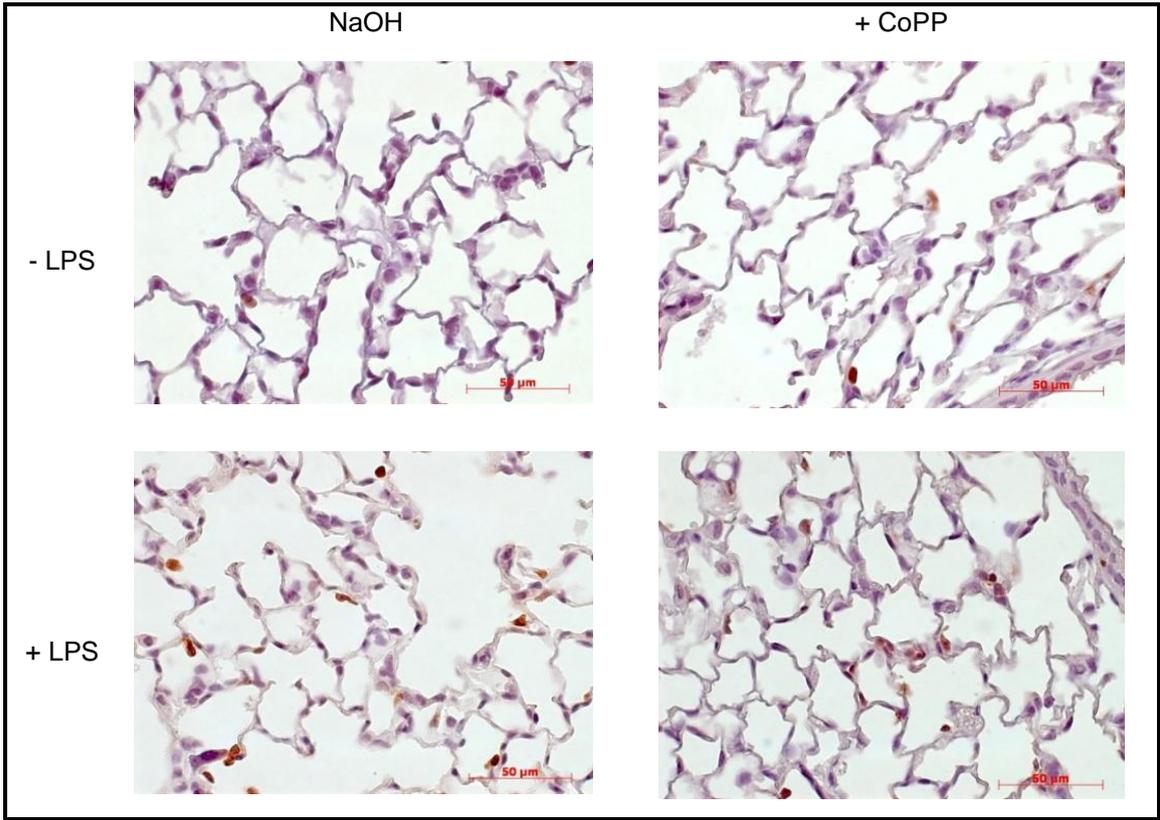
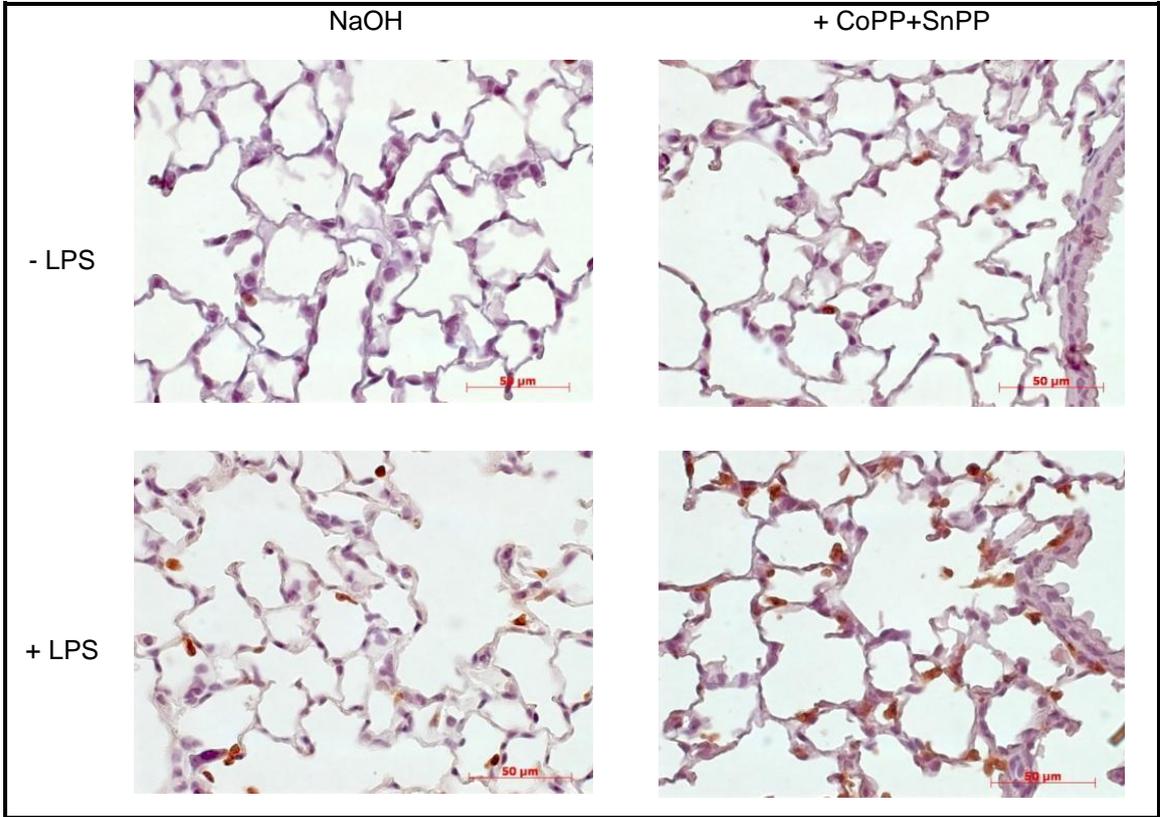


Abb. 20 u. 21: Lichtmikroskopie Lungenparenchym (Immunhisto, 64-fach, Ölimmersion)



Vorbehandlung mit SnPP

In der vorbehandelten Lunge ohne LPS zeigen sich vereinzelt Neutrophile, vergleichbar mit der Kontrolllunge. Nach LPS-Inhalation zeigt sich in der vorbehandelten Lunge eine stärkere Neutrophilenakkumulation, verglichen mit der Lunge des Kontrolltieres. Die Neutrophilen befinden sich dabei hauptsächlich gewebeständig, teilweise jedoch auch luminal. Siehe Abbildung 22.

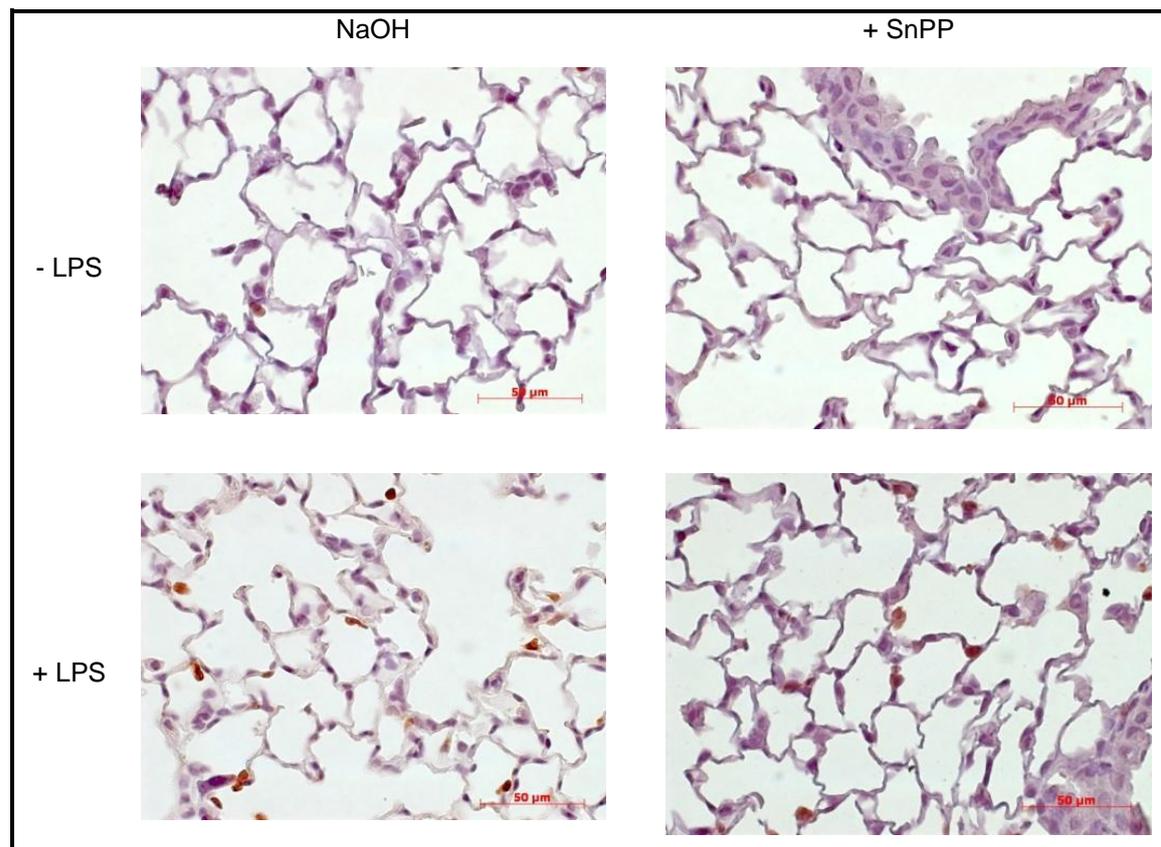


Abb. 22: Lichtmikroskopie Lungenparenchym (Immunhisto, 64-fach, Ölimmersion)

Zusammenfassend zeigen sich in den immunhistologischen Gewebeschnitten bei allen LPS-behandelten Tieren deutliche Neutrophilenakkumulationen im Lungenparenchym. Nach Vorbehandlung mit CoPP fällt diese Akkumulation jedoch deutlich geringer aus als bei Vorbehandlung mit CoPP+SnPP bzw. SnPP. Bei allen LPS-behandelten Tieren sind neben den gewebeständigen neutrophilen Granulozyten diese auch luminal nachweisbar.

4.3 Differenzialblutbilder

Von den jeweiligen Versuchsbedingungen werden zu verschiedenen Zeitpunkten Differenzialblutbilder angefertigt. Ziel ist, systemische Auswirkungen auf das zelluläre Immunsystem der Versuchstiere zu erfassen.

Kontrollgruppe

Die Kontrolltiere, welche mit verdünntem NaOH vorbehandelt wurden, zeigen im Blutbild nach der Injektion bis zur LPS-Inhalation keine Immunreaktion. Zwei Stunden p.i. steigt die Anzahl der segmentkernigen Neutrophilen (PMN) auf 8,8 Mio/ml an, die stabkernigen Neutrophilen (BN) auf 3,2 Mio/ml. Siehe Abbildung 23.

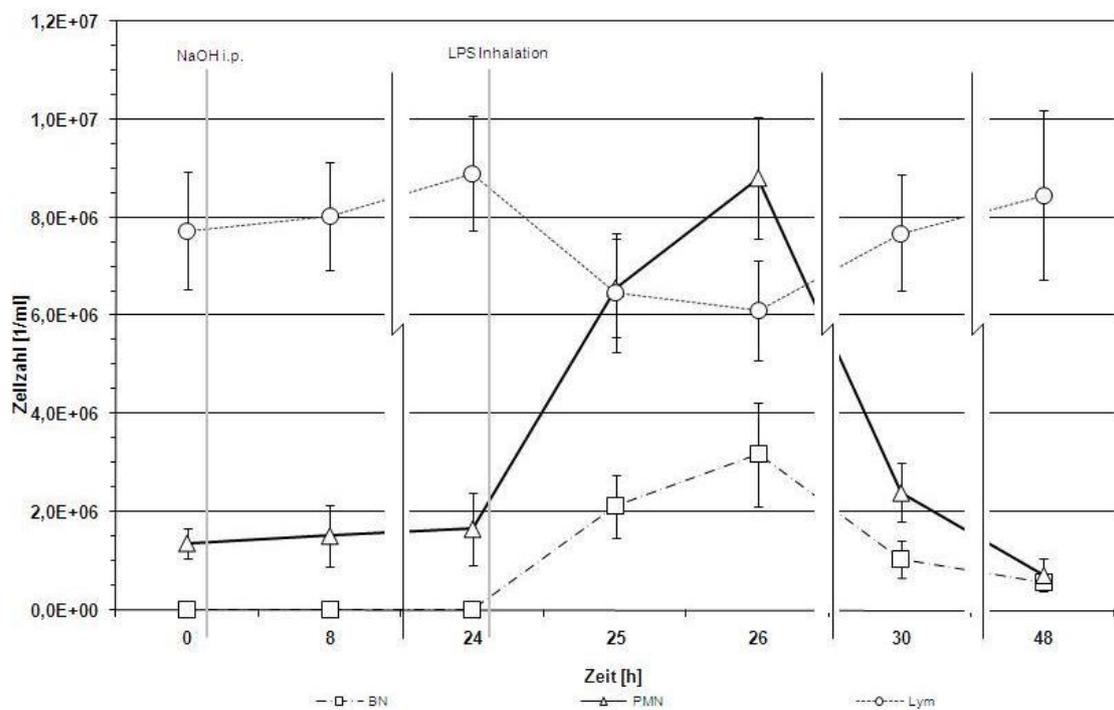


Abb. 23: Differenzialblutbilder der Kontrolltiere im zeitlichen Verlauf. n = 4. BN: Stabkernige neutrophile Granulozyten. PMN: Segmentkernige neutrophile Granulozyten. Lym: Lymphozyten.

Vorbehandlung mit CoPP

Nach LPS-Inhalation zeigen die mit CoPP vorbehandelten Versuchstiere im zeitlichen Verlauf von zwei Stunden p.i. keine Änderung der PMN-Zahl, jedoch einen Anstieg der BNs auf 2,2 Mio/ml. Zwischen der 30. und 48. Stunde zeigen die Versuchstiere einen Abfall der Neutrophilen bis hin zu einer Neutropenie. BNs im peripheren Blut steigen nur in moderatem Maß an, deuten jedoch eine leichte Linksverschiebung an. Siehe Abbildung 24.

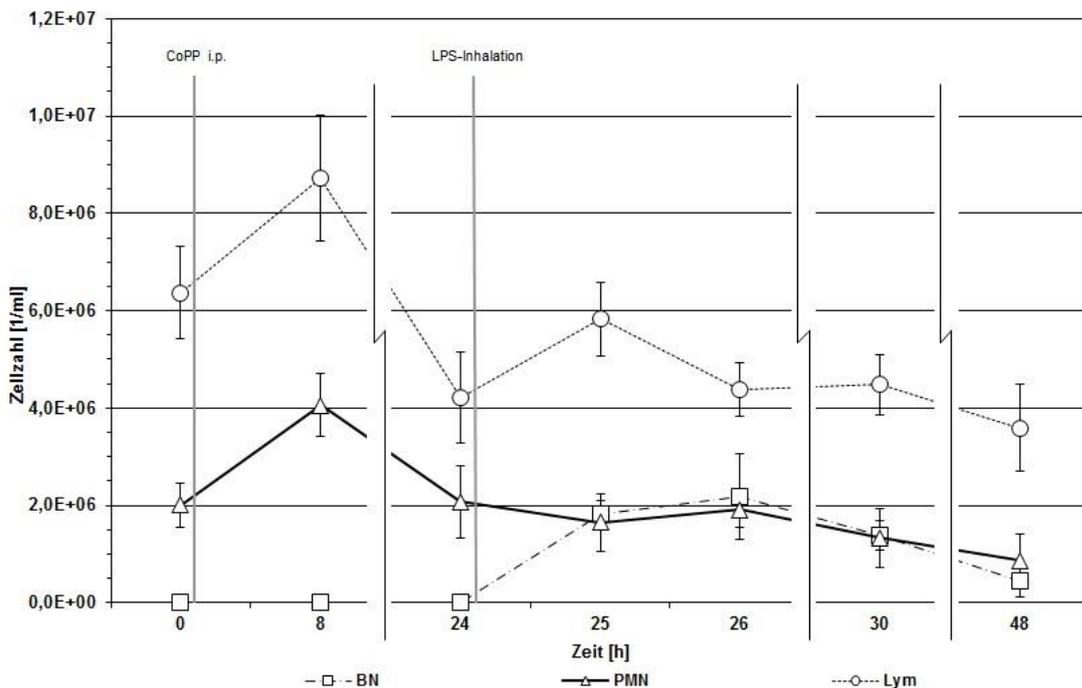


Abb. 24: Differenzialblutbilder der CoPP-behandelten Tiere im zeitlichen Verlauf. n = 4. BN: Stabkernige neutrophile Granulozyten. PMN: Segmentkernige neutrophile Granulozyten. Lym: Lymphozyten.

Vorbehandlung mit CoPP+SnPP

Bereits eine Stunde p.i. steigt die PMN-Zahl stark an und erreicht zwei Stunden p.i. einen Wert von 9,5 Mio/ml. Sechs Stunden p.i. haben sich die Zellzahlen etwa auf den Ausgangswert angeglichen. 24 Stunden p.i. liegen die Zellzahlen etwas unterhalb der Werte zum Zeitpunkt t=0. In dieser Gruppe zeigt sich eine deutliche Linksverschiebung. Siehe Abbildung 25.

