

Aus der Medizinischen Klinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Ertl

Welche Rolle spielt Lipidperoxidation
bei der durch oxidativen Stress vermittelten akuten Lungenschädigung?

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Nicole Büchler
aus Heidelberg

Würzburg, September 2001

Referent: Professor Dr. med. Neubauer

Korreferent: Professor Dr. med. Ertl

Dekan: Professor Dr. med. Ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 18.06.2002

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Akutes Atemnotsyndrom	1
1.1	Definitionen	1
1.1.2	Epidemiologie	2
1.1.3	Ätiologie	3
1.1.4	Pathophysiologie und Pathobiochemie	3
1.2	Neutrophile Granulozyten – Schlüsselzellen im ARDS	6
1.2.1	Physiologische Funktionen neutrophiler Granulozyten	6
1.2.2	Neutrophile Granulozyten in der pulmonalen Zirkulation	7
1.2.3	Aktivierung neutrophiler Granulozyten - oxygen burst	8
1.3	Die Generierung reaktiver Sauerstoffmetabolite	10
1.3.1	Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	10
1.3.2	Das Hydroxylradikal (OH [·])	11
1.3.3	Hypochlorsäure (HOCl)	12
1.3.4	Singulett-Sauerstoff	12
1.4	Experimentelle Modelle für den oxidativen Stress neutrophiler Granulozyten	14
1.5	Biologische Wirkungen von oxidativem Stress	16
1.5.1	Radikalische Sauerstoffverbindungen – Lipidperoxidation	16
1.5.2	Nichtradikalische Sauerstoffverbindungen - Modifikation freier funktioneller Gruppen	17
1.6	Aufgabenstellung	19

2	Materialien und Methoden	21
2.1	Modell der isolierten, ventilerten und perfundierten Kaninchenlunge	21
2.1.1	Versuchsaufbau	21
2.1.2	Versuchsvorbereitung	23
2.1.3	Präparation	23
2.1.4	Kalibrier- und Aufwärmphase	25
2.1.5	Steady-state-Phase	25
2.1.6	Physiologische Messgrößen und –technik	25
2.1.6.1	Messung des pulmonalarteriellen und des pulmonalvenösen Druckes	25
2.1.6.2	Bestimmung des kapillären Filtrationskoeffizienten ($K_{f,c}$)	26
2.1.6.3	Bestimmung der Compliance (C)	28
2.1.6.4	Bestimmung der Retention (ΔW)	28
2.2	Versuchsprotokoll und Versuchsgruppen	29
2.3	Biochemische Analytik	31
2.3.1	Proteinkonzentration im Gewebehomogenat	31
2.3.2	Lipidperoxidationsprodukt – Malonaldehyd (MDA)	31
2.3.3	Kalium und LDH-Aktivität im Perfusat	31
2.3.4	HOCl-Konzentration und H_2O_2 -Konzentration	32
2.3.5	Perfusat-Myeloperoxidase (MPO) Aktivität	32
2.4	Statistische Methoden	33

3	Ergebnisse	34
3.1	Beeinflussung der pulmonalen Zirkulation durch HOCl, H ₂ O ₂ und MPO-H ₂ O ₂	34
3.1.1	Pulmonalarterieller Druck	34
3.1.2	Parameter der „hydrostatic challenges“	40
3.1.3	MPO-Perfusataktivität in der MPO-Gruppe	43
3.2	Lipidperoxidation	45
3.3	Akute oxidative Lungenschädigung und Lipidperoxidation	46
4	Diskussion	48
4.1	Lungenschädigung durch oxidativen Stress – Diskussion des verwendeten Modells	48
4.2	Vergleich der Effekte verschiedener Oxidantien	50
4.3	Mechanismen der durch oxidativen Stress verursachten Zellschädigung	52
4.4	Lipidperoxidation in den untersuchten Modellen der akuten Lungenschädigung	53
5	Zusammenfassung	55
6	Literaturverzeichnis	57

Anhang

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt zu haben. Ich habe keine anderen als die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen benutzt und sämtliche Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen wurden, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, als solche kenntlich gemacht. Ebenfalls sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder erbrachten Dienstleistungen als solche gekennzeichnet.

Heidelberg, 24.09.2001



Nicole Büchler

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Nicole Büchler
geboren am 02.12.1973
in Alzenau
Nationalität deutsch
Familienstand ledig
Konfession römisch-katholisch
Wohnort Heinrich-Fuchs-Straße 59, 69126 Heidelberg, Tel.: 0 62 21-33 86 98

Schulbildung

09/80-07/1984 Johannes-Obernburger-Schule, Obernburg (Grundschule)
09/84-07/1993 Julius-Echter-Gymnasium, Elsenfeld
09.07.1993 Abitur

Medizinstudium

10/93-05/1999 4 vorklinische und 7 klinische Semester an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
09/1995 Ärztliche Vorprüfung
08/1996 1. Staatsexamen
03/1999 2. Staatsexamen
04/99-05/2000 Praktisches Jahr
Chirurgie: Centre Hospitalier Universitaire de Fort-de-France
(PH Dr. François)
Innere Medizin: Centre Hospitalier Universitaire de Marseille
(Prof. Dr. Harlé)
Pädiatrie: Universitätskinderklinik, Würzburg (Prof. Dr. Speer)
19.05.2000 3. Staatsexamen

Promotion

Seit 11/1995 Arbeiten im Labor der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg (PD Dr. med. Neubauer) zur myokardialen Energetik und pulmonalen Mikrozirkulation

Fremdsprachen

Englisch sicher in Wort und Schrift
Französisch sicher in Wort und Schrift, Diplôme Approfondi de Langue Française
Latein Latinum

Beruf

Seit 01.09.2000 Ärztin im Praktikum in der Medizinischen Klinik I, Universitätsklinik Heidelberg

Heidelberg, 24.09.2001

Nicole Büchler

Publikationsverzeichnis

Hammerschmidt, S, M. Bell, N. Büchler, H. Wahn, H. Remkes, M. J. Lohse, S, Neubauer:

Acute Changes of Myocardial Creatine Kinase (CK) Gene Expression under β -adrenergic stimulation.

Biochim Biophys Acta (2000) 1502: 471-480

Hammerschmidt, S, N. Büchler, H. Wahn:

Tissue lipid peroxidation and reduced glutathione epletion in hypochlorite-induced lung injury.

Chest, in press.

Hammerschmidt, S., H. Wahn, N. Büchler, N. Rüenauer, S. Neubauer:

The non-radical neutrophil-derived oxidants hydrogen peroxide and hypochlorous acid cause different changes in pulmonary microvasculature in isolated rabbit lungs.

Eur. Resp. J. 12 Suppl (1998), 285s

Wahn, H., S. Hammerschmidt, N. Rüenauer, N. Büchler, S. Neubauer:

Distinct effects of arachidonic (AA) and eicosapentaenoic acid (EPA) on oxidative stress-induced changes in pulmonary microvasculature of isolated rabbit lungs.

Eur. Resp. J. 12 Suppl (1998), 285s

Hammerschmidt, S., N. Büchler, H. Wahn, S. Guevara, S. Neubauer:

Hydrogen peroxide and hypochlorous acid – two neutrophil-derived oxidants – evoke distinct effects on the microvasculature of isolated rabbit lungs

Am. J. Resp. Crit. Care Med. 15 No 3 (1999), A891

Hammerschmidt, S., N. Büchler, H. Wahn, S. Guevara, S. Neubauer, G. Ertl:

The neutrophil-derived oxidants hydrogen peroxide and hypochlorous acid evoke distinct patterns of lung injury but similar tissue lipid peroxidation in isolated lungs.

Eur. Resp. J. 14 Suppl 28 (1999)

Hammerschmidt, S., H. Wahn, N. Büchler, S. Guevara, S. Neubauer:

Die Oxidantien Wasserstoffperoxid und hypochlorsäure schädigen die Zirkulation isolierter Lungen auf verschiedene Weise.

Med. Klinik 94 Abstract Band I (1999), 130

Wahn, H., S. Guevara, S. Hammerschmidt, N. Büchler, S. Neubauer:

Hypochlorous acid-induced pressure response in isolated rabbit lungs is reduced by the non-specific endothelin receptor (ET-A/AT-B) antagonist PD 142893.

Am. J. Resp. Crit. Care Med. 159 No 3 (1999), A591

Wahn, H., S. Guevara, S. Hammerschmidt, N. Büchler, S. Neubauer, G. Ertl:

The non-specific (ET-A/ET-B) endothelin receptor antagonist PD 142893 reduces the pulmonary artery pressure response by hypochlorous acid in isolated rabbit lungs.

Eur. Resp. J. 14 Suppl 28 (1999)

Wahn, H., S. Hammerschmidt, S. Guevara, N. Büchler, S. Neubauer:

Der unspezifische (ET-A/AT-B) Rezeptorantagonist PD142893 vermindert Hypochlorsäure vermittelte Druckreaktionen in isolierten Kaninchenlungen.

Med. Klinik 94 Abstract Band I (1999), 128

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mir beim Erstellen dieser Dissertation mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Insbesondere danke ich Herrn Prof. Dr. med. Neubauer für die Möglichkeit, die Arbeit im Labor der Medizinischen Klinik der Universität Würzburg ausführen zu können sowie für die stete kompetente Beratung.

Besonders herzlich danke ich Herrn Dr. med. Stefan Hammerschmidt und Herrn Dr. med. Hans Wahn, deren fachliche und freundschaftliche Betreuung wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Auch bei allen anderen Labormitarbeitern möchte ich mich für die angenehme und kollegiale Zusammenarbeit bedanken.

Ich danke meinen Eltern für Ihre stete großzügige Unterstützung, die mir dies erst ermöglicht hat.

1 Einleitung

1.1 Akutes Atemnotsyndrom

1.1.1 Definitionen

Die Erstbeschreibung des akuten Atemnotsyndroms (acute respiratory distress syndrome, ARDS) stammt von Ashbaugh und Petty (1, 2). In einem Kollektiv von beatmungspflichtigen Patienten auf Intensivstation beschrieben die Autoren eine Gruppe von Patienten, die unter der standardmäßigen Beatmungstherapie keine Besserung ihrer respiratorischen Insuffizienz zeigten. Die Autoren definieren das Krankheitsbild - unabhängig von der auslösenden Ursache - anhand klinischer, radiologischer, pathophysiologischer und histopathologischer Kriterien: Danach ist das ARDS *klinisch* durch Dyspnoe, Tachypnoe und Zyanose, die sich auf Sauerstoffgabe nicht bessern, gekennzeichnet. *Pathophysiologisch* finden sich eine Gasaustauschstörung, der ein nicht-kardiogenes Lungenödem und eine Fehlregulation der regionalen Hämodynamik mit einem Missverhältnis zwischen Ventilation und Perfusion zugrunde liegt sowie eine verminderte pulmonale Compliance. *Radiologisch* zeigen sich diffuse alveoläre Infiltrate. Atelektasen, hämorrhagische Bezirke, interstitielles und alveoläres Ödem sowie hyaline Membranen sind die *histologischen* Charakteristika des ARDS.

Spätere Definitionen orientierten sich mehr an Schweregrad und klinischem Verlauf des Syndroms, mit der Zielsetzung, Anhaltspunkte für die Prognose und Leitlinien für die Differentialtherapie erstellen zu können, was allerdings bis heute nur in gewissem Umfang gelang. Nach den Empfehlungen der "American-European Consensus Conference on ARDS" (3) sind ARDS und ALI (acute lung injury, akutes Lungenversagen) durch folgende Kriterien definiert: akuter Beginn, bilaterale Infiltrate in der Röntgenthoraxaufnahme, pulmonal-arterieller Verschlussdruck <18 mmHg oder keinen klinischen Hinweis auf einen Druckanstieg im linken Vorhof und einen $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Quotient ≤ 200 mmHg (Quotient aus arteriellem Sauerstoffpartialdruck und inspiratorischer Sauerstofffraktion) für das ARDS bzw. einen $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Quotient >200 mmHg und ≤ 300 mmHg für das ALI, wobei die Höhe des PEEP (positiv

endexpiratorischer Druck) nicht berücksichtigt wird (3). Dieses Syndrom ist in den meisten Fällen mit einer anderen Erkrankung assoziiert, hauptsächlich mit einem Sepsissyndrom, Aspiration, Pneumonie, Polytrauma und multiplen Transfusionen.

1.1.2 Epidemiologie

In aktuellen Publikationen wird die Inzidenz des ARDS mit 1,5 bis 13,5 Fälle/100000 Einwohner pro Jahr angegeben (4). Das akute Lungenversagen (ALI) ist mit 17 (Skandinavien) bis 70 (USA) Neuerkrankungen/100000 Einwohner pro Jahr häufiger. Die hohe Spannweite dieser Zahlen ist unter anderem auf die Heterogenität der zugrunde gelegten Definitionen für ARDS und die unterschiedliche Abgrenzung gegen ALI zurückzuführen. Da das Auftreten von ALI und ARDS fast immer mit einer anderen Erkrankung assoziiert ist (vgl. oben), liegt die Inzidenz in Risikogruppen, d. h. bei Patienten mit einer dieser Erkrankungen, wesentlich höher. Beispielsweise erkranken 43% der Patienten mit einem Sepsissyndrom, 25% der schwer traumatisierten und 33% der beinahe ertrunkenen Patienten an einem ARDS (5). Im Kollektiv der beatmeten Patienten liegt das ARDS mit einer Prävalenz von ca. 4% (4) bis ca. 17% vor (6, 7), wobei sich der Unterschied möglicherweise aus der Anwendung verschiedener Definitionen des ARDS, aus der Heterogenität der Patientenkollektive und aus unterschiedlichen Beatmungsstrategien erklären lässt.

Über die Mortalität des ARDS finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben: einerseits werden Mortalitätsraten von 50 bis 60% genannt (6), die seit der Erstbeschreibung des ARDS konstant geblieben sind (8), andererseits wird eine Senkung der Mortalität auf ca. 30 bis 40% beschrieben, die auf eine druck-limitierte Beatmungstherapie zurückgeführt wird (9,10).

Auch die Zahlen über die Mortalität für Patienten mit akutem Lungenversagen, die nicht die Kriterien für ARDS erfüllen, variieren stark: während Roupie et al. (6) mit ca. 30% für ALI eine deutlich niedrigere Mortalität als für ARDS finden, liegt anderen Studien zufolge die Mortalität in beiden Gruppen zwischen 40 und 60% (4).

1.1.3 Ätiologie

Die Ursachen eines ARDS lassen sich in pulmonale und extrapulmonale einteilen, wobei letztere überwiegen (3, 5). Zu den pulmonalen Ursachen zählen direkte Auslöser eines ARDS, wie zum Beispiel die Aspiration von Mageninhalt, das Beinaheertrinken, die virale Pneumonitis, die bakterielle Pneumonie (parapneumonisches ARDS) sowie die Inhalation toxischer Gase, wie Stickstoffdioxid, Rauchgase und hyperbarer Sauerstoff.

Zu den häufigsten extrapulmonalen Ursachen zählen Schock, Polytrauma, v.a. in Verbindung mit multiplen Bluttransfusionen, Sepsissyndrom, hauptsächlich durch gram-negative Keime und ausgedehnte Verbrennungen.

Während sich die pathologischen Prozesse beim ARDS mit pulmonaler Ursache primär an der Lunge abspielen, kommt es beim ARDS extrapulmonaler Genese sekundär zu einer Einbeziehung der Lunge (3). Dies entsteht durch eine Einschwemmung aktivierter Zellen (neutrophiler Granulozyten, immunkompetenter Zellen), bakterieller Toxine und humoraler Produkte aktivierter Kaskadensysteme aus dem großen Kreislauf (beispielsweise aus dem Splanchnikusgebiet) in die pulmonale Zirkulation.

1.1.4 Pathophysiologie und Pathobiochemie

Im Gegensatz zur Vielfalt der auslösenden Mechanismen laufen die funktionellen und strukturellen Veränderungen nach einem weitgehend einheitlichen Muster ab, so dass histologisches Bild und klinischer Verlauf kaum Rückschlüsse auf die Ursache ermöglichen. Am Anfang stehen die vermehrte Gefäßfüllung, die ödematöse Verbreiterung der Alveolarsepten und die Bildung hyaliner Membranen. Im weiteren Verlauf nehmen diese an Dicke und Ausdehnung zu, bis die Einwanderung von Fibroblasten einsetzt, die zur Ablagerung kollagener Fasern führt. Schließlich bietet sich das Bild einer interstitiellen Entzündung und Fibrose (1).

Stunden bis wenige Tage nach dem auslösenden Ereignis setzen die pathophysiologischen Vorgänge ein. Als initiales Ereignis in der Pathogenese des ARDS wird die Sequestration von neutrophilen Granulozyten (polymorphkernigen

Granulozyten, PMN) betrachtet (11-14), die sich in einem massiven Anstieg Neutrophiler sowie der von ihnen sezernierten Myeloperoxidase (MPO) im pulmonalen Interstitium und in der bronchoalveolären Lavage niederschlägt (15, 16). Diese Sequestration wird durch die Freisetzung chemotaktischer Substanzen aus dem pulmonalen Endothel, aus Makrophagen und residenten Neutrophilen bewirkt (12, 17). Die im ARDS beobachteten pathophysiologischen Veränderungen entstehen aus den Interaktionen der beteiligten Zellen (Neutrophile, pulmonales Endothel, Makrophagen) und aktivierten humoralen Kaskaden (Gerinnungs-, Komplement-, Kallikreinsystem und Arachidonsäuremetabolismus) (18).

Am Anfang steht eine diffuse Vasokonstriktion in der pulmonalen Strombahn, die einen Druckanstieg zur Folge hat (19, 20). Die Permeabilität der endo- und epithelialen Grenzflächen für Makromoleküle steigt ebenfalls, so dass sich ein proteinreiches alveoläres Ödem bildet, das schließlich zur Ablagerung hyaliner Membranen führt (21-23). Diese verbreiterte und verdichtete Diffusionsstrecke behindert den Gasaustausch, was sich in sinkenden arteriellen Sauerstoffpartialdrücken (PaO_2) niederschlägt. Die reduzierte Surfactantfunktion führt gemeinsam mit einer im Zuge der systemischen Entzündungsreaktion erhöhten Steifigkeit der Thoraxwand zur Verminderung der Compliance (24, 25). Regionale Minderbelüftung einerseits und eine fehlende Regulation des Gefäßtonus andererseits steigern das intrapulmonale Shuntvolumen (d. h. Perfusion nicht belüfteter Alveolen) (26), was ein weiteres Absinken des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes (PaO_2) begünstigt.

Die Mechanismen der Vermittlung zwischen auslösender Ursache und pathophysiologischer Reaktion sind nicht vollständig aufgeklärt. Bekannt ist, dass Produkte des Arachidonsäure (AA)-Stoffwechsels ebenso wie reaktive Sauerstoffmetabolite entscheidend beteiligt sind.

Die Beteiligung von Produkten des AA-Stoffwechsels ist durch klinische und experimentelle Ergebnisse untermauert. So sind in der bronchoalveolären Lavage (BAL) von Hochrisikopatienten Leukotrien B_4 (LTB_4), Prostaglandin E_2 (PGE_2) sowie die Metabolite von Prostaglandin I_2 (PGI_2) und Thromboxan A_2 (TXA_2) nachweisbar (27). TXA_2 gilt als einer der stärksten Vasokonstriktoren, während Peptidoleukotriene und LTB_4 eine Steigerung der Permeabilität bewirken (26, 28). Zudem stellt LTB_4 einen starken chemotaktischen Reiz für neutrophile Granulozyten dar. Außerdem erhöht eine

Vasokonstriktion an postkapillären Gefäßabschnitten den kapillären Filtrationskoeffizienten und damit die Ödembildung. Durch Vasodilatation ist die lokale PGI₂-Synthese am Ventilations-Perfusions-Missverhältnis beteiligt (26).

Die Beteiligung reaktiver Sauerstoffmetabolite, die von stimulierten Neutrophilen ebenso wie von aktivierten Endothelzellen freigesetzt werden, ist ebenso durch experimentelle und klinische Daten gesichert (29, 30). Darüber hinaus ruft der oxidative Stress durch neutrophile Granulozyten einen Anstieg von pulmonalarteriellen Druck und Gefäßpermeabilität hervor und bewirkt damit Veränderungen, die für das ARDS charakteristisch sind (31).

In verschiedenen experimentellen Systemen konnte eine Verbindung zwischen oxidativem Stress und AA-Metabolismus nachgewiesen werden (32, 33). Insbesondere werden auch die Effekte von oxidativem Stress neutrophiler Granulozyten über eine Beteiligung des AA-Stoffwechsel vermittelt (34) (vgl. unten).

1.2 Neutrophile Granulozyten - Schlüsselzellen im ARDS

1.2.1 Physiologische Funktionen neutrophiler Granulozyten

Neutrophile Granulozyten stellen als Mikrophagen Zellen der unspezifischen Abwehr dar (35). Zur Abtötung von Erregern verfügen sie über verschiedene Systeme, wie die Freisetzung von Prostanoiden, die Generierung hochreaktiver Sauerstoffmetabolite und die Sekretion lysosomaler proteolytischer Enzyme (36). Unter pathologischen Bedingungen können über diese Mechanismen auch körpereigene Strukturen angegriffen werden.

Die physiologische Funktion Neutrophiler setzt deren Anreicherung im infizierten Gewebe voraus. Dazu verfügen Neutrophile über die Fähigkeit zu Chemotaxis, Adhärenz, Migration und Phagozytose. Diese Prozesse werden über spezifische Rezeptoren vermittelt (37):

Chemotaxis: Zur Anreicherung der neutrophilen Granulozyten im Entzündungsherd dienen Rezeptoren für LTB_4 , ein Produkt des AA-Stoffwechsels, für das Komplementfragment C5a und für das Peptid N-Formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanin (FMLP), das von Bakterien produziert wird.

Im Rahmen einer Polytraumatisierung oder eines Sepsissyndroms kommt es unter anderem zur Aktivierung der Komplementkaskade mit Freisetzung der Anaphylatoxine C5a und C3a, die aufgrund ihrer chemotaktischen Wirkung im pulmonalen Gefäßbett zu einem Anstieg der Leukozytenzahlen führen. Da LTB_4 das Hauptprodukt des granulozytären Eicosanoidstoffwechsels darstellt, verstärkt sich die Sequestration der neutrophilen Granulozyten aus eigenem Antrieb (38).

Adhärenz und Migration: Die Adhärenz an der Basalmembran des Gefäßendothels bzw. nach dem Auswandern ins Bindegewebe wird von den Rezeptoren für Laminin und Fibronectin vermittelt.

Phagozytose: Schließlich wird über Bindung an Rezeptoren für die Fc-Region der Immunglobuline, v.a. IgG und für das Komplementfragment C3b die Phagozytose ausgelöst.

Als Phagozytose bezeichnet man die aktive Aufnahme von Erregern oder Partikeln in eine Zelle (36). Dazu werden die aufzunehmenden Substanzen von Zellausläufern

umflossen, bis sich die Zellmembran dahinter wieder verschließt. Diese Phagosomen verschmelzen mit den Lysosomen des Phagozyten zu Phagolysosomen, wodurch die bakteriziden Substrate und fermentativen Enzyme mit dem aufgenommenen Material in Kontakt treten.

1.2.2 Neutrophile Granulozyten in der pulmonalen Zirkulation

Bereits unter physiologischen Bedingungen ist die Lunge ein Organ mit einem großen Pool an neutrophilen Granulozyten. Die Größenverhältnisse zwischen neutrophilen Granulozyten und pulmonalen Kapillaren erfordern einerseits eine Formänderung der neutrophilen Granulozyten für einen Durchtritt durch die pulmonale Zirkulation und führen zu einer deutlichen Verlangsamung des Flusses der Neutrophilen im Vergleich zu anderen Blutbestandteilen (39). Diese Flussverlangsamung führt zu einer relativen Anreicherung Neutrophiler in der pulmonalen Mikrozirkulation und schafft die Voraussetzung für einen Kontakt zwischen Neutrophilen und pulmonalem Endothel, der wiederum für eine Migration erforderlich ist. In der pulmonalen Mikrozirkulation können neutrophile Granulozyten gleitend oder rollend, adhärend und migrierend angetroffen werden.

Zu einer raschen Steigerung der Zahl neutrophiler Granulozyten, die in die Lunge migrieren, kommt es unter verschiedenen pathologischen Bedingungen. Experimentell konnte dieses als Granulozyten-Sticking bezeichnete Phänomen durch folgende Stimuli ausgelöst werden (40):

- Reduktion des Flusses in der pulmonalen Zirkulation,
- Erhöhung des pulmonal-venösen Druckes,
- Exposition der Lunge mit bakteriellem Endotoxin.