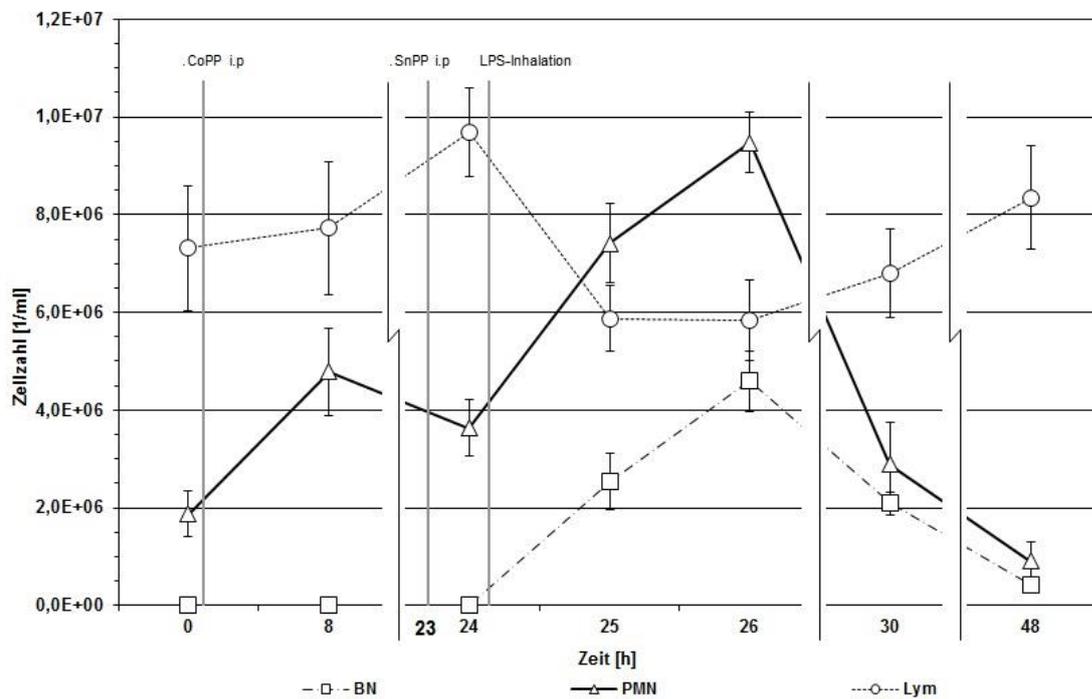


Abb. 25: Differenzialblutbilder der CoPP+SnPP-behandelten Tiere im zeitlichen Verlauf. n = 4. BN: Stabkernige neutrophile Granulozyten. PMN: Segmentkernige neutrophile Granulozyten. Lym: Lymphozyten.

Vorbehandlung mit SnPP

Erhalten die Tiere eine Vorbehandlung mit SnPP, so zeigt sich vor der LPS-Inhalation bereits ein starker PMN-Anstieg. Eine Stunde p.i. steigt die PMN-Anzahl weiter auf den Maximalwert von 10,1 Mio/ml an. Zwei Stunden p.i. erfolgt ein leichter Rückgang der PMNs. Es kommt auch bei den Tieren dieser Gruppe im Verlauf zu einer deutlichen Linksverschiebung mit 4,6 Mio/ml BNs. Siehe Abbildung 26.

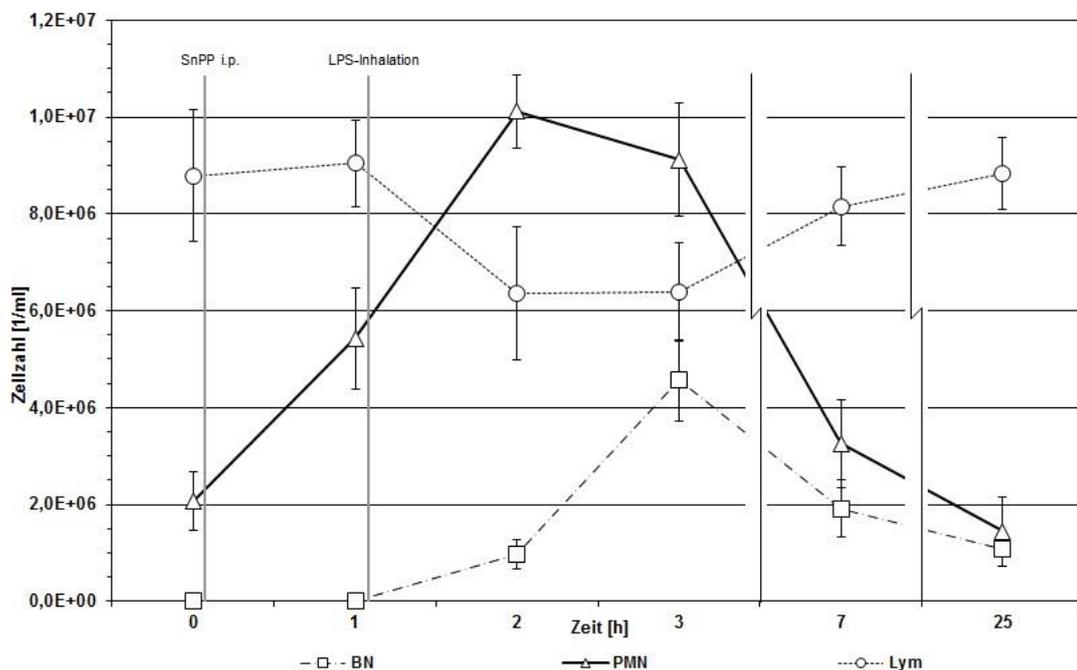


Abb. 26: Differenzialblutbilder der SnPP-behandelten Tiere im zeitlichen Verlauf. n = 4. BN: Stabkernige neutrophile Granulozyten. PMN: Segmentkernige neutrophile Granulozyten. Lym: Lymphozyten.

Vergleich der Differenzialblutbilder

Ein Vergleich der PMNs im Differenzialblutbild der oben beschriebenen Gruppen (siehe Abbildung 27) zeigt zum Zeitpunkt t = 1h signifikant verringerte PMN-Zahlen im peripheren Blut der CoPP-behandelten Tiere im Vergleich zu Tieren mit CoPP+SnPP- bzw. SnPP-Vorbehandlung (CoPP mit LPS: $2,08 \cdot 10^6 \pm 7,37 \cdot 10^5$ vs. CoPP+SnPP mit LPS: $3,64 \cdot 10^6 \pm 5,84 \cdot 10^5$; SnPP mit LPS $5,43 \cdot 10^6 \pm 10,51 \cdot 10^5$ /ml kapilläres Mischblut; P < 0,05). Zudem liegen die PMN-Zahlen der CoPP-Gruppe zu den Zeitpunkten t = 2h (CoPP mit LPS: $1,65 \cdot 10^6 \pm 5,96 \cdot 10^5$ vs. Kontrolle mit LPS: $6,56 \cdot 10^6 \pm 10,05 \cdot 10^5$; CoPP+SnPP mit LPS:

$7,42 \cdot 10^6 \pm 8,00 \cdot 10^5$; SnPP mit LPS $10,12 \cdot 10^6 \pm 7,53 \cdot 10^5$ /ml kapilläres Mischblut; $P < 0,05$) und $t = 3h$ (CoPP mit LPS: $1,92 \cdot 10^6 \pm 3,65 \cdot 10^5$ vs. Kontrolle mit LPS: $8,81 \cdot 10^6 \pm 12,33 \cdot 10^5$;CoPP+SnPP mit LPS: $9,47 \cdot 10^6 \pm 6,15 \cdot 10^5$; SnPP mit LPS $9,12 \cdot 10^6 \pm 11,68 \cdot 10^5$ /ml kapilläres Mischblut; $P < 0,05$) signifikant niedriger als bei den anderen Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe. Siehe Abbildung 27.

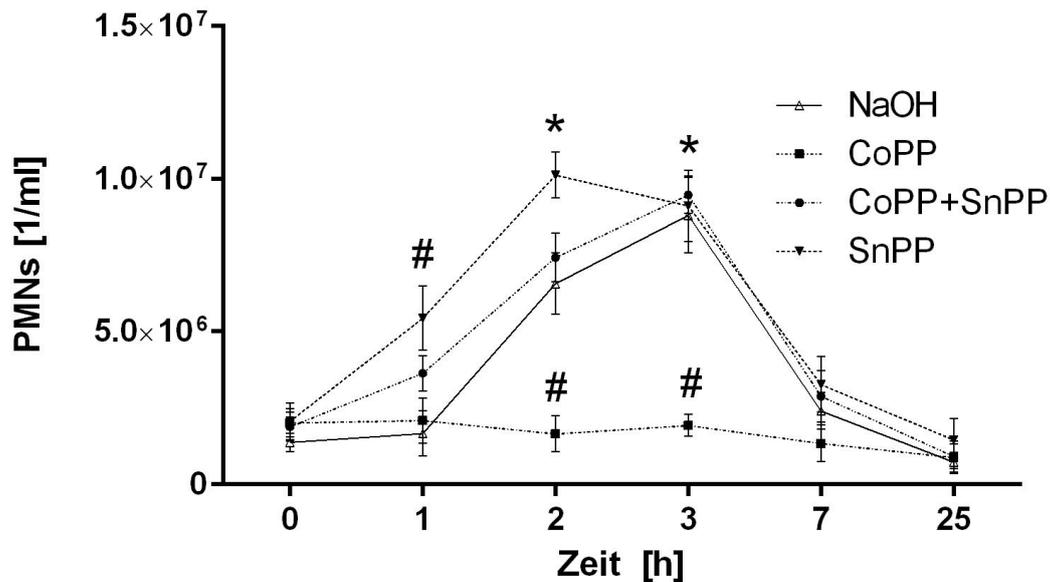


Abb. 27: Vergleich der PMNs im Differenzialblutbild. LPS-Applikation zum Zeitpunkt $t = 1h$. (jeweils $n = 4$, # $P < 0,05$ signifikante Veränderung zur Kontrollgruppe; * $P < 0,05$ signifikante Veränderung zur Kontrollgruppe zum Zeitpunkt $t = 1h$). Abbildung modifiziert nach [193].

Bei der Betrachtung der BN-Zahlen (siehe Abbildung 28) ist bei CoPP-vorbehandelten Tieren eine niedrigere Anzahl stabkerniger Neutrophiler bei $t = 3h$ im Vergleich zur CoPP+SnPP- bzw. SnPP-Gruppe erkennbar (CoPP mit LPS: $2,18 \cdot 10^6 \pm 8,85 \cdot 10^5$ vs. CoPP+SnPP mit LPS: $4,60 \cdot 10^6 \pm 6,15 \cdot 10^5$; SnPP mit LPS: $4,56 \cdot 10^6 \pm 8,27 \cdot 10^5$ /ml kapilläres Mischblut; $P < 0,05$). Dies kann als Hinweis auf eine geringere Linksverschiebung bei CoPP-behandelten Mäusen gedeutet werden.

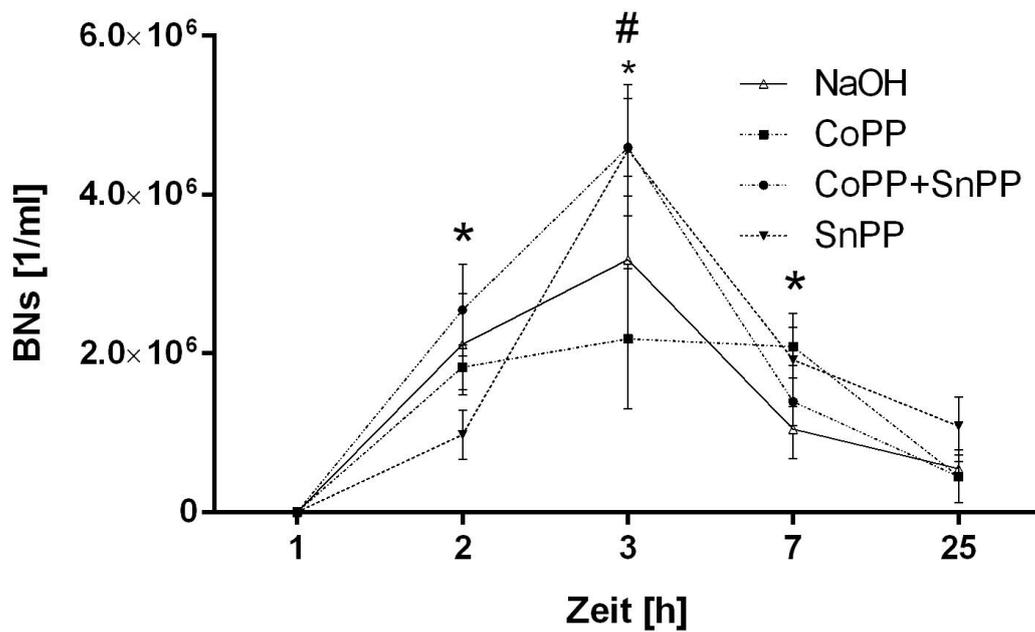


Abb. 28: Vergleich der BNs im Differenzialblutbild. LPS-Applikation zum Zeitpunkt t = 1h. (jeweils n = 4, # P < 0,05 signifikante Veränderung zur Kontrollgruppe; * P < 0,05 signifikante Veränderung zur Kontrollgruppe zum Zeitpunkt t = 1h). Abbildung modifiziert nach [193].

4.4 Pulmonale Gefäßpermeabilität

HO-1-Induktion und -Inhibition ohne inflammatorische Stimuli haben keinen Einfluss auf die mikrovaskuläre Permeabilität (siehe Abbildung 29 A). Nach LPS-Applikation kommt es im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne LPS zu einer signifikanten Zunahme der Gefäßpermeabilität in allen Versuchsgruppen (Kontrolle ohne LPS: $47,0 \pm 13,9$ vs. Kontrolle mit LPS: $137,0 \pm 18,2$; CoPP mit LPS $74,0 \pm 20,6$; SnPP mit LPS: $243,2 \pm 59,1$; CoPP+SnPP mit LPS: $186,2 \pm 16,7$ $\mu\text{g/g}$ Lunge; $P < 0,05$). CoPP-Behandlung führt damit zu einer signifikant verringerten Permeabilität im Vergleich zur Kontrollgruppe mit LPS. Siehe Abbildung 29 B.

Wird das HO-1-Enzym durch die Monobehandlung mit SnPP bzw. die Kombinationsbehandlung mit CoPP+SnPP inhibiert, so nimmt die Gefäßpermeabilität im Vergleich zur Kontrollgruppe mit LPS signifikant zu. Siehe Abbildung 29 B.

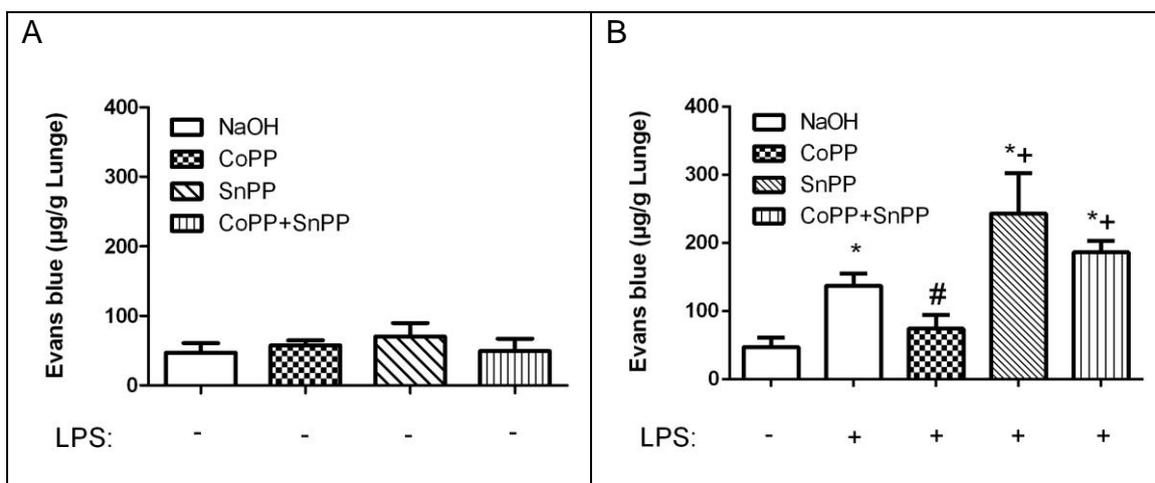


Abb. 29: Evans blue Gehalt in den Lungen. A: Tiere ohne LPS-Inhalation. B: Tiere mit LPS-Applikation (jeweils $n = 8$, * $P < 0,05$ signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne LPS, # $P < 0,05$ signifikante Verringerung im Vergleich zur Kontrollgruppe mit LPS, + $P < 0,05$ signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe mit LPS)

Die folgende Abbildung 30 zeigt die makroskopischen Auswirkungen der erhöhten Gefäßpermeabilität durch vermehrte kapilläre Durchlässigkeit von Evans blue an einem Herz-Lungen-Organpaket nach LPS-Inhalation verglichen mit einem nicht-inflammatorisch veränderten Organpaket.