Die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten in der pulmonalen Zirkulation ruft eine Zunahme von pulmonalarteriellen Druck und Gefäßpermeabilität hervor und führt damit zu Veränderungen der pulmonalen Zirkulation, wie sie klinisch unter den Bedingungen eines ARDS oder einer acute lung injury gefunden werden (31). Dabei korrelieren die Zunahme des pulmonalarteriellen Druckes und der Gefäßpermeabilität mit der Aktivität der freigesetzten Myeloperoxidase, so dass die Veränderungen der

pulmonalen Mikrozirkulation am ehesten durch den oxygen burst der neutrophilen Granulozyten erklärt werden können.

1.2.3 Aktivierung neutrophiler Granulozyten - oxygen burst

Zur Aktivierung der neutrophilen Granulozyten kommt es durch die Bindung von Liganden an die entsprechenden Rezeptoren (36, 37). Unter physiologischen Bedingungen sind dies hauptsächlich Fc-Regionen der Immunglobuline und Komplementfragmente. Da der Signalübertragungsweg für den FMLP-Rezeptor am besten bekannt ist, beziehen sich die folgenden Erläuterungen auf ihn. Die Bindung des FMLP an seinen Rezeptor führt über ein G-regulatorisches Protein zur Aktivierung der Phospholipase C in der Zellmembran. Dieses Enzym setzt aus dem Phospholipid-Pool der Zellmembran Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP₃) frei (41). Diese Moleküle setzen als sogenannte second messenger weitere Reaktionen in Gang. IP₃ erhöht die intrazelluläre Calciumionenkonzentration, die eine wesentliche Voraussetzung für Phagozytose und Degranulation darstellt. DAG aktiviert über die Proteinkinase C (42) einerseits das Zytoskelett und ist damit ebenfalls an Phagozytose und Degranulation beteiligt. Die Degranulation der Neutrophilen setzt lysosomale proteolytische Enzyme und die Myeloperoxidase (MPO) aus den primären Granula in den Extrazellulärraum frei. Andererseits werden durch die Aktivität der Proteinkinase C Enzyme aktiviert, die für die Produktion der reaktiven Sauerstoffmetabolite verantwortlich sind (42).

Die Aktivierung der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase stellt über den Hexosemonophosphatshunt reduziertes Nicotinsäureamid-adenin-dinukleotidphosphat (NADPH) bereit, das von der NADPH-Oxidase zum Superoxidanionenradikal (O₂⁻) oxidiert wird, welches den Ausgangspunkt für weitere Reaktionen bildet (43). Die NADPH-Oxidase ist zum größten Teil in der Membran der sekundären Granula lokalisiert, ein kleiner Teil befindet sich in der äußeren Zellmembran, wobei die NADPH-Bindungsstelle auf der zytoplasmatischen Seite lokalisiert ist und Superoxidanionenradikale in das Lumen der Granula bzw. in den Extrazellulärraum sezerniert werden (44, 45).

Während dieses Prozesses steigt die Sauerstoffaufnahme der Neutrophilen auf das 20fache des Ausgangswertes (43). 90% des aufgenommenen Sauerstoffs werden als Superoxidanionenradikal (O_2^-) sezerniert, weshalb man dieses Phänomen respiratory oder oxygen burst nennt.

1.3 Die Generierung reaktiver Sauerstoffmetabolite

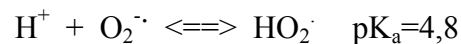
Ausgehend vom Superoxidanionenradikal ($O_2^{\cdot-}$) werden während eines oxygen burst weitere reaktive Sauerstoffmetabolite gebildet (44).

1.3.1 Wasserstoffperoxid (H_2O_2)

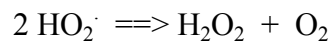
Bei $O_2^{\cdot-}$ handelt es sich um eine instabile Substanz, aus der durch Dismutation Wasserstoffperoxid (H_2O_2) entsteht (44)(46).

(A) Spontane Dismutation (43):

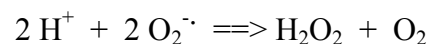
Das Superoxidanionenradikal ($O_2^{\cdot-}$) befindet sich in folgendem Gleichgewicht:



Da im sauren Milieu der Lysosomen beide Formen etwa zu gleichen Teilen vorliegen, ist eine Dismutation nach folgender Gleichung denkbar:



Im physiologischen Milieu ($pH=7,4$) liegt das Superoxidanionenradikal jedoch fast vollständig dissoziiert vor, so dass eine spontane Dismutation nach folgender Gleichung:



wegen der hohen Abstoßung zwischen den beiden negativen Anionenradikalen sehr unwahrscheinlich ist.

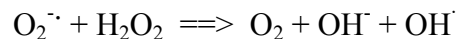
(B) Enzymatische Dismutation:

Unter physiologischen Bedingungen soll hauptsächlich die durch die Superoxiddismutase katalysierte Dismutation unter Bildung von Wasserstoffperoxid und Sauerstoff ablaufen (43).

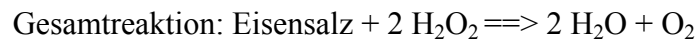
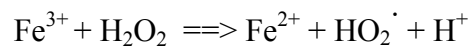
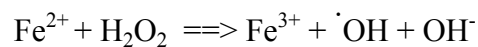
Aus Wasserstoffperoxid entstehen weitere Metabolite des oxygen burst, wobei vor allem die Hypochlorsäure zu nennen ist. Außerdem ist Wasserstoffperoxid selbst ein reaktives Oxidans, jedoch deutlich weniger reaktiv als Hypochlorsäure.

1.3.2 Das Hydroxylradikal (OH[·])

Das Hydroxylradikal (47) entsteht unter physiologischen Bedingungen aus Wasserstoffperoxid und dem Superoxidanionenradikal gemäß der Haber-Weiss-Reaktion (48):



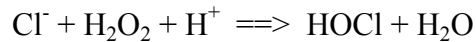
Diese Reaktion läuft bei pH=7,4 eher langsam ab, wird aber durch die Anwesenheit von Ionen der Zwischenelemente beschleunigt, die dabei als Redoxpartner wirken, indem sie oxidative Äquivalente übertragen und nach der Reaktion unverändert vorliegen. Die derart modifizierte Haber-Weiss-Reaktion wird als Fenton-Reaktion (49) bezeichnet:



und spielt im physiologischen Milieu die bedeutendere Rolle .

1.3.3 Hypochlorsäure (HOCl)

In Anwesenheit von Chloridionen entsteht aus Wasserstoffperoxid in einer enzymatischen Reaktion Hypochlorsäure (HOCl). Diese Reaktion wird durch die Myeloperoxidase (MPO) katalysiert (50-52):



Die MPO ist in großen Mengen in den primären Granula der neutrophilen Granulozyten enthalten (44, 46). Da die Generierung von HOCl an die MPO gebunden ist und da nur Granulozyten über dieses Enzym verfügen, ist HOCl ein für neutrophile Granulozyten relativ spezifisches Oxidationsmittel.

Mit einem pKa-Wert von 7,5 (53) ist HOCl eine schwache Säure und liegt bei physiologischem pH-Wert nahezu zu gleichen Teilen dissoziiert und undissoziiert vor. HOCl wirkt daher nicht als Säure, sondern stellt ein äußerst reaktives Oxidationsmittel dar.

1.3.4 Singulett-Sauerstoff

Für die Entstehung von Singulett-Sauerstoff werden folgende Mechanismen diskutiert:

- (1) Diese energiereiche Sauerstoffspezies soll bei spontaner Dismutation entstehen (54).
Wie bereits ausgeführt, scheint diese Reaktion bei pH=7,4 jedoch eher unwahrscheinlich.
- (2) Singulett-Sauerstoff soll bei der Reaktion von Wasserstoffperoxid mit Hypochlorsäure entstehen (vgl. unten) (55).
- (3) Wenig Beweise gibt es in der Literatur für die Bildung von Singulett-Sauerstoff bei Reaktion des Superoxidanionenradikals mit Sulfhydrylgruppen (56).

Bei Singulett-Sauerstoff handelt es sich um einen hoch reaktiven Metaboliten, dessen Bedeutung für die Funktion neutrophiler Granulozyten jedoch nicht abschließend beurteilt werden kann, da die Reaktionen zu seiner Entstehung vergleichsweise langsam ablaufen.

Während eines oxygen burst werden also folgende Substanzen von neutrophilen Granulozyten freigesetzt: das Superoxidanionenradikal, Wasserstoffperoxid, Hypochlorsäure, das Hydroxylradikal und Singulett-Sauerstoff.

Alle diese Metabolite sind verschieden stark reaktive Agentien, die über unterschiedliche Mechanismen mit bestimmten biologischen Zielen reagieren können und damit mehr oder weniger mikrobizid sowie gewebsschädigend wirken (43). In welchem Ausmaß die einzelnen Agentien daran beteiligt sind und welche Bedeutung ihnen somit zukommt, ist noch nicht abschließend geklärt. Sicher ist jedoch, dass in Anwesenheit von Chloridionen, also unter physiologischen Bedingungen, das System Chloridionen/Wasserstoffperoxid/MPO eine entscheidende Rolle spielt und dass sein Produkt, die Hypochlorsäure, eine stark mikrobizide Wirkung besitzt (46).

Der Hypochlorsäure und dem Wasserstoffperoxid gilt das besondere Interesse dieser Arbeit.

1.4 Experimentelle Modelle für den oxidativen Stress neutrophiler Granulozyten

Die Effekte von durch neutrophile Granulozyten freigesetzten reaktiven Sauerstoffverbindungen auf biologische Ziele können an verschiedenen experimentellen Modellen beobachtet werden:

Den physiologischen Verhältnissen kommt die Verwendung von **Suspensionen stimulierter neutrophiler Granulozyten** am nächsten (57, 58). Dieses Modell bietet die Möglichkeit, die Beeinflussung biologischer Ziele während des oxygen burst unter Bedingungen zu untersuchen, die in vivo-Bedingungen sehr nahe kommen. Allerdings lassen sich in diesem System die beobachteten Effekte nur schwer der Wirkung reaktiver Sauerstoffmetabolite, lysosomaler Enzyme oder ebenfalls freigesetzter Prostaglandine zuordnen. Erst recht ist es nicht möglich, die beobachteten Effekte mit der Wirkung einer speziellen reaktiven Sauerstoffverbindung zu erklären.

Um die Effekte einzelner **nicht-radikalischer Oxidantien (HOCl, H₂O₂)** zu untersuchen, können diese dem zu beeinflussenden System einmalig oder kontinuierlich zugeführt werden (57, 59-62). Dieses Modell erlaubt die Charakterisierung der Effekte eines einzelnen reaktiven Sauerstoffmetaboliten. Während H₂O₂ auch von anderen Quellen, wie Endothelzellen und Makrophagen freigesetzt wird, handelt es sich bei HOCl um ein für Granulozyten spezifisches Oxidans, dessen Bildung an die Anwesenheit von MPO gebunden ist.

Um die Effekte von **radikalischen Oxidantien** zu untersuchen, stehen verschiedene Systeme zur Verfügung, die diese kurzlebigen Radikale kontinuierlich oder diskontinuierlich freisetzen. Exemplarisch seien das Xanthin-Xanthinoxidase-System und die Photoaktivierung des Farbstoffes Rose-Bengal erwähnt, die Superoxidationradikale freisetzen (63).

Ein weiteres experimentelles System für oxidativen Stress neutrophiler Granulozyten ist das **MPO/H₂O₂/Chlorid-System** (57-59). In diesem System wird von der MPO HOCl synthetisiert. Da HOCl wesentlich reaktiver als H₂O₂ ist (60) und über ein höheres Redox-Potential verfügt, sollten die Effekte dieses Systems vor allem HOCl-bedingt sein.

Untersuchungen, in denen die Taurinmonochloraminbildung durch stimulierte Neutrophile, durch das MPO/H₂O₂/Chlorid-System und durch HOCl verglichen wurde, haben gezeigt, dass der Mechanismus der Taurinmonochloraminbildung in den untersuchten Modellen identisch ist (58, 64). Am Modell der isoliert perfundierten und ventilerten Kaninchenlunge konnte gezeigt werden, dass Stimulation sequestrierter neutrophiler Granulozyten Effekte hervorruft, die denen durch kontinuierliche HOCl-Gabe ähnlich sind (31).

Aus diesen Gründen gilt die Applikation von HOCl als ein geeignetes Modell um die oxidativen Effekte stimulierter neutrophiler Granulozyten widerzuspiegeln.

1.5 Biologische Wirkungen von oxidativem Stress

Reaktive Sauerstoffmetabolite unterscheiden sich hinsichtlich Stabilität in unterschiedlichem Milieu, Redox-Potential, Reaktivität, Ladung und radikalischem bzw. nichtradikalischem Charakter. Von diesen Charakteristika wiederum hängen Eigenschaften wie biologische Halbwertszeit, Diffusion durch biologische Membranen und mittlerer Diffusionsradius ab. Diese Überlegungen verdeutlichen, dass verschiedene reaktive Sauerstoffverbindungen mit unterschiedlichen Substraten reagieren werden und dass ein und dieselbe reaktive Sauerstoffverbindung in unterschiedlichem Milieu mit verschiedenen Zielstrukturen reagieren wird. Es gibt somit keine Wirkung von oxidativem Stress schlechthin, vielmehr müssen stets spezielle Verbindungen unter speziellen Bedingungen betrachtet werden.

Zweckmäßig ist eine Einteilung der reaktiven Sauerstoffverbindungen in radikalische (wie Superoxidanion- oder Hydroxylradikal) und nicht radikalische (wie Wasserstoffperoxid und HOCl).

1.5.1 Radikalische Sauerstoffverbindungen - Lipidperoxidation

Radikalische Oxidantien, wie das Superoxidanionenradikal und das Hydroxylradikal verdanken ihre hohe Reaktivität einem ungepaarten, sog. freien Elektron. Aufgrund dieser hohen Reaktivität ist das Hydroxylradikal in der Lage, ungesättigte Fettsäuren anzugreifen und die Lipidperoxidation in Gang zu setzen (65).

Der erste Schritt in der Reaktionskette der Peroxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren besteht im Entzug eines Wasserstoffatoms aus einer Doppelbindung zwischen zwei Kohlenstoffatomen. Dabei bleibt ein freies Elektron an einem Kohlenstoffatom zurück. Durch Umlagerung dieses Moleküls entsteht ein konjugiertes Dien, aus dem in einer Reaktion mit Sauerstoff ein Peroxylradikal gebildet wird. Dieses Peroxylradikal kann nun seinerseits einer ungesättigten Fettsäure ein Wasserstoffatom entziehen, so dass eine Kettenreaktion in Gang gesetzt wird. Beendet wird diese Kettenreaktion durch ein Antioxidans oder durch die Reaktion zweier Radikale miteinander.

Reagiert dieses Peroxylradikal mit einem Wasserstoffatom, so entstehen als Endprodukte verschiedene Hydroperoxide und zyklische Peroxide. Durch Fragmentation entstehen Aldehyde, unter anderem Malonaldehyd, das als Marker für abgelaufene Peroxidationsprozesse im Gewebe nachgewiesen werden kann.

An biologischen Membranen führen Lipidperoxidationsprozesse zu einer Verringerung der Fluidität der Membran, zu einer unselektiv erhöhten Permeabilität für Ionen und damit zu einem Abfall des Membranpotentials sowie schließlich zu Membraneinrissen mit Freisetzung intrazellulärer Zellbestandteile (66).

Es wurde experimentell nachgewiesen, dass Lipidperoxidation in geschädigtem Gewebe in stärkerem Ausmaß abläuft als in gesundem Gewebe (67). Dies wird einerseits durch eine Verminderung der Antioxidantien in den Zellen, zum Beispiel durch Inaktivierung und Verlust, erklärt. Andererseits trägt eine Freisetzung von Metallionen, v.a. von Eisen und Kupfer, aus Zellspeichern zur Verstärkung der Lipidperoxidation bei (68). Daher gilt das Ausmaß der Lipidperoxidation als geeigneter Marker für Gewebsschädigung (65).

1.5.2 Nichtradikalische Sauerstoffverbindungen - Modifikation freier funktioneller Gruppen

Nichtradikalische Oxidantien, wie Hypochlorsäure und Wasserstoffperoxid sind aufgrund ihres Redox-Potentials in der Lage eine Reihe von biologischen Substraten, wie Aminosäuren, funktionelle Gruppen in Proteinen, Nukleotide, Vitamine (β -Carotin, Ascorbinsäure, Tocopherol), Porphyrin, NAD u. v. a. m. zu oxidieren (57, 61).

Hypochlorsäure, HOCl: Untersuchungen haben ergeben, dass die Reaktion von Hypochlorsäure mit den Aminogruppen von α -Aminosäuren zur Bildung von Nitrilen und Aldehyden führt (69). Als Zwischenprodukt entsteht eine Chloraminverbindung (58, 59, 70) mit einer Halbwertszeit von ca. 18 Stunden, die dann spontan zerfällt unter Bildung von Kohlendioxid, Ammoniak, Chlorid und des Aldehyds. Dabei scheint bei niedrigem pH (<5) hauptsächlich die Bildung von Dichloraminen, bei höherem pH (>8) die Bildung von Monochloraminen zu erfolgen (59), die ihrerseits ebenfalls reaktive Verbindungen darstellen.

Bei der Reaktion von Hypochlorsäure mit schwefelhaltigen Verbindungen, wie zum Beispiel Cystein oder Glutathion, kommt es zu oxidativen Prozessen am Schwefelatom. Bringt man Hypochlorsäure mit Methionin zur Reaktion, so wird die Thioethergruppe schon durch geringe Konzentrationen an Hypochlorsäure oxidiert, wobei Methioninsulfoxid entsteht (71, 72). Erst bei deutlich höheren Konzentrationen an Hypochlorsäure erfolgt die Decarboxylierung der Aminogruppe des Methionins (71). Im Vergleich zu Aminogruppen sind schwefelhaltige Gruppen bei gleichen Konzentrationsverhältnissen wesentlich (ca. 100fach) reaktiver gegenüber Hypochlorsäure (57). Bei Reaktion von HOCl mit Proteinen kommt es daher zur oxidativen Modifikation freier funktioneller Gruppen in folgender Reihenfolge: Zunächst werden alle freien Sulfhydryl-, dann alle freien Methionylgruppen modifiziert. Erst danach werden auch die freien Aminogruppen nitrosiliert (73). Daher werden insbesondere Enzyme mit funktionell bedeutsamen Sulfhydrylgruppen durch HOCl inaktiviert (61). Enzyme mit einem hohen Anteil an funktionell relevanten Sulfhydrylgruppen sind die Alkoholdehydrogenase, die Laktatdehydrogenase, die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, die Hexokinase und die Aldolase II (74). Auch die katalytische Funktion der MPO selbst ist an freie Sulfhydrylgruppen gebunden. Eine Autoinaktivierung der MPO durch die von ihr synthetisierte HOCl wird diskutiert (75).

Wasserstoffperoxid, H_2O_2 : H_2O_2 ist, ebenso wie HOCl, in der Lage freie Sulfhydrylgruppen zu oxidieren. Allerdings ist H_2O_2 wesentlich weniger reaktiv als HOCl (60) und oxidiert, im Gegensatz zu dieser, nur Sulfhydrylgruppen bestimmter Proteine. So wurde gezeigt, dass H_2O_2 spezifisch freie Sulfhydrylgruppen der Glyceraldehyd-3-Dehydrogenase oxidiert (74). Darüber hinaus dient H_2O_2 als Ausgangspunkt zur Bildung weiterer Substanzen mit höherer Reaktivität: In Anwesenheit von Ionen der Zwischenelemente reagiert H_2O_2 gemäß der Fenton-Reaktion zur Bildung von Hydroxylradikalen, die einen großen Teil seiner schädigenden Wirkung vermitteln (vgl. oben). Aus H_2O_2 und Chloridionen produziert die granulozyten-spezifische Myeloperoxidase die hochreaktive Hypochlorsäure (vgl. oben). Überdies wird ein Teil des intrazellulär produzierten H_2O_2 durch Katalase und Glutathion abgebaut, bevor es mit anderen Strukturen reagieren kann (74).

1.6 Aufgabenstellung

Neutrophile Granulozyten spielen bei der akuten Schädigung der pulmonalen Zirkulation im ARDS eine entscheidende Rolle. Ihre Anreicherung in der pulmonalen Mikrozirkulation und im Interstitium gilt als auslösendes Ereignis in der Pathogenese des ARDS. Aktivierte neutrophile Granulozyten können umgebendes Lungengewebe über verschiedene, potentiell pathogene Mechanismen, wie die Freisetzung lysosomaler Enzyme, die Synthese von Prostanoiden und die Generierung hochreaktiver Sauerstoffmetabolite, schädigen.

Das Interesse dieser Arbeit gilt den durch neutrophile Granulozyten produzierten nichtradikalischen Oxidantien, Hypochlorsäure und Wasserstoffperoxid. An einem isolierten perfundierten und ventilierten Lungenmodell soll die kontinuierliche Freisetzung dieser Oxidantien durch folgende Interventionen modellhaft untersucht werden:

- kontinuierliche Infusion von HOCl in einer Dosis von 1000 nmol/min über den arteriellen Schenkel des Modells,
- kontinuierliche Infusion von H₂O₂ in einer Dosis von 1000 nmol/min über den arteriellen Schenkel des Modells,
- kontinuierliche Infusion von H₂O₂ in einer Dosis von 1000 nmol/min über den arteriellen Schenkel des Modells in ein rezirkulierendes MPO-haltiges Perfusat.

Ziel dieser Experimente ist:

- (1) die Charakterisierung der Effekte dieser Modelle für oxidativen Stress auf den pulmonalarteriellen Gefäßtonus und auf die pulmonale Gefäßpermeabilität,
- (2) der Nachweis eines biochemischen Effekts von oxidativem Stress im Gewebe, d.h. der Nachweis von Lipidperoxidationsprozessen durch Nachweis von Endprodukten dieser Reaktionen,
- (3) der Vergleich der eingesetzten Modelle für oxidativen Stress bezüglich der Effekte auf pulmonale Zirkulation und bezüglich des Ablaufens von Lipidperoxidationsprozessen.

Darüber hinaus soll die Gegenüberstellung von Parametern der Schädigung der pulmonalen Zirkulation mit dem Ausmaß der Anreicherung von Lipidperoxidationsprodukten im Lungengewebe Schlussfolgerungen über einen möglicherweise bestehenden kausalen Zusammenhang zwischen Lipidperoxidation und Schädigung der Zirkulation erlauben.

Die Messung des Zeitverlaufs der MPO-Aktivität unter Infusion von H_2O_2 soll durchgeführt werden, um Rückschlüsse auf zu vermutende Inaktivierungsprozesse zu ziehen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Modell der isolierten, ventilierten und perfundierten Kaninchenlunge

Der Versuchsaufbau wurde modifiziert nach dem isolierten Lungenmodell von Knowlton und Starling (26). Die Beobachtung des isolierten Organs bietet den Vorteil, humorale, metabolische und zentralnervöse Einflüsse des Gesamtorganismus weitgehend ausschließen und Anpassungsvorgänge anhand pathophysiologischer und biochemischer Parameter messen zu können.

2.1.1 Versuchsaufbau

Im verwendeten isolierten Organmodell (vgl. Abb. 1) erfolgte die Perfusion der Lunge über einen geschlossenen extrakorporalen Kreislauf mittels einer Peristaltikpumpe (IKA-Schlauchpumpe PA-B1, Janke und Kaukel GmbH Co. KG, Stauffen i.Br.). Dieser wurde von zwei parallel geschalteten Vorratsgefäßen (350 ml, doppelwandig, Glas, Firma Ochs, Göttingen) gespeist, so dass es möglich war, über Dreiwegehähne (pvh Medizintechnik GmbH, Kirchseeon) entweder Perfusat zu verwerfen oder in den Kreislauf einlaufen zu lassen. Die Perfusionslösung (Serrag Wiessner, Naila) wurde der Lunge über einen in der Arteria pulmonalis eingebundenen Katheter zugeführt. Um Embolien zu vermeiden, wurde das Perfusat im zuführenden Schenkel über einen 40 µm Filter (SQ 40S, Pall, Dreieich) und eine Blasenfalle geleitet. Der venöse Abfluss erfolgte über einen Katheter im linken Ventrikel und über ein kaskadenförmiges Leitersystem, das es ermöglichte, durch Umleiten des Perfusatflusses auf die obere Sprosse den pulmonalvenösen Druck um einen definierten Wert zu erhöhen („hydrostatic challenge“).