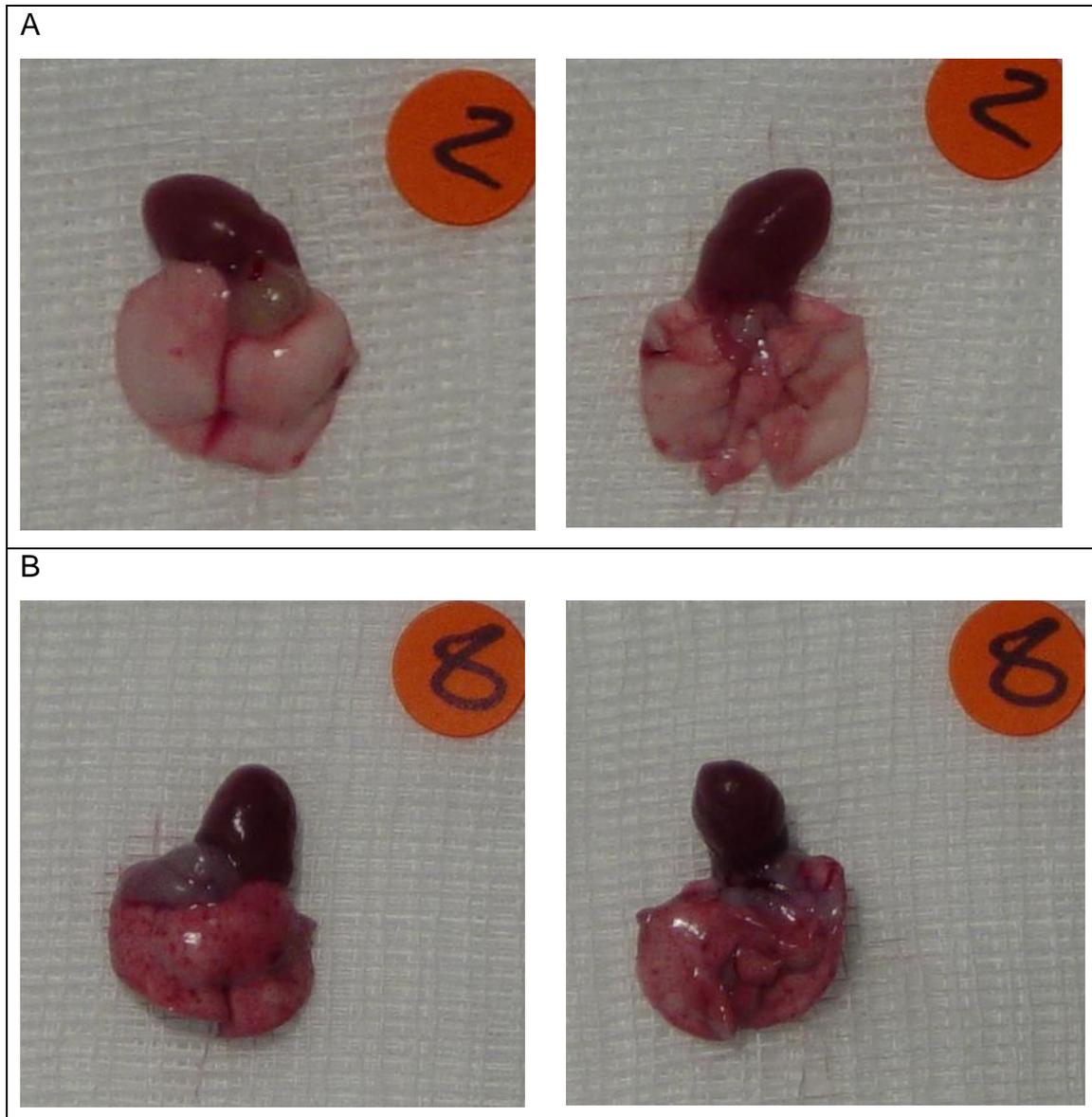


Abb. 30: Aufnahmen nicht-inflammatorischer und inflammatorischer Herz-Lungen-Organpakete. A: Kontrolle ohne LPS. B: Inflammatorische Veränderungen nach Vorbehandlung mit CoPP+SnPP, 6 h nach LPS. Links jeweils Ansicht von dorsal, rechts jeweils Ansicht von ventral.

4.5 *In vitro*-Transmigration neutrophiler Granulozyten

Um die verschiedenen bei der Neutrophilenmigration beteiligten Gewebe zu untersuchen, werden humane Endothel- bzw. Epithelzellen auf Transwell-Platten ausgesät und humane neutrophile Granulozyten mit dem Chemokin MIP-2 chemotaktisch stimuliert.

CoPP-Behandlung

Bei isolierter Behandlung der PMNs zeigt sich bei drei verschiedenen CoPP-Konzentrationen eine signifikante Suppression der Transmigration durch die *Epithelschicht* (170.293 ± 6.261 vs. CoPP 10 ng/ml: 5.573 ± 411 ; 1 ng/ml: 4.922 ± 161 ; 0,1 ng/ml: 3.730 ± 581 1/ml; $P < 0,05$) und durch die *Endothelschicht* (80.230 ± 21.024 vs. CoPP 10 ng/ml: 20.276 ± 1.112 ; 1 ng/ml: 19.724 ± 8.081 ; 0,1 ng/ml: 24.759 ± 3.426 1/ml; $P < 0,05$). Siehe Abbildung 31 A und B.

Bei isolierter Behandlung der Epithelzellen fällt die Anzahl migrierter PMNs signifikant geringer aus im Vergleich zur Kontrolle (184.483 ± 11.185 vs. CoPP 10 ng/ml: 1.972 ± 65 ; 1 ng/ml: 2.212 ± 286 ; 0,1 ng/ml: 1.346 ± 260 1/ml; $P < 0,05$). Siehe Abbildung 31 C.

Ebenso kommt es zu einer signifikant verringerten Migrationsrate, wenn Epithel und PMNs behandelt werden (208.666 ± 14.628 vs. CoPP 10 ng/ml: 5.905 ± 638 ; 1 ng/ml: 7.901 ± 2.751 ; 0,1 ng/ml: 5.402 ± 53 1/ml; $P < 0,05$). Siehe Abbildung 31 E.

Die isolierte Behandlung des Endothels zeigt keine Auswirkungen auf die PMN-Migration (siehe Abbildung 31 D). Bei gleichzeitiger Behandlung von PMNs und Endothelzellen wird jedoch eine signifikant verringerte PMN-Migration erzielt (55.093 ± 10.114 vs. CoPP 10 ng/ml: 21.071 ± 985 ; 1 ng/ml: 17.438 ± 2.360 ; 0,1 ng/ml: 19.798 ± 271 1/ml; $P < 0,05$). Siehe Abbildung 31 F.

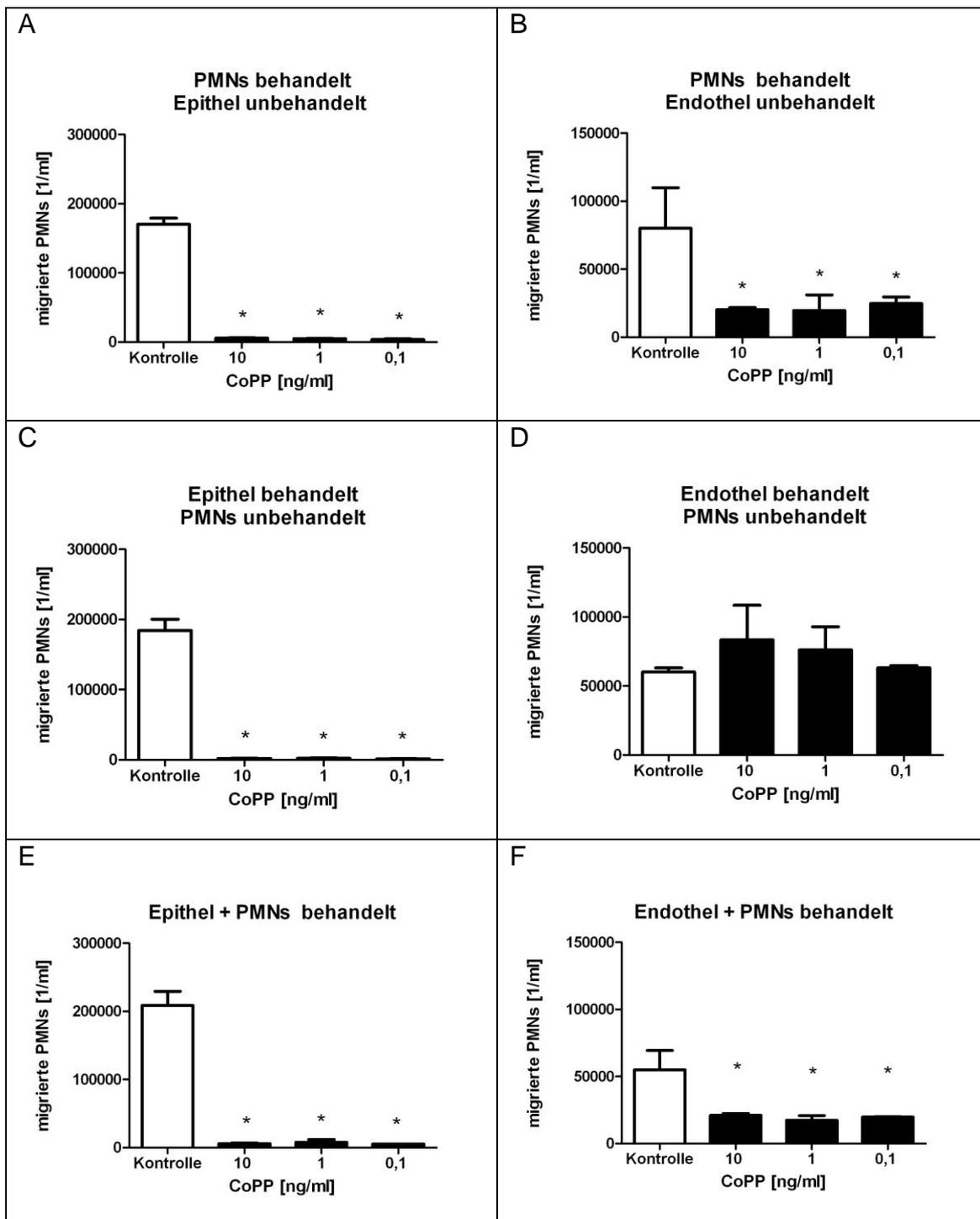


Abb. 31 Migrierte, humane PMNs durch Epithel- (A549) und Endothel-(HMVEC-L)-Monolayer bei der Behandlung mit verschiedenen CoPP-Konzentrationen. A: Migration behandelter PMNs durch unbehandeltes Epithel. B: Migration behandelter PMNs durch unbehandeltes Endothel. C: Migration unbehandelter PMNs durch behandeltes Epithel. D: Migration unbehandelter PMNs durch behandeltes Endothel. E: Migration behandelter PMNs durch behandeltes Epithel. F: Migration behandelter PMNs durch behandeltes Endothel. (n = 4, * P < 0,05)

4.6 *In vivo*-Migration neutrophiler Granulozyten

Zur weiteren Untersuchung der PMN-Migration in die verschiedenen Lungenkompartimente erfolgen durchflusszytometrische Analysen.

Intravasal zeigen sich bei Tieren der SnPP-Gruppe nach LPS-Inhalation gegenüber Tieren der Kontrollgruppe mit LPS signifikant erhöhte PMN-Zahlen (SnPP: $1,54 \cdot 10^6 \pm 7,49 \cdot 10^5$ vs. Kontrolle mit LPS: $6,67 \cdot 10^5 \pm 2,52 \cdot 10^5$ 1/ml; $P < 0,05$). Bei den anderen Versuchsgruppen mit CoPP und CoPP+SnPP kann gegenüber der Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Siehe Abbildung 32.

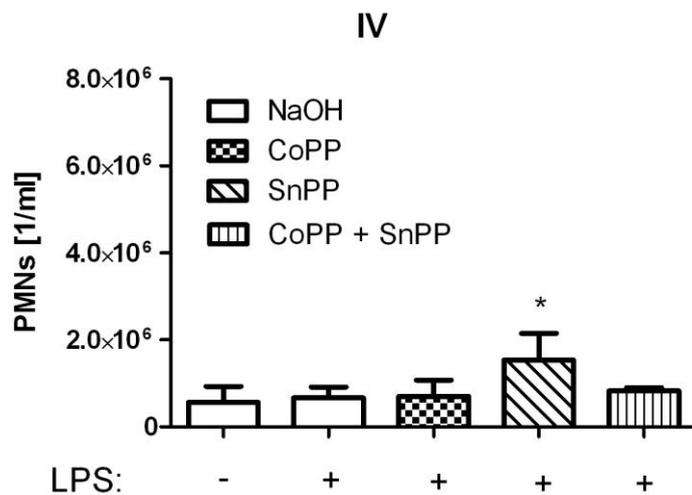


Abb. 32: PMNs im Intravasalraum. $n = 4$, * $P < 0,05$ signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne LPS. IV = intravasal.

Nach LPS-Inhalation steigen die PMN-Zahlen im Interstitium bei allen Gruppen im Vergleich zur Kontrolle ohne LPS signifikant an. Versuchstiere nach Behandlung mit CoPP+SnPP und LPS-Inhalation zeigen gegenüber der Kontrollgruppe mit LPS eine signifikant erhöhte PMN-Akkumulation ($4,80 \cdot 10^6 \pm 9,23 \cdot 10^5$ vs. $2,93 \cdot 10^6 \pm 4,50 \cdot 10^5$ 1/ml; $P < 0,05$). Die anderen Versuchsgruppen mit CoPP- bzw. SnPP-Behandlung und LPS-Inhalation zeigen keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit LPS. Siehe Abbildung 33.

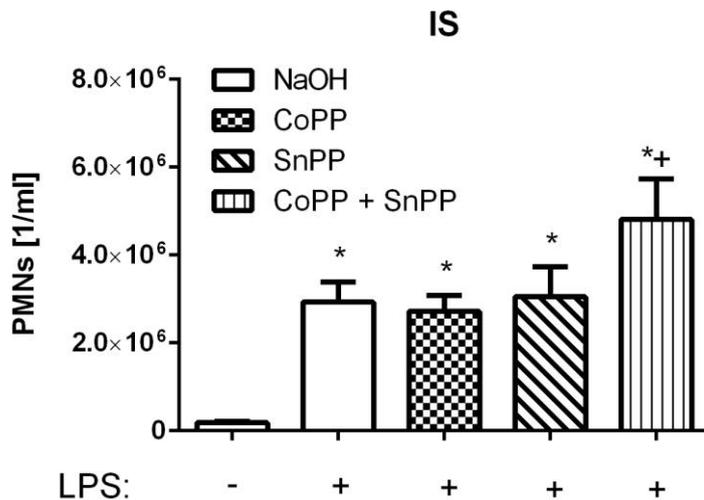


Abb. 33: PMNs im Interstitium. $n = 4$, * $P < 0,05$ signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne LPS; + $P < 0,05$ signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe mit LPS. IS = interstitiell.

Nach LPS-Inhalation steigt die Anzahl der PMNs in der BAL in allen Gruppen signifikant an, verglichen mit der Kontrollgruppe ohne LPS. Dabei steigt die PMN-Zahl in der BAL nach Monobehandlung mit SnPP ($2,53 \cdot 10^6 \pm 3,21 \cdot 10^5$ vs. $3,40 \cdot 10^6 \pm 7,91 \cdot 10^5$ 1/ml; $P < 0,05$) als auch nach Kombinationsbehandlung mit CoPP+SnPP ($2,53 \cdot 10^6 \pm 3,21 \cdot 10^5$ vs. $3,10 \cdot 10^6 \pm 7,91 \cdot 10^5$ 1/ml; $P < 0,05$) noch einmal gegenüber der Kontrollgruppe mit LPS signifikant an. Die Stimulation der HO-1 durch CoPP senkt im Gegensatz dazu die Anzahl der migrierten PMNs im Alveolarraum signifikant ($2,53 \cdot 10^6 \pm 3,21 \cdot 10^5$ vs. $1,92 \cdot 10^6 \pm 4,26 \cdot 10^5$ 1/ml; $P < 0,05$). Siehe Abbildung 34.

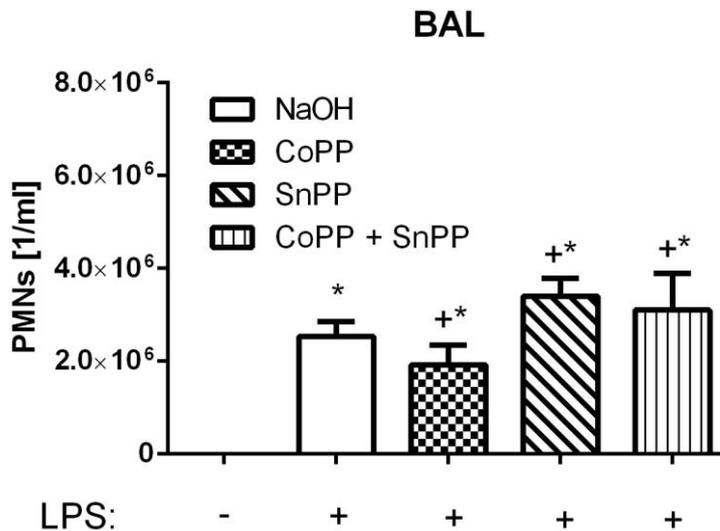


Abb. 34: PMNs in der BAL. n = 4, * P < 0,05 signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne LPS; + P < 0,05 signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe mit LPS. BAL = Bronchoalveoläre Lavage.

4.7 Induktion und Inhibition der HO-1-Aktivität

Um die induzierenden Eigenschaften des CoPP auch anhand einer erhöhten Enzymaktivität nachzuweisen, wird die Aktivität des HO-1-Enzyms nach Induktion und Inhibition ermittelt (siehe Abbildung 35). LPS reicht als Stimulus bereits aus, um die HO-1-Grundaktivität auf das rund Vierfache zu erhöhen (1 vs. $0,24 \pm 0,08$; $P < 0,05$). Die zusätzliche Applikation von CoPP bewirkt sogar eine Versechsfachung der Enzymaktivität, verglichen mit der Kontrolle ohne LPS ($0,24 \pm 0,08$ vs. $1,65 \pm 0,24$; $P < 0,05$). SnPP inhibiert die HO-1-Aktivität signifikant unter die der Kontrolle mit LPS ($0,59 \pm 0,27$ vs. 1 ; $P < 0,05$). Die kombinierte Applikation von CoPP+SnPP senkt die HO-1-Aktivität sogar signifikant unter die Aktivität der Kontrolltiere ohne LPS ($0,18 \pm 0,25$ vs. $0,24 \pm 0,08$; $P < 0,05$).