Über Katheter in der Arteria pulmonalis und im linken Ventrikel wurden der pulmonalarterielle (PAP) und der linksventrikuläre, dem pulmonalvenösen (PVP) Druck entsprechende, kontinuierlich registriert. Das Herzlungenpaket wurde in einer feuchten, 37° C warmen Kammer (doppelwandig, Glas, Firma Ochs, Göttingen) freischwebend über einen Kraftaufnehmer mit Wägezelle (U4, Hottinger Baldwin Messtechnik,

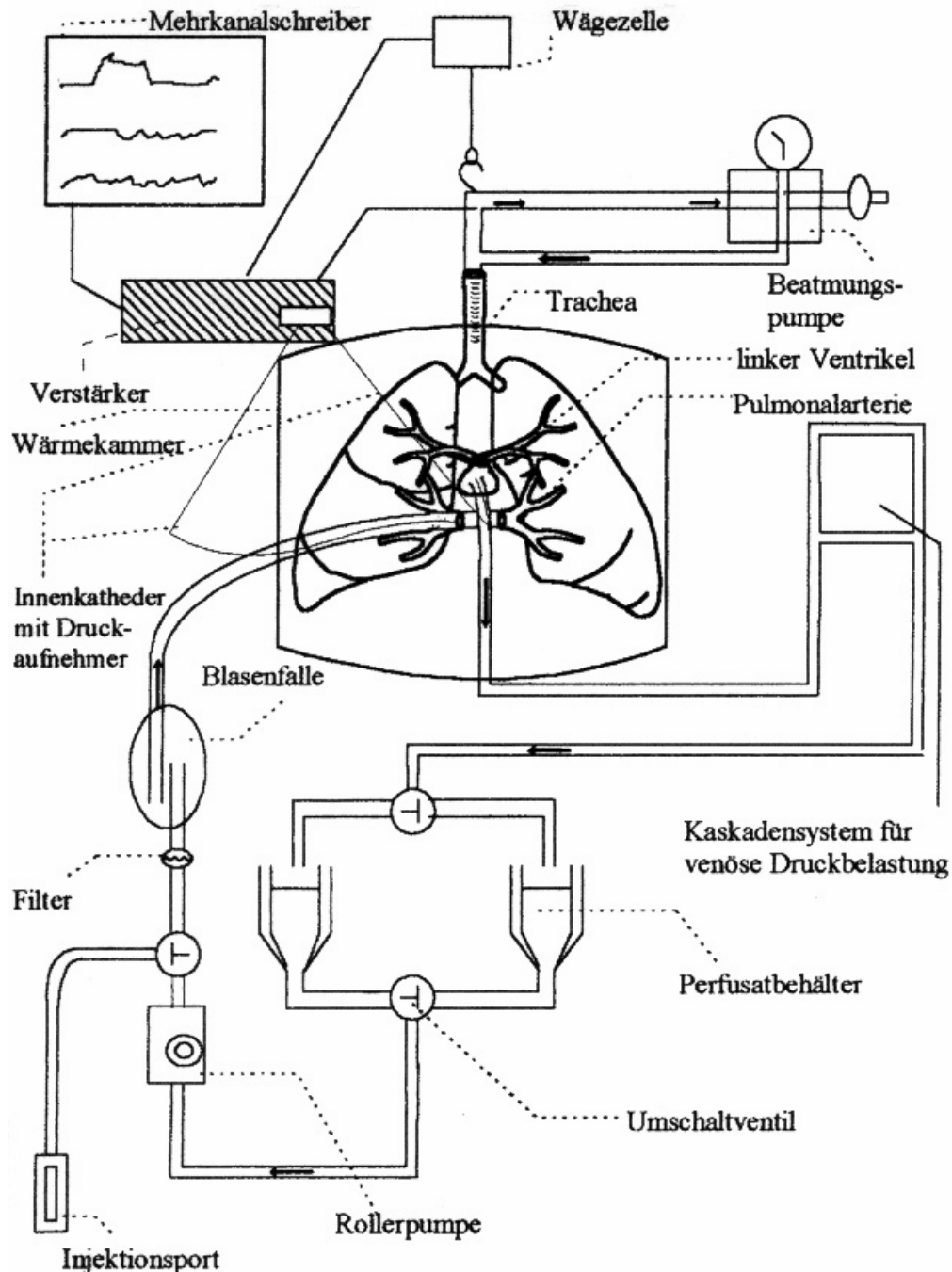


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

Darmstadt) befestigt. Durch elektronische Verstärkung und Anschluss an einen Mehrkanalschreiber (Servogor 960 BBC, Gossen Metrawatt, Nürnberg) wurden PAP, PVP und Lungengewicht über die gesamte Versuchszeit aufgezeichnet.

Zur Temperaturregulierung waren Vorratsbehälter und feuchte Kammer mit einem Wärmetauscher (2219 Multitemp II, LKB-Produkta AB, Bromman, Schweden)

verbunden. Um eine bakterielle Kontamination zu vermeiden, wurden alle Entlüftungseinrichtungen im Perfusionssystem mit hydrophoben, bakteriendichten Filtern der Porengröße 0,2 µm (Millex-FG, Millipore S.A., Molsheim, Frankreich) versehen.

2.1.2 Versuchsvorbereitung

Es wurden ausschließlich gründlich gereinigte und sterilisierte Schlauchsysteme verwendet, um sterile, pyrogenfreie Verhältnisse sicher zu stellen.

Zunächst wurde das Perfusionssystem mit steriler, isotonischer Kochsalzlösung (Fresenius AG, Bad Homburg) blasenfrei befüllt und mit 2 l gespült. Anschließend erfolgte ein Spülgang mit 1 l Krebs-Henseleit-Puffer (KHP, Serag-Wiessner, Naila). Nach dem Entlüften der Katheter zur Druckmessung wurde die Zirkulation abgeschaltet sowie arterieller und venöser Schenkel abgeklemmt, um ein Auslaufen zu verhindern.

2.1.3 Präparation

Vor der eigentlichen Präparation wurde das Kaninchen (Chinchilla-Bastard Kaninchen beiderlei Geschlechts mit einem Gewicht von 2,2 bis 2,6 kg) zunächst sediert, dann intubiert und narkotisiert.

Zur Narkotisierung wurde ein Gemisch aus 30 mg Ketamin-Base (Ketanest, Parke-Davis, Berlin) und 27 mg Xylazin 2 % (Rompun, Bayer, Leverkusen) in 5 ml eingesetzt. Nach Applikation von 1 ml des Narkotika-Gemisches zur Sedierung wurde das Tier mit 1000 IU/kg Körpergewicht Heparin (Liquemin, Hoffmann-LaRoche AG, Grenzach-Wyhlen) antikoaguliert.

Zur Präparation wurde das Kaninchen auf den Rücken gelagert, das Fell über der Trachea entfernt und die Trachea mit 5 ml Lidocain 2 % (Xylocain, Astra Chemicals GmbH, Wedel) lokal anästhesiert.

Anschließend wurde das Präparationsgebiet über Thorax und Abdomen vom Fell befreit und mit Braunoderm (Braun Melsungen AG, Melsungen) desinfiziert. Daraufhin

erfolgten die Tracheotomie und die Beatmung mit Raumluft über einen Kleintierrespirator (Rodent Ventilator, Hugo Sachs Elektronik KG, March/Freiburg) mit einem Atemzugvolumen von 30 ml und einer Frequenz von 30/min. Nach Gewährleistung der Beatmung wurde die Narkose unter Kontrolle der Herzfrequenz maximal vertieft, indem alle 15 Sekunden 0,1 ml des Narkotikagemisches appliziert wurden, bis zu einer Gesamtmenge von 5 ml.

Ausgehend vom Xyphoid, wurde die Haut über Thorax und Abdomen entlang präformierter Stichkanäle entfernt. Nach Eröffnung des Abdomens wurde das Xyphoid mit einer Kocher-Klemme (alle Instrumente Aesculap, Tuttlingen) gefasst und eine quere Oberbauchlaparotomie durchgeführt. Der sternale Zwerchfellansatz wurde mit einer gebogenen Pinzette unterfahren, mit einer Darmklemme gefasst und vom Sternum abgetrennt. Danach konnte der Thorax unter leichtem Zug am Zwerchfell eröffnet werden, wobei die Lunge kollabierte. Nach Durchtrennung des Diaphragmas am Thorax wurden Nervi phrenici und Oesophagus durchtrennt, unter Erhaltung von Vena cava und Aorta.

Vorderes Mediastinum und Herz wurden schonend von der Brustwand gelöst und das Sternum mit einer Knochenschere median durchtrennt. Nun konnten der Thymus stumpf abpräpariert und das Perikard vorsichtig entfernt werden.

Um Aorta und Pulmonalarterie wurde vorgeknüpfte Fäden gelegt, dann der rechte Ventrikel unterhalb der Klappenebene eingeschnitten und ein Katheter unter minimalem Perfusatfluss in die Pulmonalarterie eingebunden. Nach Resezieren der Herzspitze wurde die Aorta ligiert und der Beatmungsluft CO₂ beigemischt, um nach Wegfall der Körperperipherie den pH konstant zu halten.

Zur weiteren Präparation wurde die Lunge aus dem Brustkorb genommen und an einem Stativ befestigt. Die Wand des rechten Ventrikels wurde größtenteils entfernt, ebenso die Mitralklappe. Um wechselnde Füllungszustände zu vermeiden, wurde das linke Herzohr ligiert. Dann wurde der Adapter für den venösen Abfluss mittels einer Tabaksbeutelnaht in den linken Ventrikel eingenäht.

Schließlich wurde die Lunge in der feuchten Kammer freischwebend befestigt, der Perfusionskreislauf durch Aufstecken des venösen Abflusses geschlossen und der Perfusatfluss auf 25 ml/min eingestellt.

2.1.4 Kalibrier- und Aufwärmphase

Der venöse Schenkel des geschlossenen Kreislaufs wurde entlüftet. Die Katheter zur Druckmessung wurden über Dreiwegehähne an Druckaufnehmern (Combitrans-Einwegtransducer, Braun Melsungen AG, Melsungen) angeschlossen und ebenfalls entlüftet. Der Luftdruck in Hilushöhe wurde als 0 mmHg definiert und die Druckaufnehmer entsprechend kalibriert.

Während der Aufwärmphase wurde die Perfusionsstärke nach folgendem Schema gesteigert: bei 15° C auf 50 ml/min, bei 25° C auf 75 ml/min und bei 35° C auf 100 ml/min. Bei 20° C, 37° C, sowie nach jedem Perfusivwechsel wurde der pH-Wert bestimmt und gegebenenfalls durch Veränderung des CO₂-Gehaltes der Beatmungsluft im physiologischen Bereich konstant gehalten.

Sobald 37° C erreicht waren, wurde das Perfusiv gewechselt und der linksventrikuläre Druck anhand des höhenverstellbaren Kaskadensystems auf 2 mmHg eingestellt.

2.1.5 Steady-state-Phase

Die 30minütige Steady-state-phase ist charakterisiert durch gleichbleibende Perfusions- und Ventilationsbedingungen. Für die Versuche wurden nur Lungen eingesetzt, die während des Aufwärmens Gewicht verloren hatten, homogen entblutet waren, kein erkennbares Ödem zeigten, keinen Perfusivverlust an den Einbindungsstellen aufwiesen und während der Steady-state-Phase sowohl im Gewichts- als auch im Druckverlauf stabil blieben.

2.1.6 Physiologische Messgrößen und –technik

2.1.6.1 Messung des pulmonalarteriellen und des pulmonalvenösen Druckes

Die Perfusionsdrucke in der Pulmonalarterie (pulmonalarterieller Druck, PAP) und im linken Ventrikel (pulmonalvenöser Druck, PVP) werden über dünnlumige Katheter und

über Druckwandler (Messbereich: -50 mmHg bis 300 mmHg, Empfindlichkeit: $5\mu\text{V/V}\cdot\text{mmHg}$) gemessen, von einem Messverstärker elektronisch verstärkt und mittels eines Schreibers kontinuierlich aufgezeichnet (vgl. oben).

2.1.6.2 Bestimmung des kapillären Filtrationskoeffizienten ($K_{f,c}$)

Der $K_{f,c}$ ist ein Maß für die Permeabilität der Kapillarwand, das errechnet werden kann. Unter physiologischen Bedingungen stehen Filtration und Reabsorption im Gleichgewicht. Wird dieses gestört, entstehen Volumenverschiebungen zwischen interstitiellem und intravasalem Raum.

Es gilt folgender Zusammenhang:

$$I_v = K_{f,c} \cdot [(p_a - p_i)] - \sigma \cdot (\pi_a - \pi_i) \quad (1)$$

I_v : pro Zeit über eine Grenzfläche diffundierendes Volumen

p_a : hydrostatischer Druck in den Kapillaren

p_i : hydrostatischer Druck im Interstitium

π_a : kolloidosmotischer Druck des Perfusats

π_i : kolloidosmotischer Druck der interstitiellen Flüssigkeit

σ : Reflektionskoeffizient

Bei einem Ungleichgewicht zwischen Filtration und Reabsorption gilt $\sigma=0$, d. h. I_v ist ausschließlich abhängig von der Druckdifferenz zwischen Interstitium und Intravasalraum.