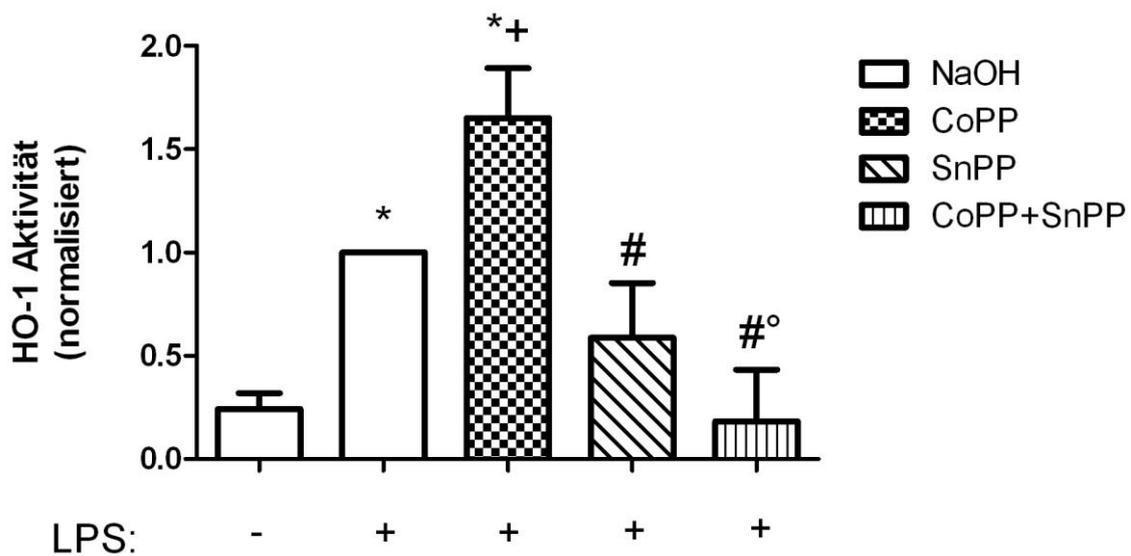


Abb. 35: Normalisierte Auftragung der HO-1-Aktivität. n = 4, * P < 0,05 signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne LPS, *+ P < 0,05 signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe mit und ohne LPS; # P < 0,05 signifikante Verringerung im Vergleich zur Kontrollgruppe mit LPS, °# P < 0,05 signifikante Verringerung im Vergleich zur Kontrollgruppe mit und ohne LPS

4.8 Zytokinbestimmung in der BAL

Zytokine spielen in der Migration und Chemotaxis der PMNs eine bedeutende Rolle. Aus diesem Grund erfolgt die Zytokinbestimmung in der BAL.

Abbildung 36 A - D zeigt, dass sämtliche untersuchte Zytokine nach LPS-Applikation, verglichen mit der Kontrollgruppe ohne LPS, in allen Versuchsgruppen signifikant ansteigen.

Durch Vorbehandlung mit HO-1-induzierendem CoPP kann nur die Konzentration von MIP-2 in der BAL signifikant reduziert werden (Kontrolle 1.430 ± 487 vs. CoPP: 884 ± 255 pg/ml).

Eine Kombinationsbehandlung der Tiere mit CoPP+SnPP und eine Behandlung mit SnPP führen zur signifikanten Erhöhung der Zytokine TNF α (Kontrolle: 1.290 ± 311 vs. SnPP: 2.444 ± 1.166 ; CoPP+SnPP 1.903 ± 440 pg/ml BAL; P < 0,05), CXCL2/3 (MIP-2) (Kontrolle: 1.430 ± 487 vs. SnPP: 2.171 ± 828 ;

CoPP+SnPP: 1.937 ± 116 pg/ml BAL; $P < 0,05$) und CXCL1 (KC) (Kontrolle: 4.147 ± 1.128 vs. SnPP: 6.642 ± 2.110 , CoPP+SnPP: 5.266 ± 560 pg/ml BAL; $P < 0,05$) verglichen mit der Kontrollgruppe mit LPS. Dahingegen kann die IL-6-Konzentration durch keine Vorbehandlung signifikant beeinflusst werden.

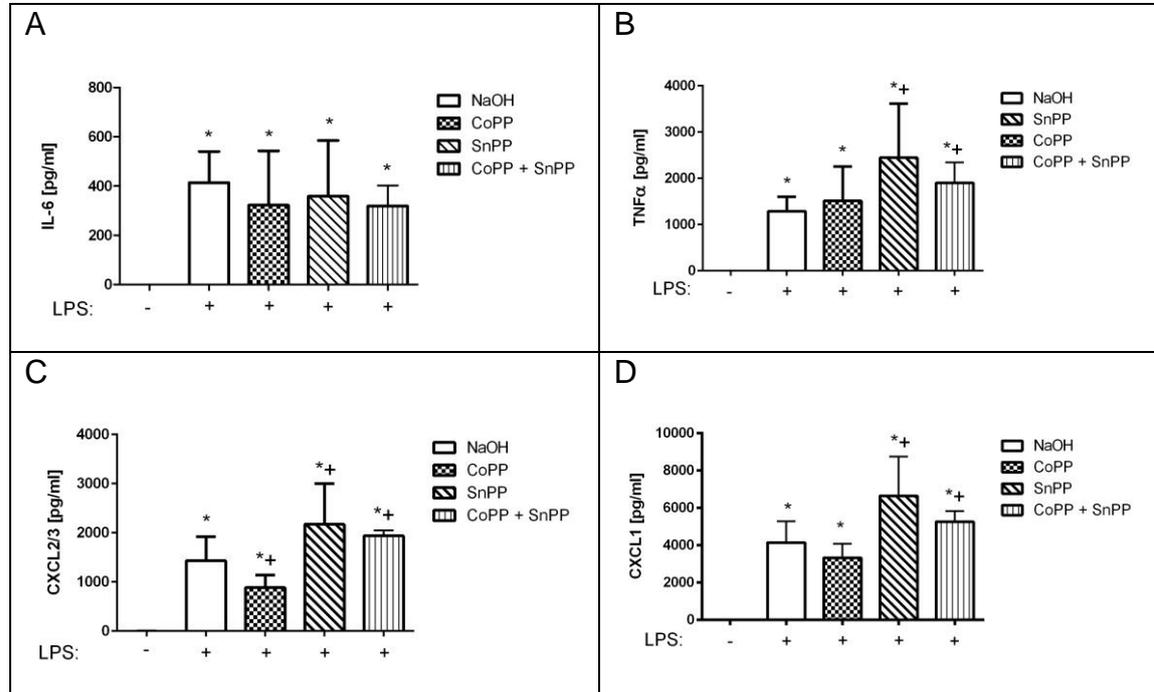


Abb. 36: Zytokine in der BAL. Bestimmung verschiedener proinflammatorischer Zytokine in der bronchoalveolären Lavage (BAL). A: IL-6. B: TNF α . C: CXCL2/3 (MIP-2). D: CXCL1 (KC). $n = 4$, * $P < 0,05$ signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne LPS, + $P < 0,05$ signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe mit LPS

5. Diskussion

Neutrophile Granulozyten spielen in der Pathogenese des ARDS eine zentrale Rolle [31;194]. Dabei besteht eine Assoziation zwischen der Menge neutrophiler Granulozyten in der BAL und dem Outcome im ARDS [26]. Das ARDS ist unter anderem gekennzeichnet durch zwei Hauptmerkmale: Die exzessive Neutrophilenmigration in die Lungen und die mikro- und makrovaskuläre Schrankenstörung mit entsprechendem Flüssigkeitseinstrom in die Lungen [20;194]. Beide Hauptmerkmale werden im Rahmen dieser Arbeit am Mausmodell untersucht.

5.1 Die Rolle der HO-1 bei der Migration neutrophiler Granulozyten

Die kontrollierte Neutrophilenmigration in die Lungen kann kein akutes Lungenversagen verursachen. Diese ist in geringem Ausmaß ein physiologischer Vorgang. Der Migrationsprozess in den Alveolarraum läuft in mehreren Schritten ab: Sequestration in den Lungenkapillaren, transendotheliale Migration ins Interstitium und transepitheliale Migration in den Alveolarraum [71]. Zur pulmonalen Schädigung führen unkontrolliert migrierende, aktivierte neutrophile Granulozyten, welche im Fall einer bakteriellen Infektion innerhalb kürzester Zeit rekrutiert werden und das Outcome betroffener Patienten verschlechtern [31;195;196].

Für die Untersuchung des Migrationsverhaltens neutrophiler Granulozyten in die Lungen kommt ein etabliertes durchflusszytometrisches Verfahren zur Anwendung (s. Kapitel 3.2.9), welches eine Quantifizierung von PMNs im intravasalen, interstitiellen und alveolären Kompartiment ermöglicht [71;180;197;198].

Dabei kann im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass mit CoPP behandelte Versuchstiere einen reduzierten Neutrophileninflux in den Alveolarraum zeigen. Tiere, die mit SnPP oder einer Kombination aus CoPP+SnPP behandelt werden, zeigen hingegen einen erhöhten Neutrophileninflux. Dies bestätigt den protektiven Einfluss der HO-1 auf das Inflammationsgeschehen. Ähnliche Ergebnisse zeigen auch Yin et al. in ihrer

Studie an einem ähnlichen tierexperimentellen Modell (BALB/c Maus). Die Autoren berichten von verringerten Neutrophilenzahlen in der BAL nach HO-1-Induktion, ebenso wie von erhöhten Zahlen bei HO-1-Inhibition. Zwar unterscheiden sich die absoluten Zahlen im Vergleich zur vorliegenden Arbeit. Dies kann zum einen am abweichenden LPS-Applikationsweg (intranasale Instillation von LPS von *E. coli*) liegen als auch an der doppelten intraperitonealen Dosis CoPP (10 versus 5 mg/kg KG) [199].

Die Neutrophilenakkumulation im pulmonal-intravasalen Raum wird hingegen weder durch CoPP noch durch kombinierte Behandlung mit CoPP+SnPP beeinflusst. Einzig die HO-1-inhibierende Wirkung durch SnPP erhöht die intravasale Akkumulation. Eine Erklärung hierfür kann sein, dass die Induktion der HO-1 an den pulmonalen Endothelzellen nicht in dem Maße stattfindet wie an den pulmonalen Epithelzellen mit der Folge einer nahezu unveränderten intravasalen Akkumulation und Migration in das Interstitium, jedoch einer verminderten Migration in den Alveolarraum.

Diese Beobachtungen werden gestützt durch tierexperimentelle Studienergebnisse von Freitas et al., die bei HO-1-Inhibition von einer vermehrten intravasalen Akkumulation Neutrophiler berichten. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass die Autoren nicht mit den in dieser Arbeit verwendeten HO-1-Inhibitoren arbeiteten (ZnPP versus SnPP). Zudem wird nicht die Neutrophilenmigration aus den Pulmonalgefäßen untersucht, sondern aus den Mesenterialgefäßen in die Peritonealhöhle [200].

Zur weiteren Klärung dieser *in vivo* ermittelten Ergebnisse und um eine Übertragung der Versuchsergebnisse vom Mausmodell auf humane Endothel- und Epithelzellen zu ermöglichen, wird ein Transmigrationsversuch *in vitro* durchgeführt. So reduziert sich die Neutrophilentransmigration durch CoPP-behandeltes Epithel als auch bei alleiniger Behandlung Neutrophiler und bei Behandlung beider Zelltypen. Endothel, das *in vitro* mit CoPP-behandelt wird, zeigt keine Reduktion der Neutrophilentransmigration. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass *aktivierte* Neutrophile reaktive Sauerstoffspezies (ROS) freisetzen. ROS können das HO-1-Gen induzieren [201]. Eine auf diese

Weise erlangte HO-1-Induktion überlagert die pharmakologische Induktion. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Nichtstimulierbarkeit der Endothelzellen *in vitro*. Diese Ergebnisse stehen mit den Ergebnissen der Versuche *in vivo* in Einklang, bei denen im interstitiellen Kompartiment unter induzierender Behandlung mit CoPP keine PMN-Reduktion erzielt werden kann. Daraus lässt sich schließen, dass eine nahezu ungehinderte Migration Neutrophiler durch die Endothelbarriere auch bei HO-1-Induktion möglich ist. Dieser Rückschluss findet Unterstützung durch neuere Untersuchungen von Wang et al., die *in vitro* eine erhöhte Neutrophilenmigration durch einen Monolayer aus humanen Endothelzellen feststellen, diese Migration durch einen Bilayer aus humanen Endothel- und Epithelzellen jedoch reduzieren können. Eine pharmakologische Induktion bzw. Inhibition der HO-1 findet bei Wang et al. allerdings keine Anwendung [83].

Einen Widerspruch zur bisher beschriebenen fehlenden Wirkung der HO-1 auf Endothelzellen lässt eine Arbeit von Hayashi et al. erkennen. Die Autoren berichten von einer verringerten P-Selektinsekretion bei hochregulierter HO-1. P-Selektin ist ein wichtiges Adhäsionsmolekül bei der intravasalen Akkumulation Neutrophiler. Untersucht wird in der Arbeit von Hayashi et al. *in vitro* das Auftreten von P-Selektin an humanen Endothelzellen (HUVEC) und *in vivo* an postkapillären Venolen im Mesenterium der Ratte. Die Stimulation der HO-1 erfolgt jedoch abweichend von den Bedingungen in der vorliegenden Arbeit mit Hämin. Die Pathologie ist keine Endotoxinwirkung, sondern oxidativer Stress, herbeigeführt durch H₂O₂ [202]. Insofern ist ein Vergleich mit den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit schwierig, unter anderem, da die Migration neutrophiler Granulozyten in der Lunge nicht im Bereich der Venolen, sondern im Bereich der Kapillaren erfolgt (siehe Kapitel 1.6.5) und die zugrunde liegenden Pathologien in beiden Arbeiten grundverschieden sind. Ebenso lassen die Ergebnisse von Soares et al. einen Widerspruch zu den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit erkennen. Hierbei zeigen die Autoren *in vitro* an Endothelzellen vom Rind und Schwein, dass eine mittels Adenoviren überexprimierte HO-1 die Expression von E-Selektin und VCAM-1 reduziert [203]. Da beide Proteine eine wesentliche Rolle bei der Adhäsion Neutrophiler

am Endothel spielen, müsste so zumindest bei den oben diskutierten *in vivo*-Versuchen ein gegensätzliches Ergebnis zu erwarten sein, nämlich ein verringerter Neutrophileninflux in das Interstitium. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass bei diesen Versuchen die HO-1 durch Adenoviren überexprimiert und nicht durch CoPP induziert wird, welche eine direkte Vergleichbarkeit ebenso in Frage stellen dürfte.

Hingegen bestätigen Studienergebnisse von Goodman et al. die in dieser Arbeit gezeigte reduzierte Neutrophilenmigration durch Epithel. So zeigen Adenokarzinomzellen eine 4-fach erhöhte HO-1-Grundaktivität, verglichen mit Normalgewebe [204]. Da die Epithelzellen der vorliegenden Arbeit vom humanen Adenokarzinom der Lunge stammen, liegt es nahe, dass bereits die grundständig erhöhte HO-1-Aktivität der Adenokarzinomzellen in Kombination mit der durch ROS induzierten HO-1 zu einer reduzierten transepithelialen Migration führen. Somit ist es wahrscheinlich, dass zwei im Versuch unbeeinflussbare Induktionsmechanismen die Neutrophilenmigration bereits bei den unbehandelten Kontrolltieren reduzieren. Eine zusätzliche HO-1-Induktion mittels CoPP führt zu einer weiteren starken Reduktion der Neutrophilenmigration in den Alveolarraum im Vergleich zu den Kontrolltieren.

Donnelly et al. zeigen in ihrer Arbeit *in vitro* an humanen alveolären Epithelzellen, dass sich durch einen Mix aus proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , TNF α , INF- γ) die HO-1-Aktivität um das 8-fache steigern lässt [135]. Geht man davon aus, dass eine erhöhte HO-1-Aktivität mit einer verringerten Neutrophilenmigration assoziiert ist, so kommt den Epithelzellen damit eine starke Rolle in der Inhibition der Neutrophilenmigration zu. Zudem kommt in dieser Arbeit im Rahmen der oben diskutierten *in-vitro*-Transmigrationsversuche ebenfalls ein proinflammatorisches Zytokin, das MIP-2, zum Einsatz. Es erscheint naheliegend, dass sich hierüber, ähnlich wie bei Donnelly et al., bereits eine Steigerung der HO-1-Aktivität in den Epithelzellen erreichen lässt.

Das vorbeschriebene Migrationsverhalten neutrophiler Granulozyten in dieser Arbeit kann auch in den angefertigten histologischen Schnitten nachgewiesen werden. Darin lassen sich im interstitiellen Kompartiment unabhängig von der

Vorbehandlung vermehrt Neutrophile nachweisen, sobald die Tiere LPS inhaliert haben. Die Neutrophilenakkumulation ist jedoch bei den CoPP-vorbehandelten Tieren deutlich geringer ausgeprägt ebenso wie die ödematösen Veränderungen an den Alveolarsepten. Insbesondere in den immunhistologischen Schnittbildern erkennt man eine verringerte Neutrophilenakkumulation. Diese Beobachtungen decken sich mit Ergebnissen der tierexperimentellen Studie von Yin et al., welche in H.E.-gefärbten Schnitten nach LPS-Applikation eine starke Neutrophilenzunahme im Interstitium unabhängig von einer HO-1-Induktion oder -Inhibition nachweisen. Ebenso wie in der vorliegenden Arbeit können Yin et al. einen Rückgang der Neutrophilenzahl im Alveolarraum nach CoPP-Vorbehandlung zeigen [199].