Somit gilt für den $K_{f,c}$

$$K_{f,c} = \frac{I_v}{\Delta p} \quad (2)$$

Da I_v der Gewichtszunahme der Lunge ΔW pro Zeiteinheit Δt entspricht, stellt I_v eine bestimmbare Messgröße dar.

$$I_v = \frac{\Delta W}{\Delta t \cdot \rho} \quad (3)$$

ρ : Perfusatdichte, [$\rho=1\text{g/cm}^3$]

Daraus ergibt sich

$$K_{f,c} = \frac{\Delta W}{\Delta t \cdot \rho \cdot \Delta p} \quad (3) \text{ in } (2)$$

Um den $K_{f,c}$ experimentell bestimmen zu können, wurde das in der Steady-state-Phase entstandene Gleichgewicht ($\Delta p=0$) gestört, indem der linksventrikuläre und damit intrakapilläre Druck für 8 Minuten um 10 cm H₂O erhöht wurde („hydrostatic challenge“) (76). Dies führte zu einem Volumenstrom aus den Kapillaren ins Interstitium, der bis zum Erreichen des neuen Gleichgewichts pro Zeiteinheit um den selben Prozentsatz abnahm.

Somit ergibt sich für die Zeitabhängigkeit des $K_{f,c}$ eine Exponentialfunktion:

$$K_{f,c}(t) = K_{f,c} \cdot e^{-k \cdot t} \quad \text{und} \quad K_{f,c}(0) = K_{f,c}$$

e : Basis der natürlichen Logarithmen $e=2,718\dots$

k : Proportionalitätsfaktor

Da zu Beginn der „hydrostatic challenge“ ein überproportional hoher Gewichtszuwachs durch druckpassive Füllung der Gefäße (Compliance) stattfand, konnte bei $t=0$ min I_v nicht aus der Steigung der Gewichts-Zeit-Kurve ermittelt werden. Daher bestimmte man $I_v(t)$ zu den Zeitpunkten $t=3,4,5,6,7,8$ min, errechnete die entsprechenden Werte für $K_{f,c}(t)$ und logarithmierte diese. Danach wurde eine Regressionsgerade durch diese Werte gelegt und der $K_{f,c}$ als deren Steigung bestimmt. Das Ergebnis wurde

delogarithmiert und auf das Lungenfeuchtgewicht (wet weight lung, WWL) bezogen, das anhand des Körpergewicht (Body weight, BW) berechnet wurde.

$$\text{WWL (g)} = \text{BW (g)} \cdot 0,0024 \quad (77)$$

Der $K_{f,c}$ wird in $\text{cm}^3/\text{s} \cdot \text{cm H}_2\text{O} \cdot \text{g}$ angegeben.

2.1.6.3 Bestimmung der Compliance (C)

Als Compliance bezeichnet man die druckpassive Gefäßfüllung nach Erhöhung des intravasalen hydrostatischen Druckes. Zu ihrer Bestimmung wurde an die Gewichts-Zeit-Kurve bei $t=2$ min eine Tangente angelegt und die Zunahme des Lungengewichts auf $t=0$ extrapoliert. Dieser Wert wurde auf die Druckerhöhung bezogen (76).

Für C gilt also

$$C = \text{g/cm H}_2\text{O}$$

2.1.6.4 Bestimmung der Retention (ΔW)

Die Retention ΔW ist die irreversible Gewichtszunahme der Lunge, verursacht durch eine „hydrostatic challenge“.

Nach Senkung des linksventrikulären Druckes auf seinen Ausgangswert nahm auch das Lungengewicht stetig ab, bis sich wiederum ein Gleichgewicht einstellte. Da diese Zeitspanne variierte, wurde die Retention dann bestimmt, wenn das Lungengewicht seinen niedrigsten Wert erreicht hatte.

2.2 Versuchsprotokoll und Versuchsgruppen

Der Versuchsablauf ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Nach einer 30minütigen Aufwärmphase (steady-state) und einer „hydrostatic challenge“ zur Bestimmung der Ausgangswerte wurde bei $t=0$ die kontinuierliche Applikation von HOCl oder H_2O_2 in den arteriellen Schenkel der Präparation begonnen (HOCl- bzw. H_2O_2 -Gruppe). Dazu wurden HOCl und H_2O_2 so in Perfusionspuffer gelöst, dass bei einer Infusionsgeschwindigkeit 0,5 ml/min eine Dosis von jeweils 1000 nmol/min erreicht wurde. Bei einem Perfusatfluss von 100 ml/min entspricht dies einer

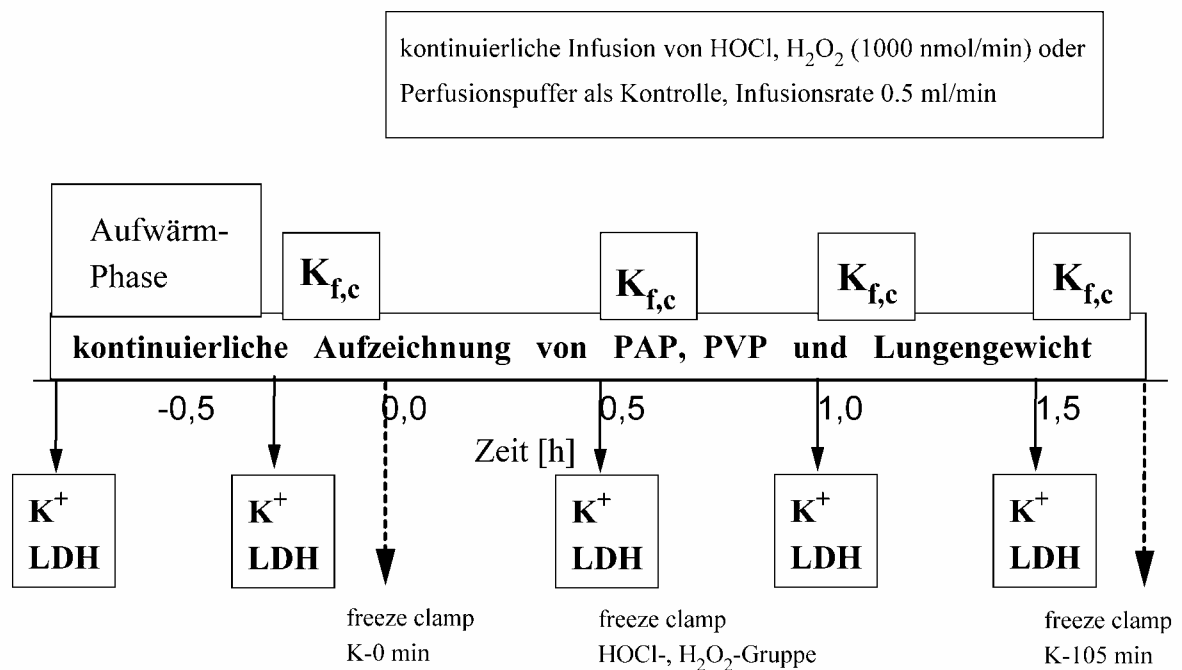


Abbildung 2:

Darstellung des Versuchsprotokolls. $K_{f,c}$: Durchführung einer „hydrostatic challenge“, d.h. einer 8minütigen Erhöhung des venösen Druckes um 10 cmH₂O zur Ermittlung von $K_{f,c}$, Flüssigkeitsretention und vaskulärer Compliance. LDH, K^+ : Perfusatentnahme zur Messung des Kaliumspiegels und der Laktatdehydrogenase-Aktivität.

Perfusatkonzentrationen von $10 \mu\text{M}$. Die Bestimmung der HOCl- bzw. H_2O_2 -Perfusatkonzentration im venös entnommenen Perfusat zeigte, dass die gesamte infundierte Stoffmenge während der ersten Passage im isolierten Organ gebunden wurde.

In Kontrollen wurde über die gesamte planmäßige Versuchszeit von $T=0$ bis 105 min Perfusionspuffer ohne Oxidans infundiert (K-105).

Zu den Zeiten $t=30, 60, 90$ min wurden jeweils $K_{f,c}$, Compliance und Retention ermittelt. Die Aufzeichnung von Lungengewicht, PAP und PVP erfolgte über die gesamte Versuchszeit kontinuierlich.

Die Versuche wurden nach 105 min oder vorzeitig bei einer Ödembildung von 50 g beendet. Unmittelbar zu Versuchsende wurde Lungengewebe zur späteren Analytik rasch in flüssigem Stickstoff gefroren. Als weitere Kontrolle diente eine Versuchsgruppe mit Beendigung des Versuchs unmittelbar zum Zeitpunkt $t=0$ (K-0).

Zu den Zeitpunkten $t=-45, -15, 30, 60, 90$ min wurden Perfusatproben entnommen, um anhand des Kalium- und Laktatdehydrogenasespiegels eine schwere Zellschädigung mit Zytolyse auszuschließen.

2.3 Biochemische Analytik

Gefrorenes Lungengewebe wurde bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und zur Analyse in eisgekühltem Puffer homogenisiert. Das Homogenat wurde bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit 3000 Umdrehungen/min 5 Minuten lang zentrifugiert. Im Überstand wurden Proteinkonzentration und Produkte der Lipidperoxidation bestimmt.

2.3.1 Proteinkonzentration im Gewebehomogenat

Die Proteinkonzentration des Homogenats wurde nach einer absorptionsphotometrischen Methode nach Lowry (78) bestimmt. Ein fertiger Testkit wurde von Sigma (München) bezogen. Als Standard diente humanes Serumalbumin.

2.3.2 Lipidperoxidationsprodukt – Malonaldehyd (MDA)

Als Produkt der Lipidperoxidation (LPO) wurde der Gewebegehalt an Malonaldehyd (MDA) mittels eines Testkits von Calbiochem-Novabiochem GmbH (Schwalbach) bestimmt. Dieser Testkit basiert auf einem chromogenen Reagens, das mit MDA bei 45°C reagiert, wobei ein stabiles Chromophor gebildet wird mit einem Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 586 nm. Die MDA-Konzentration im Gewebehomogenat wurde auf den Proteingehalt bezogen. Der Gewebegehalt an MDA wird in nmol/mg Protein angegeben.

2.3.3 Kalium und LDH-Aktivität im Perfusat

Die Messungen von Kalium und LDH-Aktivität im Perfusat wurden mit kliniksüblichen Routinemethoden im Institut für Klinische Chemie durchgeführt.

2.3.4 HOCl-Konzentration und H₂O₂-Konzentration

Die Konzentration der Stammlösungen der eingesetzten Oxidantien wurde jeweils vor Versuchsbeginn bestimmt. Die Messung erfolgte absorptionsphotometrisch. Die molaren Extinktionskoeffizienten für HOCl und H₂O₂ betragen $\epsilon_{290\text{ nm}}=350\text{ mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ und $\epsilon_{230\text{ nm}}=75\text{ mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

2.3.5 Perfusat-Myeloperoxidase (MPO) Aktivität

Die MPO-Aktivität des Perfusats wurde absorptionsphotometrisch nach einer Methode von Klebanoff et al. (79) bestimmt. 100 μl Perfusat werden mit 2,9 ml Testlösung versetzt. Diese Testlösung wird täglich folgendermaßen neu angesetzt: 26,9 ml H₂O, 3,0 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer, 0,1 ml 0,1 M H₂O₂ und 0,048 ml Guaiacol. Die Bildung von Tetra-Guaiacol wurde 5 min lang absorptionsphotometrisch bei einer Wellenlänge von 470 nm gemessen (molarer Extinktionskoeffizient $\epsilon_{470\text{ nm}} = 26,6\text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

2.4 Statistische Methoden

Die Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwerte angegeben. Die Signifikanzanalysen wurden anhand des Student-t-Tests für unabhängige Stichproben durchgeführt. Bei Mehrfachtestung wurde eine Bonferoni-Korrektur durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Beeinflussung der pulmonalen Zirkulation durch HOCl, H₂O₂ und MPO-H₂O₂

3.1.1 Pulmonalarterieller Druck

Die Einflüsse der untersuchten Modelle für oxidativen Stress (kontinuierliche Infusion von HOCl oder H₂O₂, sowie die Infusion von H₂O₂ in ein MPO-haltiges Perfusat) auf den PAP sind in den Abbildungen 3 bis 5 zusammengefasst.

Wie in Abbildung 3 ersichtlich, bestehen hinsichtlich der Ausgangswerte des PAP zwischen Versuchs- und Kontrollgruppen keine Unterschiede. Der PAP zum Zeitpunkt t=0 min liegt in allen Gruppen zwischen 5 und 6 mmHg. Die kontinuierliche Applikation von H₂O₂, HOCl und die Applikation von H₂O₂ in ein MPO-haltiges Perfusat rufen unterschiedliche Druckreaktionen hervor. Während Infusion von H₂O₂ zu einem frühen zweigipfligen Druckanstieg führt, zeigt sich unter Infusion von HOCl ein später Anstieg des PAP. Das Ausmaß des Druckanstieges liegt in der HOCl-Gruppe über dem in der H₂O₂-Gruppe. So wird in der HOCl-Gruppe ein maximaler PAP von ca. 12,8±1,5 mmHg erreicht, während in der H₂O₂-Gruppe erstes und zweites Druckmaximum bei 8,0±1,0 mmHg bzw. 9,3±1,1 mmHg liegen (vgl. Abbildung 3 und 4). In der MPO-Gruppe wird eine Druckreaktion beobachtet, die zwischen denen der HOCl- und H₂O₂-Gruppe liegt. Der Druckanstieg beginnt wie in der H₂O₂-Gruppe früh, zeigt jedoch nicht den in der H₂O₂-Gruppe beobachteten zweigipfligen Verlauf. Wie in der HOCl-Gruppe steigt der PAP kontinuierlich an und erreicht das Maximum von 11,9±1,5 mmHg spät.

Während in der H₂O₂-Gruppe nach Überschreitung der Druckmaxima, d. h. nach ca. 5 bzw. 39±5 min (vgl. Abbildung 5) ein bis zum Ende der Versuchszeit von nahezu 105 min fallender PAP vorgefunden wird, sinkt der PAP in den Experimenten der HOCl-Gruppe und der MPO-Gruppen nach Erreichen des Druckmaximums, d. h. nach 50,6±3,8 min bzw. 71,7±14,2 min nicht.

In der HOCl-Gruppe kam es in allen Experimenten im Mittel nach 72 ± 6 min (vgl. Abbildung 6) zur vorzeitigen Beendigung des Versuchs wegen schwerer Ödembildung (vgl. 3.1.2). Dies wurde in den Experimenten der H_2O_2 - und der MPO-Gruppe nur selten und dann erst später beobachtet, im Mittel nach $104,0\pm 1,1$ min bzw. $97,3\pm 5,2$ min.

In der pufferperfundierte Kontrollgruppe (K-105) findet sich keine Druckänderung. Die Versuche wurden nach der planmäßigen Versuchszeit von 105 min beendet.

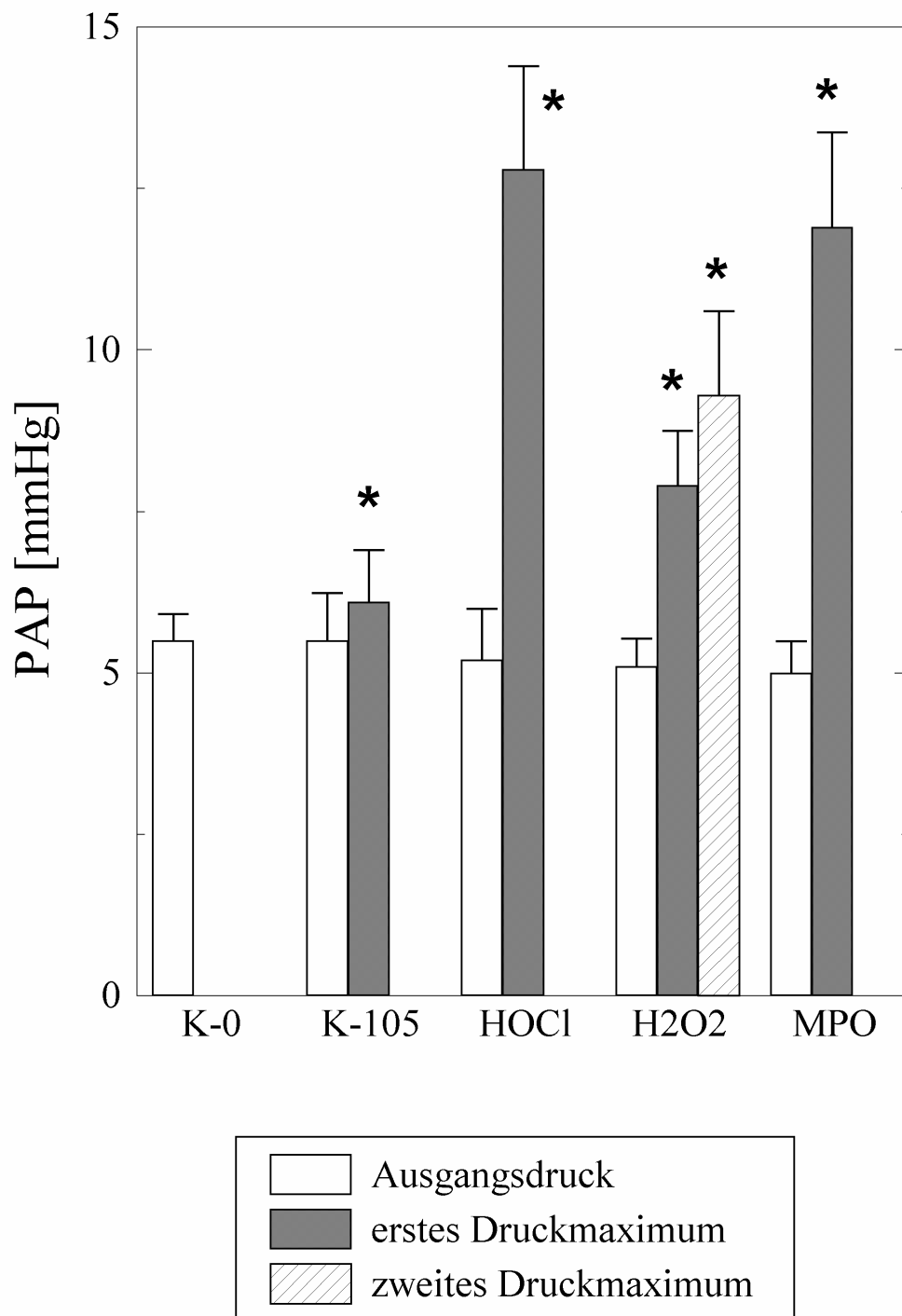


Abbildung 3: Ausgangs- und Maximalwerte des PAP in den Kontrollgruppen K-0 und K-105 sowie in der HOCl-, H₂O₂- und MPO-Gruppe. Angaben als Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwerte. * : $p < 0,05$ vs. Kontrolle

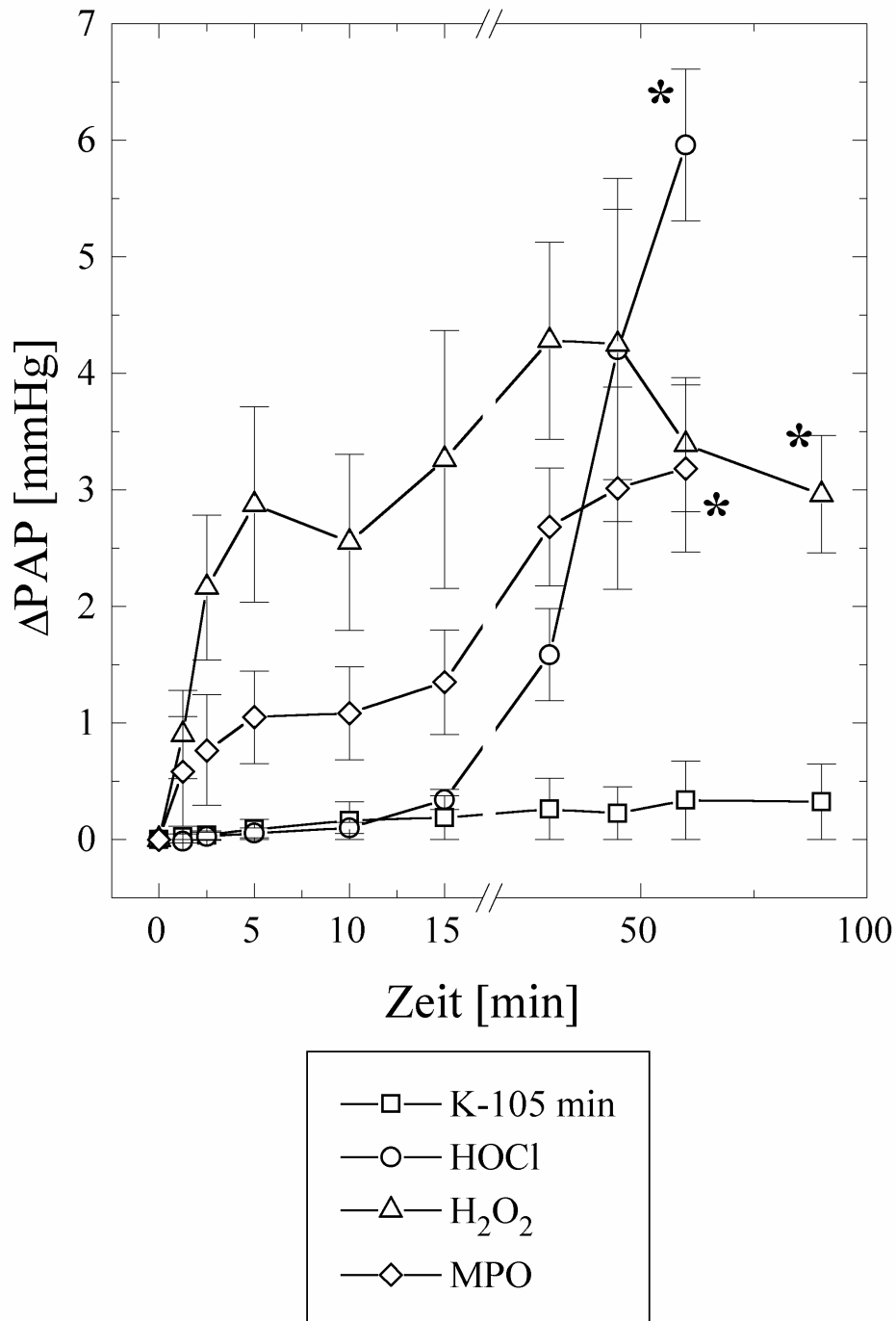


Abbildung 4: Zeitverlauf des pulmonalarteriellen Druckes unter Infusion von H₂O₂, HOCl bzw. Puffer als Kontrolle. Angaben als Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte. * : p<0,05 vs. Kontrolle

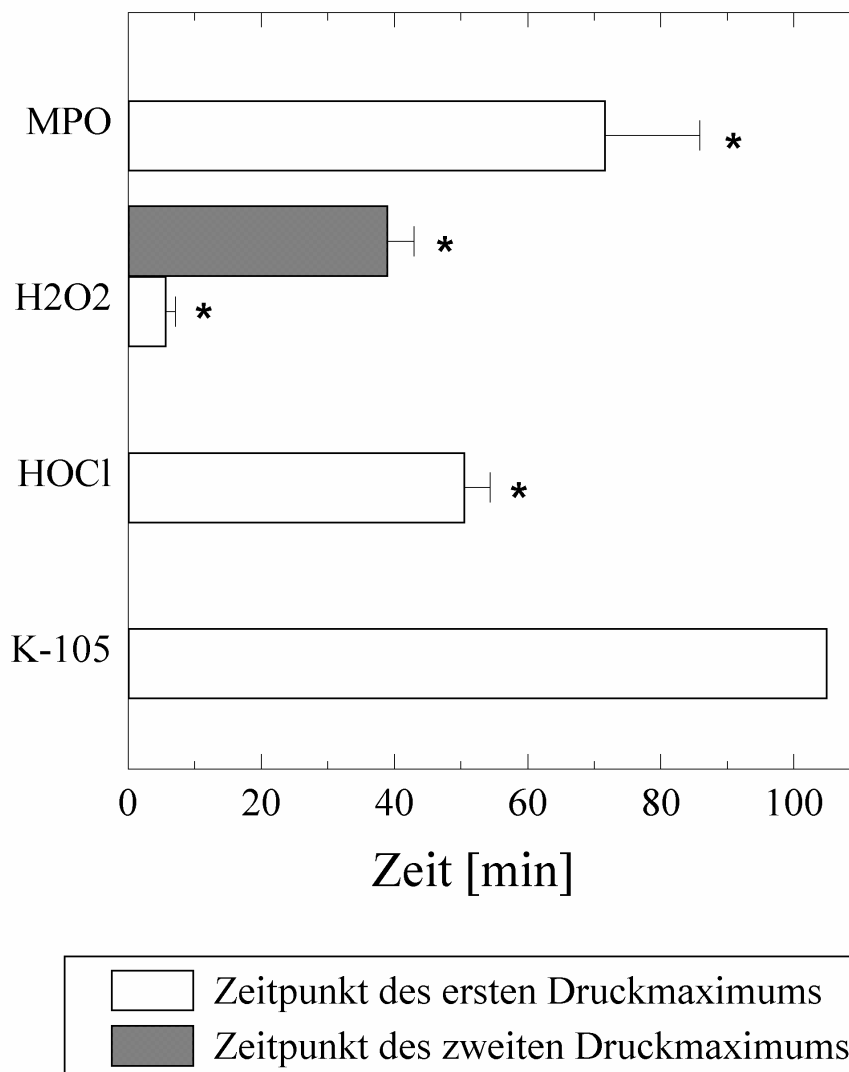


Abbildung 5: Zeiten der Druckmaxima in den Kontrollgruppen K-0 und K-105 sowie in der HOCl-, H₂O₂- und MPO-Gruppe. Angaben als Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte. * : p<0,05 vs. Kontrolle