Um die systemischen Auswirkungen einer induzierten HO-1 auf das zelluläre Immunsystem zu untersuchen, wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Differenzialblutbilder aus kapillärem Mischblut angefertigt. Die absoluten Neutrophilenzahlen zu Beginn der Versuche liegen alle im Bereich von etwa 1 bis $2 \cdot 10^6$ /ml, identisch mit den Angaben von Reutershan [71], Ngamsri [180] und Vietinghoff [51]. Mit LPS behandelte Tiere, die mit CoPP vorbehandelt werden, zeigen im Verlauf der Inflammation eine verringerte Anzahl zirkulierender PMNs und BNs als Tiere, deren HO-1 inhibiert wird oder Tiere der Kontrollgruppe. Es kann daraus geschlossen werden, dass die Freisetzung Neutrophiler in die Blutbahn bei HO-1-induzierten Tieren mit Inflammation in wesentlich geringerem Ausmaß stattfindet als bei Tieren, deren HO-1 inhibiert wird bzw. bei Kontrolltieren. Damit stehen auch weniger Neutrophile für die Migration in die Lungen HO-1-induzierter Tiere bereit. Im Gegensatz dazu findet bei Tieren mit inhibierter HO-1 nach LPS-Inhalation eine rasch und massiv auftretende transiente Neutrophilenvermehrung im Blutkreislauf statt. Die rasche Zunahme Neutrophiler steht damit im Zusammenhang mit der sehr schnellen kompetitiven Enzyminhibition durch SnPP innerhalb einer Stunde, wie Sardana et al. berichten [132].

Zudem scheint bei inhibierter HO-1 der Verbrauch Neutrophiler durch fortdauernde Migration erhöht zu sein, da sich die Tiere am Endpunkt des Versuchs in einem neutropenen Zustand befinden und zudem eine erhebliche

Linksverschiebung zeigen. Reutershan et al. berichten in ihrer Arbeit von einem Maximum der Neutrophilenmigration ins Interstitium nach 12 Stunden und einer fortwährenden Neutrophilenmigration in den Alveolarraum über 24 Stunden [71]. Durch diese über viele Stunden andauernde Migration kann eine entsprechende Erschöpfung zirkulierender Neutrophiler bis in die Neutropenie erklärt werden. Rosinski et al. untersuchen in einer tierexperimentellen Studie am Mausmodell die Dynamik der Neutrophilenproduktion und –freisetzung aus dem Knochenmark bei Brandverletzung von 5% Körperoberfläche und Wundinfektion mit *Pseudomonas aeruginosa*. Dabei zeigt sich eine 90%ige Erschöpfung des Neutrophilenpools im Knochenmark nach 20 Stunden [205]. Diese Ergebnisse lassen ebenso auf eine Neutropenie aufgrund der Erschöpfung zirkulierender Neutrophiler bei fortwährender Migration ins Inflammationsgebiet schließen.

Wie oben erwähnt, befinden sich die Neutrophilenzahlen im kapillären Blut auf einem vergleichbaren Niveau wie in anderen Studien. Dennoch kommt es auch nach CoPP-Gabe zu einer, wenn auch deutlich geringeren, Linksverschiebung, was den Erwartungen widerspricht. Zunächst ist diese Beobachtung schwer hinreichend zu erklären. Wahrscheinlich ist der inflammatorische Reiz nach LPS-Inhalation zumindest so stark, dass es zu einer geringen Linksverschiebung kommt. Dabei ist auch denkbar, dass reife Neutrophile verstärkt, jedoch in deutlich geringerem Maße als bei inhibierter HO-1, freigesetzt werden, wobei diese dann in einer Anzahl in die inflammatorischen Lungen migrieren, die ein Gleichgewicht zwischen den freigesetzten Neutrophilen aus dem Knochenmark und den migrierten Neutrophilen gewährleistet, also ein vorübergehender Überschuss an zirkulierenden Neutrophilen ausbleibt. Eine weitere Erklärung bietet eine an dieser Stelle vorweggenommene Betrachtung der Zytokinlevel (siehe Kapitel 5.3). Suwa et al. zeigen in zwei tierexperimentellen Arbeiten eine verstärkte Freisetzung reifer als auch unreifer Neutrophiler in den Blutkreislauf alleine durch proinflammatorisches IL-6 im Serum [206;207]. Durch CoPP-Vorbehandlung können in der vorliegenden Arbeit überraschenderweise die Level der untersuchten proinflammatorischen Zytokine IL-6, TNF α und KC in der BAL

nicht verringert werden. Einzig die MIP-2-Konzentration wurde signifikant gesenkt. Somit wäre auch bei CoPP-behandelten Tieren die IL-6-Wirkung vorhanden und eine chemotaktische Wirkung auf bereits zirkulierende Neutrophile damit sicher. Auf eine neutrophilenfreisetzende Wirkung aus dem Knochenmark kann daraus aber nicht automatisch geschlossen werden, da der Zytokinlevel im Serum in der vorliegenden Arbeit nicht bestimmt wurde und somit unbekannt ist.

Bezüglich der Neutrophilenmigration kann in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das Alveolarepithel eine induzierbare Barriere bei der Neutrophilenmigration darstellt. Diese Barriere kann zusätzlich durch eine pharmakologische Induktion mit CoPP erhöht werden und zu einer signifikanten Reduktion der PMN-Zahl im Alveolarraum führen. Zusätzlich kann durch Differenzialblutbilder nachgewiesen werden, dass CoPP die Freisetzung Neutrophiler aus dem Knochenmark verringert.

5.2 Wirkung von Induktion und Inhibition auf die Enzymaktivität der HO-1

Die HO-1 hat immunregulatorische Aufgaben. HO-1-Defizienz führt bei Mensch und Maus unter anderem zur PMN-Akkumulation [163]. Die Untersuchung der Enzymaktivität in den Lungen zeigt zum einen die stark induzierende Wirkung des CoPP, zum anderen die bereits grundständig deutlich erhöhte Enzymaktivität der Kontrollmäuse, beispielsweise durch LPS-Einwirkung, durch ROS oder durch Zytokinwirkung. So ist die HO-1-Aktivität nach LPS-Inhalation ohne weitere Vorbehandlung bereits zweifach erhöht, verglichen mit Kontrolltieren ohne LPS-Inhalation.

CoPP-Applikation vor der LPS-Inhalation steigert die HO-1-Aktivität um das 1,5-fache. Eine stark verringerte HO-1-Aktivität nach Inhibition mit SnPP bzw. CoPP+SnPP unterstreicht die inhibitorische Wirkung durch SnPP, welches selbst die HO-1-induzierende Wirkung von Endotoxin, ROS und proinflammatorischen Zytokinen nahezu vollständig aufhebt. Betrachtet man die in den Lungen der Tiere bestimmte HO-1-Aktivität nach Enzyminduktion und stellt diese den Ergebnissen aus den oben diskutierten *in vivo*-

Migrationsversuchen gegenüber, so steht eine erhöhte HO-1-Aktivität mit einem verringerten Neutrophileninflux in den Alveolarraum in Verbindung. Bei Enzyminhibition kommt es zu einem umgekehrten Verhalten.

5.3 Einfluss der HO-1 auf die Gefäßpermeabilität und die Zytokinlevel

Neben der Migration neutrophiler Granulozyten in die Lungen ist die gesteigerte mikro- und makrovaskuläre Schrankenstörung ein weiteres Hauptmerkmal der akuten pulmonalen Inflammation und Ursache des Flüssigkeitseinstroms in die Lungen. Tiere, bei denen die HO-1 mit CoPP induziert wird, zeigen ein signifikant geringeres Evans-blue-Infiltrat in das Lungengewebe als Tiere der Kontrollgruppe. Dahingegen fällt das Infiltrat im Lungengewebe nach Behandlung durch SnPP bzw. CoPP+SnPP signifikant höher aus als bei Tieren der Kontrollgruppe, was auf einen stärkeren Defekt der endothelialen Barriere hindeutet.

Dabei scheint die Betrachtung der proinflammatorischen Zytokinlevel sinnvoll. Proinflammatorische Zytokine aktivieren neutrophile Granulozyten und halten einen chemotaktischen Gradienten aufrecht, welcher Immunzellen in infiziertes Gewebe leitet. Zudem haben proinflammatorische Zytokine einen direkt permeabilitätserhöhenden Einfluss auf das Endothel. So ist nachgewiesen, dass viele proinflammatorische Mediatoren wie beispielsweise LPS, IL-6, TNF α und weitere durch Öffnung der interendothelialen Verbindungen die endotheliale Permeabilität steigern [208;209]. Reutershan et al. gehen in ihrer Studie insbesondere auf die Bedeutung der Liganden am CXC-Chemokin-Rezeptor 2 (CXCR2), MIP-2 und KC, beides murine Chemokine, ein und belegen zudem deren bedeutenden Einfluss auf die pulmonale Gefäßpermeabilität. So können die Autoren bei CXCR2-defizienten Mäusen das Evans-blue-Extravasat deutlich reduzieren [210]. Wang et al. betonen in ihrer Studie an humanen Endothel- und Epithelzellen unter septischen Konditionen den Einfluss der Endothelzellen auf die Entstehung proteinreicher Flüssigkeitsansammlungen wie beim ARDS. So zeigen die Autoren in vitro die starke Zunahme der Permeabilität mittels Evans blue nach Behandlung des Endothels mit einem Zytomix aus proinflammatorischen Zytokinen (TNF α , IL-1, INF γ), LPS oder auch mit Plasma septischer Patienten. Ebenso betonen die

Autoren den protektiven Einfluss der Epithelzellen im Zusammenspiel mit den Endothelzellen auf Permeabilität und Neutrophilenmigration. Kommt *in vitro* statt eines Monolayers aus Endothelzellen ein Bilayer aus Endothel- und Epithelzellen zum Einsatz, so lässt sich Permeabilität und Neutrophilenmigration stark reduzieren [83].

In der vorliegenden Arbeit zeigt die Messung von Zytokinen in der BAL nach LPS-Applikation signifikant steigende Werte von IL-6, TNF α , MIP-2 und KC. Durch HO-1-Induktion kann nur MIP-2 signifikant reduziert werden. Eine Reduktion der anderen untersuchten proinflammatorischen Zytokine IL-6, TNF α und KC ist bei induzierender Vorbehandlung nicht gegeben. Jedoch steigen die Level von TNF α , MIP-2 und KC nach Inhibition der HO-1 gegenüber der Kontrolle mit LPS signifikant an. Diese drei Zytokine haben einen starken chemotaktischen Einfluss auf neutrophile Granulozyten [210]. Furze et al. zeigen in einer Arbeit die signifikante Zunahme zirkulierender Neutrophiler innerhalb von 15 Minuten nach intravenöser MIP-2-Injektion [211]. Ebenso zeigen zwei Studien von Martin et al. sowie Burdon et al. die schnelle und selektive Freisetzung Neutrophiler aus dem Femur der Maus nach MIP-2- und KC-Injektion [212;213]. Zudem ist TNF α ein Zytokin, welches im Rahmen einer Gewebeläsion rasch von Makrophagen sezerniert wird und früh einen wirkungsvollen chemotaktischen Gradienten für die Neutrophilenmigration aufbaut [35]. Auch KC ist ein Chemokin, welches in der Inflammation bereits früh und über Stunden hinweg hohe Plasmaspiegel erreicht [39]. Insbesondere MIP-2 und KC haben auch systemische Auswirkungen, indem sie jeweils für sich alleine gesehen als auch zusammen mit G-CSF erheblichen Einfluss auf die Freisetzung von Neutrophilen aus dem Knochenmark haben [38;48].

In einer Studie von Zhang et al. wird Ratten intratracheal LPS verabreicht. Bereits vier Stunden post infectionem werden sehr hohe MIP-2-Level erreicht, die um das 18-fache über dem Level in dieser Arbeit liegen [40]. Dieselbe Forschergruppe findet in einer anderen Studie heraus, dass Plasmalevel von MIP-2 zudem starken zeitlichen Schwankungen unterworfen sind [39]. Dadurch können sich unter anderem derartig hohe Abweichungen der Ergebnisse der Studien von Zhang et al. und der vorliegenden Arbeit ergeben.

Zampetaki et al. können in der BAL, im Gegensatz zu den Ergebnissen in dieser Arbeit, eine signifikante Reduktion der MIP-2-Level LPS-behandelter Tiere feststellen. Jedoch erhalten diese Tiere das LPS intraperitoneal appliziert und die BAL-Entnahme erfolgt sechs Stunden nach LPS-Applikation [214]. In der vorliegenden Arbeit erfolgt die BAL-Entnahme 24 Stunden nach LPS-Applikation, welche zudem per inhalationem und nicht intraperitoneal erfolgt. Das Ergebnis in der vorliegenden Arbeit ist so durchaus möglich, da LPS direkt in die Atemwege gelangt und somit unmittelbar im Alveolarraum und dem Lungenparenchym wirkt. Es liegt nahe, dass der inflammatorische Reiz in den Atemwegen in der vorliegenden Arbeit deutlich stärker ist als bei Zampetaki et al.

Otterbein et al. zeigen in einer *in vitro*-Untersuchung an RAW-264.7-Zellen (peritoneale Makrophagen der Maus), dass die HO-1-Überexpression die TNF α -Produktion nach LPS-Behandlung reduziert [147]. Dieses Ergebnis steht zwar im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, jedoch erfolgt bei Otterbein et al. die Überexpression mittels Verwendung eines Plasmids. In der vorliegenden Arbeit erfolgt die Induktion der HO-1 mit CoPP. Die Erkenntnis, dass eine Zytokinreduktion in der BAL durch HO-1-Induktion nicht erreichbar ist, lässt auf einen unvermindert starken chemotaktischen Reiz auf Neutrophile, ausgehend vom Alveolarraum, schließen. Dies kann eine weitere Erklärung für die unvermindert starke Neutrophilenakkumulation im intravasalen und interstitiellen Raum im *in vivo*-Migrationsversuch sein.

5.4 Fazit

Eine wesentliche Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass eine Induktion der HO-1 im Vorfeld einer pulmonalen Inflammation zu einem abgeschwächten Inflammationsgeschehen führt. Dies wird durch einen verringerten Neutrophileninflux in den Alveolarraum sowie eine reduzierte mikrovaskuläre Permeabilität nachgewiesen. Es kann gezeigt werden, dass durch HO-1-Induktion die epitheliale Barriere gestärkt wird. Die endotheliale Barriere hingegen zeigt unter HO-1-Induktion keine Verringerung der Transmigration

Neutrophiler, weshalb die interstitielle Akkumulation Neutrophiler nicht verringert wird. Sowohl verringerter alveolärer Neutrophileninflux als auch reduzierte mikrovaskuläre Permeabilität sind assoziiert mit einer erhöhten HO-1-Aktivität. Dabei werden nach HO-1-Induktion auch geringere systemische Auswirkungen aufgrund verringerter Neutrophilenzirkulation im Blut nachgewiesen.

6. Zusammenfassung

Kennzeichnend für das Krankheitsbild ARDS ist der massenhafte Neutrophileninflux in die Lungen und die Erhöhung der pulmonal-endothelialen Permeabilität, in deren Folge es zum schweren Krankheitsbild mit pulmonalem Flüssigkeitseinstrom, verringerter pulmonaler Compliance und einer therapierefraktären Hypoxämie kommt. Entsprechend dem Stand der Wissenschaft können unkontrolliert und massenhaft migrierende neutrophile Granulozyten als auch die hohe Gewebekonzentration proinflammatorischer Zytokine für die oftmals beobachtete Exazerbation eines Inflammationsgeschehens verantwortlich gemacht werden.

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss des Enzyms HO-1 auf das Ausmaß der Neutrophilenmigration in inflammatorische Lungen zu untersuchen. Dabei wird die HO-1 mittels CoPP induziert und mittels SnPP inhibiert. Eine induzierte Enzymaktivität wirkt sich inhibitorisch auf das Inflammationsgeschehen aus: Neutrophileninflux und pulmonales Infiltrat können dementsprechend reduziert werden.

Es zeigt sich bei *in vivo*-Versuchen an der Maus, dass eine präventiv, d.h. vor Entstehung einer pulmonalen Infektion, erreichte Induktion der HO-1 einen signifikant reduzierten Neutrophileninflux in den Alveolarraum zur Folge hat. Diese Ergebnisse können durch histologische bzw. immunhistologische Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit gestützt werden.

In vitro kann gezeigt werden, dass die Transmigration Neutrophiler durch Epithel nach HO-1-Induktion signifikant reduziert wird, die durch Endothel jedoch nicht. Damit kann eine wesentliche Erkenntnis aus den *in vivo*-Versuchen gestützt werden, wonach eine HO-1-Induktion die Migration Neutrophiler in das pulmonale Interstitium nicht beeinflusst, jedoch die Migration in den Alveolarraum reduziert.

Es kann zudem nachgewiesen werden, dass die mikrovaskuläre Permeabilität in den Lungen unter HO-1-Induktion verringert wird.

Differenzialblutbildkontrollen während der Infektionsphase zeigen unter HO-1-Induktion eine verminderte Anzahl Neutrophiler im peripheren Blut und eine verminderte Linksverschiebung, was auf eine reduzierte Freisetzung neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark zurückgeführt werden kann.

Im Gegensatz zu den HO-1-induzierenden Eigenschaften des CoPP kann durch Inhibition der HO-1 mittels SnPP eine Exazerbation der pulmonalen Inflammation erreicht werden: Der Neutrophileninflux in den Alveolarraum steigt signifikant an, ebenso wie die pulmonalvaskuläre Permeabilität. Immunhistologische Untersuchungen zeigen ebenfalls eine verstärkte Neutrophilenakkumulation im Parenchym. Im peripheren Blut finden sich nach kurzer Zeit hohe Neutrophilenkonzentrationen und in der BAL steigt die Konzentration proinflammatorischer Zytokine an.

Versuche mit einer kombinierten Vorbehandlung mit CoPP und SnPP zeigen ebenfalls exazerbierte Verläufe, welche sich nicht wesentlich von den Ergebnissen mit SnPP-behandelten Tieren unterscheiden. Es kann festgestellt werden, dass die inhibitorischen Eigenschaften des SnPP schwerer wiegen als die induzierenden Eigenschaften des CoPP.

Der zukünftige humanmedizinische Einsatz HO-1-induzierender Substanzen, sei es bei drohender pulmonaler Inflammation im Rahmen einer Prävention oder als Intervention bei bereits eingetretenem inflammatorisch bedingtem Lungenversagen, sollte ein Ansatzpunkt für weitere Experimente sein, vor allem vor dem Hintergrund nach wie vor fehlender pharmakologischer Möglichkeiten. Eine protektive Wirkung im Tiermodell durch vermehrte HO-1-Aktivität kann in dieser Arbeit nachgewiesen werden, insbesondere durch einen verringerten Neutrophileninflux in den intraalveolären Raum und ein reduziertes pulmonales Infiltrat.

Limitierend für den Einsatz des CoPP am Menschen sind dessen zytotoxische Eigenschaften. Dies sollte Anlass für weitere Tierversuche und *in vitro*-Versuche an humanen Zellen sein.

Zudem sollte die Enzyminduktion pharmakologisch gut steuerbar und vorhersehbar sein, da eine exzessiv induzierte HO-1 und damit hohe Eisen-Spiegel als auch hohe Bilirubinspiegel schädlich sein können. Außerdem ist der Hämabbau ein sehr energieintensiver Vorgang.

Vor dem Hintergrund dieser noch limitierenden Eigenschaften der Metalloporphyrine sollte der Einsatz des HO-1-induzierenden Hämins weiterverfolgt werden. Zu Hämin liegen deutlich mehr pharmakologische und toxikologische Erkenntnisse zur Anwendung am Menschen vor. Hämin wird bereits klinisch beispielsweise zur Behandlung der akuten intermittierenden Porphyrrie angewendet (Normosang[®]). Weitere Untersuchungen zur Bedeutung von Hämin sind erforderlich, um ein eventuelles therapeutisches Potenzial zu evaluieren.

7. Literaturverzeichnis

1. Linko R, Okkonen M, Pettila V *et al.* Acute respiratory failure in intensive care units. FINNALI: a prospective cohort study. *Intensive Care Med.* 2009; **35**: 1352-61.
2. Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E *et al.* Incidence and outcomes of acute lung injury. *N.Engl.J.Med.* 2005; **353**: 1685-93.
3. Zambon M, Vincent JL. Mortality rates for patients with acute lung injury/ARDS have decreased over time. *Chest* 2008; **133**: 1120-7.
4. Esteban A, Fernandez-Segoviano P, Frutos-Vivar F *et al.* Comparison of clinical criteria for the acute respiratory distress syndrome with autopsy findings. *Ann.Intern.Med.* 2004; **141**: 440-5.
5. Linko R, Suojaranta-Ylinen R, Karlsson S, Ruokonen E, Varpula T, Pettila V. One-year mortality, quality of life and predicted life-time cost-utility in critically ill patients with acute respiratory failure. *Crit Care* 2010; **14**: R60.
6. Li G, Malinchoc M, Cartin-Ceba R *et al.* Eight-year trend of acute respiratory distress syndrome: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2011; **183**: 59-66.
7. Ferguson ND, Frutos-Vivar F, Esteban A *et al.* Clinical risk conditions for acute lung injury in the intensive care unit and hospital ward: a prospective observational study. *Crit Care* 2007; **11**: R96.
8. Levitt JE, Gould MK, Ware LB, Matthay MA. The pathogenetic and prognostic value of biologic markers in acute lung injury. *J.Intensive Care Med.* 2009; **24**: 151-67.
9. Slutsky AS. Consensus conference on mechanical ventilation--January 28-30, 1993 at Northbrook, Illinois, USA. Part 2. *Intensive Care Med.* 1994; **20**: 150-62.
10. Slutsky AS. Consensus conference on mechanical ventilation--January 28-30, 1993 at Northbrook, Illinois, USA. Part I. European Society of Intensive Care Medicine, the ACCP and the SCCM. *Intensive Care Med.* 1994; **20**: 64-79.
11. DIVI-Leitlinie Akutes Lungenversagen. 1997. Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin e.V.
12. de HQ, Rimmelink M, Brimiouille S, Salmon I, Vincent JL. ARDS: a clinicopathological confrontation. *Chest* 2009; **135**: 944-9.
13. Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome. *J.Clin.Invest* 2012; **122**: 2731-40.
14. Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT *et al.* Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA* 2012; **307**: 2526-33.

15. Neue Definition des akuten Lungenversagens. Deutsches Ärzteblatt 109, 1736. 3-9-2012. Deutsches Ärzteblatt.
16. Burchardi H. [Acute lung failure--a critical analysis]. *Langenbecks Arch.Chir* 1987; **372**: 53-8.
17. Hudson LD, Steinberg KP. Epidemiology of acute lung injury and ARDS. *Chest* 1999; **116**: 74S-82S.
18. Wheeler AP, Bernard GR. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review. *Lancet* 2007; **369**: 1553-64.
19. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967; **2**: 319-23.
20. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N.Engl.J.Med.* 2000; **342**: 1334-49.
21. Frutos-Vivar F, Nin N, Esteban A. Epidemiology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Curr.Opin.Crit Care* 2004; **10**: 1-6.
22. Iribarren C, Jacobs DR, Jr., Sidney S, Gross MD, Eisner MD. Cigarette smoking, alcohol consumption, and risk of ARDS: a 15-year cohort study in a managed care setting. *Chest* 2000; **117**: 163-8.
23. Thakur L, Kojicic M, Thakur SJ *et al.* Alcohol consumption and development of acute respiratory distress syndrome: a population-based study. *Int.J. Environ. Res. Public Health* 2009; **6**: 2426-35.
24. Boe DM, Vandivier RW, Burnham EL, Moss M. Alcohol abuse and pulmonary disease. *J.Leukoc.Biol.* 2009; **86**: 1097-104.
25. O'Mahony DS, Glavan BJ, Holden TD *et al.* Inflammation and immune-related candidate gene associations with acute lung injury susceptibility and severity: a validation study. *PLoS.One.* 2012; **7**: e51104.
26. Steinberg KP, Milberg JA, Martin TR, Maunder RJ, Cockrill BA, Hudson LD. Evolution of bronchoalveolar cell populations in the adult respiratory distress syndrome. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 1994; **150**: 113-22.
27. Towfigh S, Peralta MV, Martin MJ *et al.* Acute respiratory distress syndrome in nontrauma surgical patients: a 6-year study. *J.Trauma* 2009; **67**: 1239-43.
28. Gattinoni L, Pesenti A, Bombino M *et al.* Relationships between lung computed tomographic density, gas exchange, and PEEP in acute respiratory failure. *Anesthesiology* 1988; **69**: 824-32.
29. Paine A, Eiz-Vesper B, Blasczyk R, Immenschuh S. Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential. *Biochem.Pharmacol.* 2010; **80**: 1895-903.
30. Murphy M, Travers P, and Walport M. Janeway - Immunbiologie. 17-9-2009. Spektrum Akademischer Verlag.

31. Grommes J, Soehnlein O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Mol.Med.* 2011; **17**: 293-307.
32. Seki H, Tasaka S, Fukunaga K *et al.* Effect of Toll-like receptor 4 inhibitor on LPS-induced lung injury. *Inflamm.Res.* 2010; **59**: 837-45.
33. Chen C, Zhang F, Zhang Z, Peng M, Wang Y, Chen Y. TLR4 signaling-induced heme oxygenase upregulation in the acute lung injury: role in hemorrhagic shock and two-hit induced lung inflammation. *Mol.Biol.Rep.* 2013; **40**: 1167-72.
34. Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J.Clin.Invest* 1987; **79**: 319-26.
35. Drost EM, MacNee W. Potential role of IL-8, platelet-activating factor and TNF-alpha in the sequestration of neutrophils in the lung: effects on neutrophil deformability, adhesion receptor expression, and chemotaxis. *Eur.J.Immunol.* 2002; **32**: 393-403.
36. Olson TS, Ley K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 2002; **283**: R7-28.
37. Schmal H, Shanley TP, Jones ML, Friedl HP, Ward PA. Role for macrophage inflammatory protein-2 in lipopolysaccharide-induced lung injury in rats. *J.Immunol.* 1996; **156**: 1963-72.
38. Wengner AM, Pitchford SC, Furze RC, Rankin SM. The coordinated action of G-CSF and ELR + CXC chemokines in neutrophil mobilization during acute inflammation. *Blood* 2008; **111**: 42-9.
39. Zhang P, Quinton LJ, Gamble L, Bagby GJ, Summer WR, Nelson S. The granulopoietic cytokine response and enhancement of granulopoiesis in mice during endotoxemia. *Shock* 2005; **23**: 344-52.
40. Zhang P, Bagby GJ, Kolls JK *et al.* The effects of granulocyte colony-stimulating factor and neutrophil recruitment on the pulmonary chemokine response to intratracheal endotoxin. *J.Immunol.* 2001; **166**: 458-65.
41. Choi JC, Jung JW, Kwak HW *et al.* Granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) augments acute lung injury via its neutrophil priming effects. *J.Korean Med.Sci.* 2008; **23**: 288-95.
42. Arnardottir HH, Freysdottir J, Hardardottir I. Two circulating neutrophil populations in acute inflammation in mice. *Inflamm.Res.* 2012.
43. Murphy M, Travers P, Walport M. *Janeway - Immunbiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 2009.
44. Mestas J, Hughes CC. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J.Immunol.* 2004; **172**: 2731-8.
45. Day RB, Link DC. Regulation of neutrophil trafficking from the bone marrow. *Cell Mol.Life Sci.* 2012; **69**: 1415-23.
46. Li JL, Ng LG. Peeking into the secret life of neutrophils. *Immunol.Res.* 2012.

47. Semerad CL, Liu F, Gregory AD, Stumpf K, Link DC. G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity*. 2002; **17**: 413-23.
48. Furze RC, Rankin SM. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology* 2008; **125**: 281-8.
49. Swamydas M, Lionakis MS. Isolation, purification and labeling of mouse bone marrow neutrophils for functional studies and adoptive transfer experiments. *J.Vis.Exp.* 2013; e50586.
50. Pillay J, den B, I, Vrisekoop N *et al.* In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 2010; **116**: 625-7.
51. von VS, Ley K. Homeostatic regulation of blood neutrophil counts. *J.Immunol.* 2008; **181**: 5183-8.
52. Lieschke GJ, Grail D, Hodgson G *et al.* Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood* 1994; **84**: 1737-46.
53. Noursadeghi M, Bickerstaff MC, Herbert J, Moyes D, Cohen J, Pepys MB. Production of granulocyte colony-stimulating factor in the nonspecific acute phase response enhances host resistance to bacterial infection. *J.Immunol.* 2002; **169**: 913-9.
54. Shahbazian LM, Quinton LJ, Bagby GJ, Nelson S, Wang G, Zhang P. Escherichia coli pneumonia enhances granulopoiesis and the mobilization of myeloid progenitor cells into the systemic circulation. *Crit Care Med.* 2004; **32**: 1740-6.
55. Freitas A, Alves-Filho JC, Trevelin SC *et al.* Divergent role of heme oxygenase inhibition in the pathogenesis of sepsis. *Shock* 2011; **35**: 550-9.
56. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat.Rev.Immunol.* 2007; **7**: 678-89.
57. Doerschuk CM. Leukocyte trafficking in alveoli and airway passages. *Respir.Res.* 2000; **1**: 136-40.
58. Erzurum SC, Downey GP, Doherty DE, Schwab B, III, Elson EL, Worthen GS. Mechanisms of lipopolysaccharide-induced neutrophil retention. Relative contributions of adhesive and cellular mechanical properties. *J.Immunol.* 1992; **149**: 154-62.
59. Reutershan J, Ley K. Bench-to-bedside review: acute respiratory distress syndrome - how neutrophils migrate into the lung. *Crit Care* 2004; **8**: 453-61.
60. Saito H, Lai J, Rogers R, Doerschuk CM. Mechanical properties of rat bone marrow and circulating neutrophils and their responses to inflammatory mediators. *Blood* 2002; **99**: 2207-13.

61. Wang Q, Doerschuk CM. The signaling pathways induced by neutrophil-endothelial cell adhesion. *Antioxid.Redox.Signal.* 2002; **4**: 39-47.
62. Middleton J, Neil S, Wintle J *et al.* Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell* 1997; **91**: 385-95.
63. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat.Rev.Immunol.* 2013; **13**: 159-75.
64. Frenette PS, Mayadas TN, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins. *Cell* 1996; **84**: 563-74.
65. Sreeramkumar V, Leiva M, Stadtmann A *et al.* Coordinated and unique functions of the E-selectin ligand ESL-1 during inflammatory and hematopoietic recruitment in mice. *Blood* 2013; **122**: 3993-4001.
66. Zhang J, Alcaide P, Liu L *et al.* Regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by mast cells, macrophages, and neutrophils. *PLoS.One.* 2011; **6**: e14525.
67. Moss M, Gillespie MK, Ackerson L, Moore FA, Moore EE, Parsons PE. Endothelial cell activity varies in patients at risk for the adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 1996; **24**: 1782-6.
68. Ware LB, Eisner MD, Thompson BT, Parsons PE, Matthay MA. Significance of von Willebrand factor in septic and nonseptic patients with acute lung injury. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2004; **170**: 766-72.
69. Van ES, Miyagashima R, Haley L, Hogg JC. L-selectin expression increases on peripheral blood polymorphonuclear leukocytes during active marrow release. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 1995; **151**: 500-7.
70. Kurdowska A, Noble JM, Grant IS, Robertson CR, Haslett C, Donnelly SC. Anti-interleukin-8 autoantibodies in patients at risk for acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 2002; **30**: 2335-7.
71. Reutershan J, Basit A, Galkina EV, Ley K. Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2005; **289**: L807-L815.
72. DiStasi MR, Ley K. Opening the flood-gates: how neutrophil-endothelial interactions regulate permeability. *Trends Immunol.* 2009; **30**: 547-56.
73. Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev.* 2006; **86**: 279-367.
74. Vandenbroucke E, Mehta D, Minshall R, Malik AB. Regulation of endothelial junctional permeability. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2008; **1123**: 134-45.
75. Dejana E, Tournier-Lasserre E, Weinstein BM. The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Dev.Cell* 2009; **16**: 209-21.

76. Vestweber D, Winderlich M, Cagna G, Nottebaum AF. Cell adhesion dynamics at endothelial junctions: VE-cadherin as a major player. *Trends Cell Biol.* 2009; **19**: 8-15.
77. Boueiz A, Hassoun PM. Regulation of endothelial barrier function by reactive oxygen and nitrogen species. *Microvasc.Res.* 2009; **77**: 26-34.
78. Lindbom L. Regulation of vascular permeability by neutrophils in acute inflammation. *Chem.Immunol.Allergy* 2003; **83**: 146-66.
79. Hermant B, Bibert S, Concord E *et al.* Identification of proteases involved in the proteolysis of vascular endothelium cadherin during neutrophil transmigration. *J.Biol.Chem.* 2003; **278**: 14002-12.
80. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 1997; **89**: 3503-21.
81. Broermann A, Winderlich M, Block H *et al.* Dissociation of VE-PTP from VE-cadherin is required for leukocyte extravasation and for VEGF-induced vascular permeability in vivo. *J.Exp.Med.* 2011; **208**: 2393-401.
82. Corada M, Mariotti M, Thurston G *et al.* Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999; **96**: 9815-20.
83. Wang L, Taneja R, Wang W *et al.* Human alveolar epithelial cells attenuate pulmonary microvascular endothelial cell permeability under septic conditions. *PLoS.One.* 2013; **8**: e55311.
84. Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res.* 1997; **57**: 1835-40.
85. Aggarwal A, Baker CS, Evans TW, Haslam PL. G-CSF and IL-8 but not GM-CSF correlate with severity of pulmonary neutrophilia in acute respiratory distress syndrome. *Eur.Respir.J.* 2000; **15**: 895-901.
86. Goodman ER, Stricker P, Velavicius M *et al.* Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and its receptor in the genesis of acute respiratory distress syndrome through an effect on neutrophil apoptosis. *Arch.Surg.* 1999; **134**: 1049-54.
87. Furze RC, Rankin SM. The role of the bone marrow in neutrophil clearance under homeostatic conditions in the mouse. *FASEB J.* 2008; **22**: 3111-9.
88. Shafeeq H, Lat I. Pharmacotherapy for Acute Respiratory Distress Syndrome. *Pharmacotherapy* 2012.
89. Buleson BS, Maki ED. Acute Respiratory Distress Syndrome. *Journal of Pharmacy Practice* 2005; **18**: 118-1131.
90. Needham DM, Colantuoni E, Mendez-Tellez PA *et al.* Lung protective mechanical ventilation and two year survival in patients with acute lung injury: prospective cohort study. *BMJ* 2012; **344**: e2124.

91. Bein T, Weber-Carstens S, Goldmann A *et al.* Lower tidal volume strategy (approximately 3 ml/kg) combined with extracorporeal CO₂ removal versus 'conventional' protective ventilation (6 ml/kg) in severe ARDS : The prospective randomized Xtravent-study. *Intensive Care Med.* 2013.
92. Young D, Lamb SE, Shah S *et al.* High-frequency oscillation for acute respiratory distress syndrome. *N.Engl.J.Med.* 2013; **368**: 806-13.
93. Ferguson ND, Cook DJ, Guyatt GH *et al.* High-frequency oscillation in early acute respiratory distress syndrome. *N.Engl.J.Med.* 2013; **368**: 795-805.
94. Wolf S, Hohne C, Busch T, Lohbrunner H, Weber-Carstens S, Kaisers U. [At Which Level is the PEEP Adequate in ARDS?]. *Anesthesiol.Intensivmed.Notfallmed.Schmerzther.* 2005; **40**: 597-601.
95. Briel M, Meade M, Mercat A *et al.* Higher vs lower positive end-expiratory pressure in patients with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2010; **303**: 865-73.
96. AWMF-Leitlinie Lagerungstherapie zur Prophylaxe oder Therapie von pulmonalen Funktionsstörungen. 1-17. 1-11-2007. AWMF - Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
97. Gattinoni L, Tognoni G, Pesenti A *et al.* Effect of prone positioning on the survival of patients with acute respiratory failure. *N.Engl.J.Med.* 2001; **345**: 568-73.
98. Pelosi P, Brazzi L, Gattinoni L. Prone position in acute respiratory distress syndrome. *Eur.Respir.J.* 2002; **20**: 1017-28.
99. Reutershan J, Schmitt A, Dietz K, Unertl K, Fretschner R. Alveolar recruitment during prone position: time matters. *Clin.Sci.(Lond)* 2006; **110**: 655-63.
100. Guerin C, Reignier J, Richard JC *et al.* Prone positioning in severe acute respiratory distress syndrome. *N.Engl.J.Med.* 2013; **368**: 2159-68.
101. Peek GJ, Mugford M, Tiruvoipati R *et al.* Efficacy and economic assessment of conventional ventilatory support versus extracorporeal membrane oxygenation for severe adult respiratory failure (CESAR): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2009; **374**: 1351-63.
102. Cepkova M, Matthay MA. Pharmacotherapy of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *J.Intensive Care Med.* 2006; **21**: 119-43.
103. Frank AJ, Thompson BT. Pharmacological treatments for acute respiratory distress syndrome. *Curr.Opin.Crit Care* 2010; **16**: 62-8.
104. Agarwal R, Nath A, Aggarwal AN, Gupta D. Do glucocorticoids decrease mortality in acute respiratory distress syndrome? A meta-analysis. *Respirology.* 2007; **12**: 585-90.
105. Meduri GU, Marik PE, Chrousos GP *et al.* Steroid treatment in ARDS: a critical appraisal of the ARDS network trial and the recent literature. *Intensive Care Med.* 2008; **34**: 61-9.

106. Peter JV, John P, Graham PL, Moran JL, George IA, Bersten A. Corticosteroids in the prevention and treatment of acute respiratory distress syndrome (ARDS) in adults: meta-analysis. *BMJ* 2008; **336**: 1006-9.
107. Lavrovsky Y, Drummond GS, Abraham NG. Downregulation of the human heme oxygenase gene by glucocorticoids and identification of 56b regulatory elements. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1996; **218**: 759-65.
108. Forel JM, Roch A, Marin V *et al.* Neuromuscular blocking agents decrease inflammatory response in patients presenting with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 2006; **34**: 2749-57.
109. Forel JM, Roch A, Papazian L. Paralytics in critical care: not always the bad guy. *Curr.Opin.Crit Care* 2009; **15**: 59-66.
110. Papazian L, Forel JM, Gacouin A *et al.* Neuromuscular blockers in early acute respiratory distress syndrome. *N.Engl.J.Med.* 2010; **363**: 1107-16.
111. Hashimoto S, Okayama Y, Shime N *et al.* Neutrophil elastase activity in acute lung injury and respiratory distress syndrome. *Respirology.* 2008; **13**: 581-4.
112. Iwata K, Doi A, Ohji G *et al.* Effect of neutrophil elastase inhibitor (sivelestat sodium) in the treatment of acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS): a systematic review and meta-analysis. *Intern.Med.* 2010; **49**: 2423-32.
113. Taut FJ, Rippin G, Schenk P *et al.* A Search for subgroups of patients with ARDS who may benefit from surfactant replacement therapy: a pooled analysis of five studies with recombinant surfactant protein-C surfactant (Venticute). *Chest* 2008; **134**: 724-32.
114. Spragg RG, Lewis JF, Wurst W *et al.* Treatment of acute respiratory distress syndrome with recombinant surfactant protein C surfactant. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2003; **167**: 1562-6.
115. Hall SR, Tsoyi K, Ith B *et al.* Mesenchymal stromal cells improve survival during sepsis in the absence of heme oxygenase-1: the importance of neutrophils. *Stem Cells* 2013; **31**: 397-407.
116. Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS *et al.* Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat.Med.* 2009; **15**: 42-9.
117. Busch T, Bercker S, Laudi S, Donaubaue B, Petersen B, Kaisers U. [Inhaled nitric oxide for rescue treatment of refractory hypoxemia in ARDS patients]. *Anesthesiol.Intensivmed.Notfallmed.Schmerzther.* 2008; **43**: 778-83.
118. Ryter SW, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from metabolism to molecular therapy. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 2009; **41**: 251-60.
119. Constantin M, Choi AJ, Cloonan SM, Ryter SW. Therapeutic potential of heme oxygenase-1/carbon monoxide in lung disease. *Int.J.Hypertens.* 2012; **2012**: 859235.

120. Abraham NG, Kappas A. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol.Rev.* 2008; **60**: 79-127.
121. Morse D, Choi AM. Heme oxygenase-1: from bench to bedside. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2005; **172**: 660-70.
122. Morse D, Lin L, Choi AM, Ryter SW. Heme oxygenase-1, a critical arbitrator of cell death pathways in lung injury and disease. *Free Radic.Biol.Med.* 2009; **47**: 1-12.
123. Wagener FA, Volk HD, Willis D *et al.* Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol.Rev.* 2003; **55**: 551-71.
124. Abraham NG, Lin JH, Schwartzman ML, Levere RD, Shibahara S. The physiological significance of heme oxygenase. *Int.J.Biochem.* 1988; **20**: 543-58.
125. Gemsa D, Woo CH, Fudenberg HH, Schmid R. Stimulation of heme oxygenase in macrophages and liver by endotoxin. *J.Clin.Invest* 1974; **53**: 647-51.
126. Gong Q, Yin H, Fang M *et al.* Heme oxygenase-1 upregulation significantly inhibits TNF-alpha and Hmgb1 releasing and attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Int.Immunopharmacol.* 2008; **8**: 792-8.
127. Jordi-Racine AL, Alvarez E, Reichen J. The effect of hypoxia on hepatic cytochromes and heme turnover in rats in vivo. *Experientia* 1988; **44**: 343-5.
128. Keyse SM, Tyrrell RM. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1989; **86**: 99-103.
129. Koizumi T, Negishi M, Ichikawa A. Induction of heme oxygenase by delta 12-prostaglandin J2 in porcine aortic endothelial cells. *Prostaglandins* 1992; **43**: 121-31.
130. Lee PJ, Alam J, Sylvester SL, Inamdar N, Otterbein L, Choi AM. Regulation of heme oxygenase-1 expression in vivo and in vitro in hyperoxic lung injury. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1996; **14**: 556-68.
131. Maines MD, Kappas A. Cobalt induction of hepatic heme oxygenase; with evidence that cytochrome P-450 is not essential for this enzyme activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1974; **71**: 4293-7.
132. Sardana MK, Kappas A. Dual control mechanism for heme oxygenase: tin(IV)-protoporphyrin potently inhibits enzyme activity while markedly increasing content of enzyme protein in liver. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1987; **84**: 2464-8.
133. Zijlstra GS, Brandsma CA, Harpe MF *et al.* Dry powder inhalation of hemin to induce heme oxygenase expression in the lung. *Eur.J.Pharm.Biopharm.* 2007; **67**: 667-75.
134. Oshiro S, Takeuchi H, Matsumoto M, Kurata S. Transcriptional activation of heme oxygenase-1 gene in mouse spleen, liver and kidney cells after treatment with lipopolysaccharide or hemoglobin. *Cell Biol.Int.* 1999; **23**: 465-74.

135. Donnelly LE, Barnes PJ. Expression of heme oxygenase in human airway epithelial cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 2001; **24**: 295-303.
136. Mumby S, Upton RL, Chen Y *et al.* Lung heme oxygenase-1 is elevated in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 2004; **32**: 1130-5.
137. Tracz MJ, Juncos JP, Grande JP *et al.* Renal hemodynamic, inflammatory, and apoptotic responses to lipopolysaccharide in HO-1^{-/-} mice. *Am.J.Pathol.* 2007; **170**: 1820-30.
138. Wiesel P, Patel AP, DiFonzo N *et al.* Endotoxin-induced mortality is related to increased oxidative stress and end-organ dysfunction, not refractory hypotension, in heme oxygenase-1-deficient mice. *Circulation* 2000; **102**: 3015-22.
139. Ryter SW, Kim HP, Nakahira K, Zuckerbraun BS, Morse D, Choi AM. Protective functions of heme oxygenase-1 and carbon monoxide in the respiratory system. *Antioxid.Redox.Signal.* 2007; **9**: 2157-73.
140. Bauer M, Huse K, Settmacher U, Claus RA. The heme oxygenase-carbon monoxide system: regulation and role in stress response and organ failure. *Intensive Care Med.* 2008; **34**: 640-8.
141. Ryter SW, Morse D, Choi AM. Carbon monoxide and bilirubin: potential therapies for pulmonary/vascular injury and disease. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 2007; **36**: 175-82.
142. Takaki S, Takeyama N, Kajita Y *et al.* Beneficial effects of the heme oxygenase-1/carbon monoxide system in patients with severe sepsis/septic shock. *Intensive Care Med.* 2010; **36**: 42-8.
143. Zegdi R, Perrin D, Burdin M, Boiteau R, Tenailon A. Increased endogenous carbon monoxide production in severe sepsis. *Intensive Care Med.* 2002; **28**: 793-6.
144. Melley DD, Finney SJ, Elia A, Lagan AL, Quinlan GJ, Evans TW. Arterial carboxyhemoglobin level and outcome in critically ill patients. *Crit Care Med.* 2007; **35**: 1882-7.
145. Sarady JK, Zuckerbraun BS, Bilban M *et al.* Carbon monoxide protection against endotoxic shock involves reciprocal effects on iNOS in the lung and liver. *FASEB J.* 2004; **18**: 854-6.
146. Urquhart P, Rosignoli G, Cooper D, Motterlini R, Perretti M. Carbon monoxide-releasing molecules modulate leukocyte-endothelial interactions under flow. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2007; **321**: 656-62.
147. Otterbein LE, Bach FH, Alam J *et al.* Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat.Med.* 2000; **6**: 422-8.
148. Cepinskas G, Katada K, Bihari A, Potter RF. Carbon monoxide liberated from carbon monoxide-releasing molecule CORM-2 attenuates inflammation in the liver of septic mice. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 2008; **294**: G184-G191.

149. Hasegawa U, van der Vlies AJ, Simeoni E, Wandrey C, Hubbell JA. Carbon monoxide-releasing micelles for immunotherapy. *J.Am.Chem.Soc.* 2010; **132**: 18273-80.
150. Mizuguchi S, Stephen J, Bihari R *et al.* CORM-3-derived CO modulates polymorphonuclear leukocyte migration across the vascular endothelium by reducing levels of cell surface-bound elastase. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2009; **297**: H920-H929.
151. Sawle P, Foresti R, Mann BE, Johnson TR, Green CJ, Motterlini R. Carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs) attenuate the inflammatory response elicited by lipopolysaccharide in RAW264.7 murine macrophages. *Br.J.Pharmacol.* 2005; **145**: 800-10.
152. Sun B, Sun H, Liu C, Shen J, Chen Z, Chen X. Role of CO-releasing molecules liberated CO in attenuating leukocytes sequestration and inflammatory responses in the lung of thermally injured mice. *J.Surg.Res.* 2007; **139**: 128-35.
153. Sun B, Zou X, Chen Y, Zhang P, Shi G. Preconditioning of carbon monoxide releasing molecule-derived CO attenuates LPS-induced activation of HUVEC. *Int.J.Biol.Sci.* 2008; **4**: 270-8.
154. Brouard S, Otterbein LE, Anrather J *et al.* Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J.Exp.Med.* 2000; **192**: 1015-26.
155. Petrache I, Otterbein LE, Alam J, Wiegand GW, Choi AM. Heme oxygenase-1 inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in cultured fibroblasts. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2000; **278**: L312-L319.
156. Fredenburgh LE, Baron RM, Carvajal IM *et al.* Absence of heme oxygenase-1 expression in the lung parenchyma exacerbates endotoxin-induced acute lung injury and decreases surfactant protein-B levels. *Cell Mol.Biol.(Noisy.-le-grand)* 2005; **51**: 513-20.
157. Morse D, Pischke SE, Zhou Z *et al.* Suppression of inflammatory cytokine production by carbon monoxide involves the JNK pathway and AP-1. *J.Biol.Chem.* 2003; **278**: 36993-8.
158. Sarady JK, Otterbein SL, Liu F, Otterbein LE, Choi AM. Carbon monoxide modulates endotoxin-induced production of granulocyte macrophage colony-stimulating factor in macrophages. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 2002; **27**: 739-45.
159. Zhou Z, Song R, Fattman CL *et al.* Carbon monoxide suppresses bleomycin-induced lung fibrosis. *Am.J.Pathol.* 2005; **166**: 27-37.
160. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 1987; **235**: 1043-6.
161. Sarady-Andrews JK, Liu F, Gallo D *et al.* Biliverdin administration protects against endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2005; **289**: L1131-L1137.

162. Banks JG, Foulis AK, Ledingham IM, Macsween RN. Liver function in septic shock. *J.Clin.Pathol.* 1982; **35**: 1249-52.
163. Soares MP, Marguti I, Cunha A, Larsen R. Immunoregulatory effects of HO-1: how does it work? *Curr.Opin.Pharmacol.* 2009; **9**: 482-9.
164. Ghio AJ, Stonehuerner JG, Dailey LA *et al.* Carbon monoxide reversibly alters iron homeostasis and respiratory epithelial cell function. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 2008; **38**: 715-23.
165. Suttner DM, Dennery PA. Reversal of HO-1 related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron. *FASEB J.* 1999; **13**: 1800-9.
166. Scott JR, Chin BY, Bilban MH, Otterbein LE. Restoring HOmeostasis: is heme oxygenase-1 ready for the clinic? *Trends Pharmacol.Sci.* 2007; **28**: 200-5.
167. Maines MD. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J.* 1988; **2**: 2557-68.
168. Camhi SL, Alam J, Otterbein L, Sylvester SL, Choi AM. Induction of heme oxygenase-1 gene expression by lipopolysaccharide is mediated by AP-1 activation. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1995; **13**: 387-98.
169. Morse D, Choi AM. Heme oxygenase-1: the "emerging molecule" has arrived. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 2002; **27**: 8-16.
170. Kurata S, Matsumoto M, Nakajima H. Transcriptional control of the heme oxygenase gene in mouse M1 cells during their TPA-induced differentiation into macrophages. *J.Cell Biochem.* 1996; **62**: 314-24.
171. Kurata S, Matsumoto M, Tsuji Y, Nakajima H. Lipopolysaccharide activates transcription of the heme oxygenase gene in mouse M1 cells through oxidative activation of nuclear factor kappa B. *Eur.J.Biochem.* 1996; **239**: 566-71.
172. Alam J, Cai J, Smith A. Isolation and characterization of the mouse heme oxygenase-1 gene. Distal 5' sequences are required for induction by heme or heavy metals. *J.Biol.Chem.* 1994; **269**: 1001-9.
173. Alam J, Camhi S, Choi AM. Identification of a second region upstream of the mouse heme oxygenase-1 gene that functions as a basal level and inducer-dependent transcription enhancer. *J.Biol.Chem.* 1995; **270**: 11977-84.
174. Camhi SL, Alam J, Wiegand GW, Chin BY, Choi AM. Transcriptional activation of the HO-1 gene by lipopolysaccharide is mediated by 5' distal enhancers: role of reactive oxygen intermediates and AP-1. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1998; **18**: 226-34.
175. Lee PJ, Jiang BH, Chin BY *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J.Biol.Chem.* 1997; **272**: 5375-81.
176. Shan Y, Lambrecht RW, Donohue SE, Bonkovsky HL. Role of Bach1 and Nrf2 in up-regulation of the heme oxygenase-1 gene by cobalt protoporphyrin. *FASEB J.* 2006; **20**: 2651-3.

177. Slebos, D. J., Ryter, S. W., and Choi, A. M. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in pulmonary medicine. *Respir.Res.* 4, 7. 2003.
178. Woo J, Iyer S, Mori N, Buelow R. Alleviation of graft-versus-host disease after conditioning with cobalt-protoporphyrin, an inducer of heme oxygenase-1. *Transplantation* 2000; **69**: 623-33.
179. Inoue S, Suzuki M, Nagashima Y *et al.* Transfer of heme oxygenase 1 cDNA by a replication-deficient adenovirus enhances interleukin 10 production from alveolar macrophages that attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Hum.Gene Ther.* 2001; **12**: 967-79.
180. Ngamsri KC, Wagner R, Vollmer I, Stark S, Reutershan J. Adenosine receptor A1 regulates polymorphonuclear cell trafficking and microvascular permeability in lipopolysaccharide-induced lung injury. *J.Immunol.* 2010; **185**: 4374-84.
181. Mayer H. Analysis of Lipopolysaccharides of Gram-Negative bacteria. *Methods in Microbiology* 1985; **18**: 157-207.
182. Scholtes, M. Einfluss der induzierbaren Hämoxygenase (HO-1) auf die Mikrozirkulation bei der Postischämie-Pankreatitis. 2006. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Universität Freiburg.
183. Scheingraber S, Messner S, Matt S *et al.* Metalloporphyrins, used for HO-1 inhibition, themselves affect hepatic microcirculation, liver function, and hepatocellular integrity. *Microcirculation.* 2009; **16**: 355-63.
184. Lindner V, Heinle H. Binding properties of circulating Evans blue in rabbits as determined by disc electrophoresis. *Atherosclerosis* 1982; **43**: 417-22.
185. LeVeen HH, Fishman WH. Combination of Evans blue with plasma protein; its significance in capillary permeability studies, blood dye disappearance curves, and its use as a protein tag. *Am.J.Physiol* 1947; **151**: 26-33.
186. Rawson R.A. The Binding of T-1824 and Structurally Related Diazo Dyes by the Plasma Proteins. *Am.J.Physiol.* 1942; **138**: 708-18.
187. Stoelinga GB, van Munster PJ. The behaviour of Evans blue (azo-dye T-1824) in the body after intravenous injection. *Acta Physiol Pharmacol.Neerl.* 1967; **14**: 391-409.
188. Linderkamp O, Mader T, Butenandt O, Riegel KP. Plasma volume estimation in severely ill infants and children using a simplified Evans blue method. *Eur.J.Pediatr.* 1977; **125**: 135-41.
189. Sack, U, Tánok, A, and Rothe, G. Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. Basel, Karger, 27-70. 2007.
190. Ryter SW, Alam J, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev.* 2006; **86**: 583-650.
191. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal.Biochem.* 1985; **150**: 76-85.

192. Proteinbestimmung. 1999. Spektrum Akademischer Verlag. 21-4-2014.
193. Konrad FM, Braun S, Ngamsri KC, Vollmer I, Reutershan J. Heme oxygenase-1 attenuates acute pulmonary inflammation by decreasing the release of segmented neutrophils from the bone marrow. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2014; **307**: L707-L717.
194. Abraham E. Neutrophils and acute lung injury. *Crit Care Med.* 2003; **31**: S195-S199.
195. Andonegui G, Bonder CS, Green F *et al.* Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs. *J.Clin.Invest* 2003; **111**: 1011-20.
196. Baughman RP, Gunther KL, Rashkin MC, Keeton DA, Pattishall EN. Changes in the inflammatory response of the lung during acute respiratory distress syndrome: prognostic indicators. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 1996; **154**: 76-81.
197. Konrad FM, Witte E, Vollmer I, Stark S, Reutershan J. Adenosine receptor A2b on hematopoietic cells mediates LPS-induced migration of PMNs into the lung interstitium. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2012; **303**: L425-L438.
198. Wagner R, Ngamsri KC, Stark S, Vollmer I, Reutershan J. Adenosine receptor A3 is a critical mediator in LPS-induced pulmonary inflammation. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2010; **299**: L502-L512.
199. Yin H, Li X, Gong Q *et al.* Heme oxygenase-1 upregulation improves lipopolysaccharide-induced acute lung injury involving suppression of macrophage migration inhibitory factor. *Mol.Immunol.* 2010; **47**: 2443-9.
200. Freitas A, Alves-Filho JC, Secco DD *et al.* Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway down regulates neutrophil rolling, adhesion and migration in acute inflammation. *Br.J.Pharmacol.* 2006; **149**: 345-54.
201. Paxian M, Rensing H, Rickauer A *et al.* Kupffer cells and neutrophils as paracrine regulators of the heme oxygenase-1 gene in hepatocytes after hemorrhagic shock. *Shock* 2001; **15**: 438-45.
202. Hayashi S, Takamiya R, Yamaguchi T *et al.* Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. *Circ.Res.* 1999; **85**: 663-71.
203. Soares MP, Seldon MP, Gregoire IP *et al.* Heme oxygenase-1 modulates the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation. *J.Immunol.* 2004; **172**: 3553-63.
204. Goodman AI, Choudhury M, da Silva JL, Schwartzman ML, Abraham NG. Overexpression of the heme oxygenase gene in renal cell carcinoma. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 1997; **214**: 54-61.
205. Rosinski M, Yarmush ML, Berthiaume F. Quantitative dynamics of in vivo bone marrow neutrophil production and egress in response to injury and infection. *Ann.Biomed.Eng* 2004; **32**: 1108-19.

206. Suwa T, Hogg JC, English D, Van Eeden SF. Interleukin-6 induces demargination of intravascular neutrophils and shortens their transit in marrow. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2000; **279**: H2954-H2960.
207. Suwa T, Hogg JC, Klut ME, Hards J, Van Eeden SF. Interleukin-6 changes deformability of neutrophils and induces their sequestration in the lung. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2001; **163**: 970-6.
208. Chavez A, Smith M, Mehta D. New insights into the regulation of vascular permeability. *Int.Rev.Cell Mol.Biol.* 2011; **290**: 205-48.
209. Maniatis NA, Orfanos SE. The endothelium in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Curr.Opin.Crit Care* 2008; **14**: 22-30.
210. Reutershan J, Morris MA, Burcin TL *et al.* Critical role of endothelial CXCR2 in LPS-induced neutrophil migration into the lung. *J.Clin.Invest* 2006; **116**: 695-702.
211. Burdon PC, Martin C, Rankin SM. Migration across the sinusoidal endothelium regulates neutrophil mobilization in response to ELR + CXC chemokines. *Br.J.Haematol.* 2008; **142**: 100-8.
212. Burdon PC, Martin C, Rankin SM. The CXC chemokine MIP-2 stimulates neutrophil mobilization from the rat bone marrow in a CD49d-dependent manner. *Blood* 2005; **105**: 2543-8.
213. Martin C, Burdon PC, Bridger G, Gutierrez-Ramos JC, Williams TJ, Rankin SM. Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity.* 2003; **19**: 583-93.
214. Zampetaki A, Minamino T, Mitsialis SA, Kourembanas S. Effect of heme oxygenase-1 overexpression in two models of lung inflammation. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 2003; **228**: 442-6.

8. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Verlaufskurven Neutrophiler in Knochenmark (linkes Diagramm) und Serum (rechtes Diagramm) nach LPS-Applikation bei der Maus. Durchgezogene Linie: Absolute Zellzahl; punktierte Linie: prozentualer Anteil [42]. 20
- Abb. 2: Neutrophilenmigration aus dem Intravasalraum in das Gewebe [63]. 23
- Abb. 3: Zeitlicher Verlauf der Migration Neutrophiler in die Kompartimente der Lunge: Intravasalraum, Interstitium und Alveolarraum. BAL = Bronchoalveoläre Lavage, PMN = Polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt [71]. 25
- Abb. 4: Hämoxygenase und die katalysierte Reaktion 34
- Abb. 5: Zeitlicher Verlauf der HO - mRNA und des HO-Proteins in verschiedenen Organen nach LPS-Behandlung [134]. 35
- Abb. 6: Eigenschaften der Metaboliten der HO-1 39
- Abb. 7: Regulation des HO-1-Gens durch die Transkriptionsfaktoren Nrf2 und Bach1. 41
- Abb. 8: Induktion und Inhibition der HO-Aktivität. Applikation von SnPP, links; Applikation von CoPP, rechts. Δ = Enzymaktivität, \bullet = Enzymgehalt [132] 43
- Abb. 9: Vernebelungskammer zur LPS-Inhalation. 1: Vernebler; 2: Zuführschlauch; 3: Vernebelungskammer (20cmx9cm); 4: Absaugschlauch 51
- Abb. 10: Versuchskonditionen mit zeitlichen Abläufen. BAL: Bronchoalveoläre Lavage; LPS: Lipopolysaccharid; NaOH: Natronlauge; NaCl: Natriumchlorid; CoPP: Cobalt-Protoporphyrin; SnPP: Zinn-Protoporphyrin; i.p.: intraperitoneal 52
- Abb. 11: ABC-Methode. 1. Antigen; 2. Primärantikörper; 3. Sekundärantikörper; 4. Avidin; 5. Biotin; 6. Meerrettichperoxidase (HRP) 56
- Abb. 12: Objektträger mit Gewebeproben. 1: Rat-Anti-Mouse-6B.2 Alloantigen (spezifische Bindung an Neutrophile); 2: Normal rat IgG (IgG-Kontrolle, unspezifische Bindung an verschiedene Epitope); 3: kein Antikörper 57
- Abb. 13: Funktionsprinzip eines Photometers. 1: Halogenlampe; 2: Kollimatorlinse zur Herstellung eines parallelen Strahlenverlaufs; 3: Monochromator (Prisma oder Filter) zur Isolierung von Licht einer bestimmten Wellenlänge; 4: Aperturblende; 5: Probe; 6: Photodetektor; 7: Auswerte-/Anzeigeeinheit. (modifiziert aus <http://chemwiki.ucdavis.edu> [10.12.2012]) 63
- Abb. 14: Funktionsschema Durchflusszytometrie. 1: Laserlichtquellen; 2: Mikrokanalküvette; 3: FSC-Photomultiplier; 4. SSC-Photomultiplier; 5: teildurchlässige Umlenkspiegel spezifischer Wellenlängen; 6: Photomultiplier spezifischer Wellenlängen; 7: Signalwandler und Auswerteeinheit; 8: Rechner, Auswertesoftware und Visualisierung. Skizze modifiziert nach [189]. 70
- Abb. 15: Dot plot einer durchflusszytologischen Auswertung. Linkes Bild: Zellsuspension von Lungengewebe. PMN sind 7/4 positiv. Es erfolgt die Unterscheidung intravasal (Gr1-633 positiv, rechter oberer Quadrant) und interstitiell (Gr1-633 negativ, rechter unterer Quadrant). Rechtes Bild: Zellsuspension einer bronchoalveolären Lavage (BAL). Gr1-633 und 7/4 FITC positive PMNs (rechter oberer Quadrant) 73
- Abb. 16: Ablaufschema der enzymatischen Reaktion der Hämoxygenase und der Biliverdinreduktase (modifiziert aus [190]). Das entstehende Bilirubin lässt sich

photometrisch nachweisen. NADPH+H ⁺ wird bei der Negativkontrolle nicht zugegeben. Hämin wird zuletzt im Dunkeln dazu pipettiert.	75
Abb. 17 u. 18: Lichtmikroskopie Lungenparenchym (HE-Färbung, 64-fach, Ölimmersion)	79
Abb. 19: Lichtmikroskopie Lungenparenchym (HE-Färbung, 64-fach, Ölimmersion) ..	80
Abb. 20 u. 21: Lichtmikroskopie Lungenparenchym (Immunhisto, 64-fach, Ölimmersion)	82
Abb. 22: Lichtmikroskopie Lungenparenchym (Immunhisto, 64-fach, Ölimmersion) ...	83
Abb. 23: Differenzialblutbilder der Kontrolltiere im zeitlichen Verlauf. n = 4. BN: Stabkernige neutrophile Granulozyten. PMN: Segmentkernige neutrophile Granulozyten. Lym: Lymphozyten.....	84
Abb. 24: Differenzialblutbilder der CoPP-behandelten Tiere im zeitlichen Verlauf. n = 4. BN: Stabkernige neutrophile Granulozyten. PMN: Segmentkernige neutrophile Granulozyten. Lym: Lymphozyten.....	85
Abb. 25: Differenzialblutbilder der CoPP+SnPP-behandelten Tiere im zeitlichen Verlauf. n = 4. BN: Stabkernige neutrophile Granulozyten. PMN: Segmentkernige neutrophile Granulozyten. Lym: Lymphozyten.....	86
Abb. 26: Differenzialblutbilder der SnPP-behandelten Tiere im zeitlichen Verlauf. n = 4. BN: Stabkernige neutrophile Granulozyten. PMN: Segmentkernige neutrophile Granulozyten. Lym: Lymphozyten.....	87
Abb. 27: Vergleich der PMNs im Differenzialblutbild. LPS-Applikation zum Zeitpunkt t = 1h. (jeweils n = 4, # P < 0,05 signifikante Veränderung zur Kontrollgruppe; * P < 0,05 signifikante Veränderung zur Kontrollgruppe zum Zeitpunkt t = 1h). Abbildung modifiziert nach [193].	88
Abb. 28: Vergleich der BNs im Differenzialblutbild. LPS-Applikation zum Zeitpunkt t = 1h. (jeweils n = 4, # P < 0,05 signifikante Veränderung zur Kontrollgruppe; * P < 0,05 signifikante Veränderung zur Kontrollgruppe zum Zeitpunkt t = 1h). Abbildung modifiziert nach [193].	89
Abb. 29: Evans blue Gehalt in den Lungen. A: Tiere ohne LPS-Inhalation. B: Tiere mit LPS-Applikation (jeweils n = 8, * P < 0,05 signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne LPS, # P < 0,05 signifikante Verringerung im Vergleich zur Kontrollgruppe mit LPS, + P < 0,05 signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe mit LPS)	90
Abb. 30: Aufnahmen nicht-inflammatorischer und inflammatorischer Herz-Lungen-Organpakete. A: Kontrolle ohne LPS. B: Inflammatorische Veränderungen nach Vorbehandlung mit CoPP+SnPP, 6 h nach LPS. Links jeweils Ansicht von dorsal, rechts jeweils Ansicht von ventral.....	91
Abb. 31 Migrierte, humane PMNs durch Epithel- (A549) und Endothel-(HMVEC-L)-Monolayer bei der Behandlung mit verschiedenen CoPP-Konzentrationen. A: Migration behandelter PMNs durch unbehandeltes Epithel. B: Migration behandelter PMNs durch unbehandeltes Endothel. C: Migration unbehandelter PMNs durch behandeltes Epithel. D: Migration unbehandelter PMNs durch behandeltes Endothel. E: Migration behandelter PMNs durch behandeltes Epithel. F: Migration behandelter PMNs durch behandeltes Endothel. (n = 4, * P < 0,05)	93
Abb. 32: PMNs im Intravasalraum. n = 4, * P < 0,05 signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne LPS. IV = intravasal.....	94

Abb. 33: PMNs im Interstitium. n = 4, * P < 0,05 signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne LPS; + P < 0,05 signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe mit LPS. IS = interstitiell.	95
Abb. 34: PMNs in der BAL. n = 4, * P < 0,05 signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne LPS; + P < 0,05 signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe mit LPS. BAL = Bronchoalveoläre Lavage.	96
Abb. 35: Normalisierte Auftragung der HO-1-Aktivität. n = 4, * P < 0,05 signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne LPS, *+ P < 0,05 signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe mit und ohne LPS; # P < 0,05 signifikante Verringerung im Vergleich zur Kontrollgruppe mit LPS, °# P < 0,05 signifikante Verringerung im Vergleich zur Kontrollgruppe mit und ohne LPS .	97
Abb. 36: Zytokine in der BAL. Bestimmung verschiedener proinflammatorischer Zytokine in der bronchoalveolären Lavage (BAL). A: IL-6. B: TNF α . C: CXCL2/3 (MIP-2). D: CXCL1 (KC). n = 4, * P < 0,05 signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne LPS, + P < 0,05 signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe mit LPS.....	98

9. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Pulmonale und extrapulmonale Ursachen des ARDS [11;21].....	13
Tab. 2: Färbeplan.....	72

10. Erklärung zum Eigenanteil

Konzeption und Planung der Experimente erfolgte durch Herrn Professor Dr. J. Reutershan und Frau Dr. F. Konrad. Beide haben die Arbeit betreut und das Manuskript korrigiert.

Die histologische bzw. immunhistologische Aufarbeitung der Gewebeproben, Mikroskopie und Auswertung der Präparate aus Kapitel 3.2.4 und 3.2.5 wurde nach Einarbeitung durch Frau I. Vollmer von mir eigenständig durchgeführt.

Die Anfertigung und Auswertung der Differenzialblutbilder aus Kapitel 3.2.6 wurde von mir eigenständig durchgeführt.

Ebenso wurden nach Einarbeitung durch Frau I. Vollmer die Experimente zur pulmonalen Gefäßpermeabilität aus Kapitel 3.2.7 von mir eigenständig durchgeführt.

Frau I. Vollmer und Frau S. Stark haben sämtliche Zellkulturversuche und Transmigrationsversuche aus Kapitel 3.2.8 durchgeführt. Die statistische Auswertung dieser Versuche erfolgte durch Frau Dr. F. Konrad.

Experimente zur Neutrophilenmigration aus Kapitel 3.2.9 wurden von mir nach Einarbeitung durch Frau I. Vollmer eigenständig durchgeführt und ausgewertet. Frau Dr. F. Konrad und Frau I. Vollmer haben die Experimente zur Enzymaktivitäts- und Proteinbestimmung aus Kapitel 3.2.10 sowie die Versuche zur Zytokinbestimmung aus Kapitel 3.2.11 durchgeführt und ausgewertet.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 12.02.2015

11. Danksagung

Herrn Professor Dr. Jörg Reutershan danke ich für die Überlassung dieses sehr interessanten Dissertationsthemas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die sehr gute Betreuung in der Konzeptionsphase der Arbeit.

Frau Dr. Franziska Konrad möchte ich von ganzen Herzen für die hervorragende Betreuung danken. Durch ihre stets freundliche und motivierende Art, ihre Geduld und ihre zahlreichen Ratschläge hat sie zu einem wesentlichen Anteil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Irene Vollmer für die Einarbeitung im Labor und ihre Hilfsbereitschaft bei Problemen rund um die Experimente.

Frau Stefanie Stark danke ich für die Hilfestellung in der Anfangsphase meiner Laborarbeit.

Meiner Freundin Sophie danke ich herzlich für das Korrekturlesen.