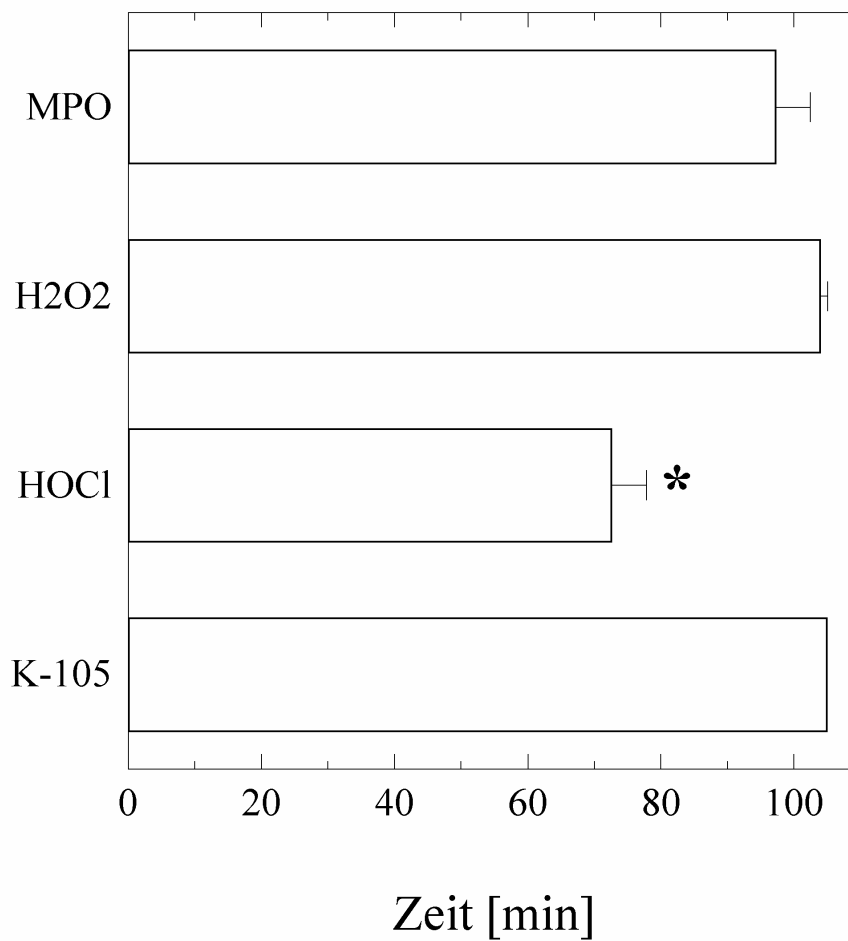


Abbildung 6: Gesamte Versuchsdauer in den Kontrollgruppen K-0 und K-105 sowie in der HOCl-, H₂O₂- und MPO-Gruppe. Angaben als Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwerte. * : $p < 0,05$ vs. Kontrolle

3.1.2 Parameter der „hydrostatic challenges“

Die Daten, die aus den „hydrostatic challenges“ errechnet wurden, kapillärer Filtrationskoeffizient, Flüssigkeitsretention und vaskuläre Compliance sowie die gesamte Flüssigkeitsretention während eines Versuches sind für alle Versuchsgruppen in den Tabellen 1 bis 3 zusammengefasst.

Tab.1: $K_{f,c}$ in den Kontroll- und Versuchsgruppen. Angaben als Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwerte. *: $p < 0,05$ vs. Kontrolle

Versuchsgruppe	Hydrostatic challenge			
	t=-15 min	t=30 min	t=60 min	t=90 min
	$K_{f,c} [10^{-4} \cdot \text{cm}^3 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm H}_2\text{O}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}]$			
K-0	1.25 \pm 0.081			
K-105	1.33 \pm 0.077	1.40 \pm 0.081	1.35 \pm 0.085	1.32 \pm 0.088
HOCl	1.23 \pm 0.11	2.03 \pm 0.70*	6.34 \pm 1.2*	
H ₂ O ₂	1.25 \pm 0.074	2.10 \pm 0.32*	3.10 \pm 0.62*	7.80 \pm 2.8*
MPO	1.14 \pm 0.061	2.43 \pm 0.45*	4.84 \pm 2,15*	5,12 \pm 2.3*

Bei Versuchsbeginn unterschied sich der $K_{f,c}$ der verschiedenen Gruppen, der als ein Maß für die Gefäßpermeabilität bestimmt wurde, nicht signifikant. In den mit Puffer perfundierten Kontrollgruppen, trat auch im Zeitverlauf keine signifikante Veränderung ein. Unter dem Einfluss von HOCl stieg der $K_{f,c}$ vergleichsweise rasch nach t=60 min auf das 5fache des Ausgangswertes, während die Infusion von H₂O₂ zu einem langsameren Anstieg des $K_{f,c}$ auf das 6fache des Ausgangswertes nach 90 min führte. In der MPO-Gruppe lag der $K_{f,c}$ nach 60 min zwischen dem der HOCl- und dem der H₂O₂-Gruppe. Die Gefäßpermeabilität stieg also rascher als in der H₂O₂- und langsamer als in der HOCl-Gruppe. Nach 90 min lag der $K_{f,c}$ der MPO-Gruppe unter denen dieser beiden Gruppen.

Die Flüssigkeitsretention während einer „hydrostatic challenge“ stellt ebenso wie der $K_{f,c}$ ein Maß für die Gefäßpermeabilität dar. Der Ausgangswert dieses Parameters war in allen Versuchsgruppen vergleichbar (vgl.Tab.2). Die Retention änderte sich unter Perfusion mit Puffer (K-105) nicht signifikant. Kontinuierliche Applikation von HOCl führte zu einem Anstieg der Retention, die nach 30 min das 2-3fache und nach 60 min das 20fache ihres Ausgangswertes erreicht hatte. Unter Infusion von H_2O_2 stieg die Retention bei $t=30$ min ebenfalls auf das 2-3fache, bei $t=60$ min auf das 5fache und bei $t=90$ min auf das 11fache des Ausgangswertes an. Der Anstieg der Retention verlief unter der Einwirkung von HOCl steiler und erreichte einen höheren Endwert als unter der Infusion von H_2O_2 . In der MPO-Gruppe verhielt sich die Flüssigkeitsretention annähernd so wie in der H_2O_2 -Gruppe.

Tab. 2: Flüssigkeitsretention in den Kontroll- und Versuchsgruppen. Angaben als Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwerte. *: $p < 0,05$ vs. Kontrolle

Versuchsgruppe		Hydrostatic challenge			
		t=-15 min	t=30 min	t=60 min	t=90 min
	$\Delta W_{tot}[g]$	$\Delta W [g]$			
K-0		1.9 \pm 0.12			
K-105	2.5 \pm 0.05	1.7 \pm 0.13	1.2 \pm 0.15	1.8 \pm 0.09	1.7 \pm 0.11
HOCl	>50.0	1.7 \pm 0.34	4.1 \pm 1.8*	34.3 \pm 16.5*	
H_2O_2	>50.0	1.7 \pm 0.11	4.5 \pm 0.93*	8.1 \pm 2.6*	18.6 \pm 7.10*
MPO	46.3	1.8 \pm 0.14	5.2 \pm 1.5*	8.2 \pm 2.7*	12.3 \pm 5.2*

Die gesamte Zunahme des Lungengewichts betrug am Versuchsende in der H_2O_2 - sowie in der HOCl-Gruppe mehr als 50 g, in der MPO-Gruppe knapp unter 50 g und führte in der HOCl-Gruppe stets und in der MPO-Gruppe häufiger als in der H_2O_2 -Gruppe zu einer vorzeitigen Beendigung der Versuche. In der pufferperfundierte Kontrollgruppe (K-105) fiel der gesamte Gewichtszuwachs mit 2,5 \pm 0,05 g gering aus.

Die Ausgangswerte der vaskulären Compliance wiesen zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen keinen wesentlichen Unterschied auf. Auch im weiteren Verlauf trat in den Versuchs- und Kontrollgruppen keinerlei Änderung ein. Die in den Versuchen gefundene Zunahme des Lungengewichts geht somit nicht auf eine vermehrte Gefäßfüllung, welche sich in einer reduzierten vaskulären Compliance niedergeschlagen hätte, zurück, sondern muss als interstitielle und/oder alveoläre Flüssigkeitseinlagerung interpretiert werden. Da in allen Versuchen ein PAP von 18 mmHg nicht überschritten wurde, scheidet ein hydrostatisches Ödem, welches in diesem Lungenmodell erst jenseits eines PAP von 18 mmHg beobachtet wird, als Ursache dieser Flüssigkeitseinlagerung aus (77). Somit muss diese Ödembildung infolge einer gesteigerten mikrovaskulären Permeabilität erklärt werden.

*Tab. 3: Vaskuläre Compliance in den Kontroll- und Versuchsgruppen. Angaben als Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwerte. *: $p < 0,05$ vs. Kontrolle*

Versuchsgruppe	Hydrostatic challenge			
	t=-15 min	T=30 min	t=60 min	t=90 min
	C [g*cm H ₂ O ⁻¹]			
K-0	0.38 \pm 0.04			
K-105	0.32 \pm 0.03	0.33 \pm 0.04	0.34 \pm 0.0	0.34 \pm 0.03
HOCl	0.40 \pm 0.03	0.37 \pm 0.03	0.37 \pm 0.06	
H ₂ O ₂	0.37 \pm 0.02	0.34 \pm 0.02	0.34 \pm 0.02	0.34 \pm 0.03
MPO	0.37 \pm 0.02	0.33 \pm 0.02	0.35 \pm 0.02	0.33 \pm 0.03

3.1.3 MPO-Perfusataktivität in der MPO-Gruppe

Die Abbildung 7 zeigt den Zeitverlauf der im Perfusat der MPO-Gruppe gemessenen Myeloperoxidase-Aktivität. Mit dem Beginn der H_2O_2 -Infusion kommt es zu einem kontinuierlichen Rückgang der MPO-Aktivität im Perfusat von im Mittel 28 U/l auf nahezu null.

Ursache dieser Aktivitätsabnahme könnte eine oxidative Inaktivierung des Enzyms durch sein eigenes Produkt - HOCl - sein. Auf diese Weise würde die entstehende HOCl gebunden, ohne eine Wirkung auf die pulmonale Zirkulation zu entfalten.

Theoretisch sollte die gesamte Menge des infundierten H_2O_2 durch die Myeloperoxidase zu HOCl umgesetzt werden, so dass HOCl mit einer Rate von 1000 nmol/min entstehen könnte. In den Versuchen der MPO-Gruppe spielen sich jedoch neben der erwarteten HOCl-Bildung weitere Prozesse ab. Einerseits oxidiert und inaktiviert, wie oben ausgeführt, offensichtlich ein Teil der generierten HOCl die Myeloperoxidase, andererseits reagiert sicherlich ein Teil des infundierten H_2O_2 direkt mit Zielstrukturen der pulmonalen Zirkulation, ohne der Myeloperoxidase als Substrat zu Verfügung zu stehen. Diese beiden Prozesse führen einerseits dazu, dass die Rate, mit der HOCl entsteht, unter 1000 nmol/min liegt und dass damit die Veränderungen in der pulmonalen Zirkulation geringer ausfallen, als sie in der 1000 nmol/min HOCl-Gruppe beobachtet werden. Andererseits sind auch direkte Effekte des H_2O_2 zu erwarten.

Diese Überlegungen erklären, dass die in der MPO-Gruppe gefundenen Effekt meistens zwischen denen der HOCl- und der H_2O_2 -Gruppe lagen und in ihrem Ausmaß eher etwas geringer waren.

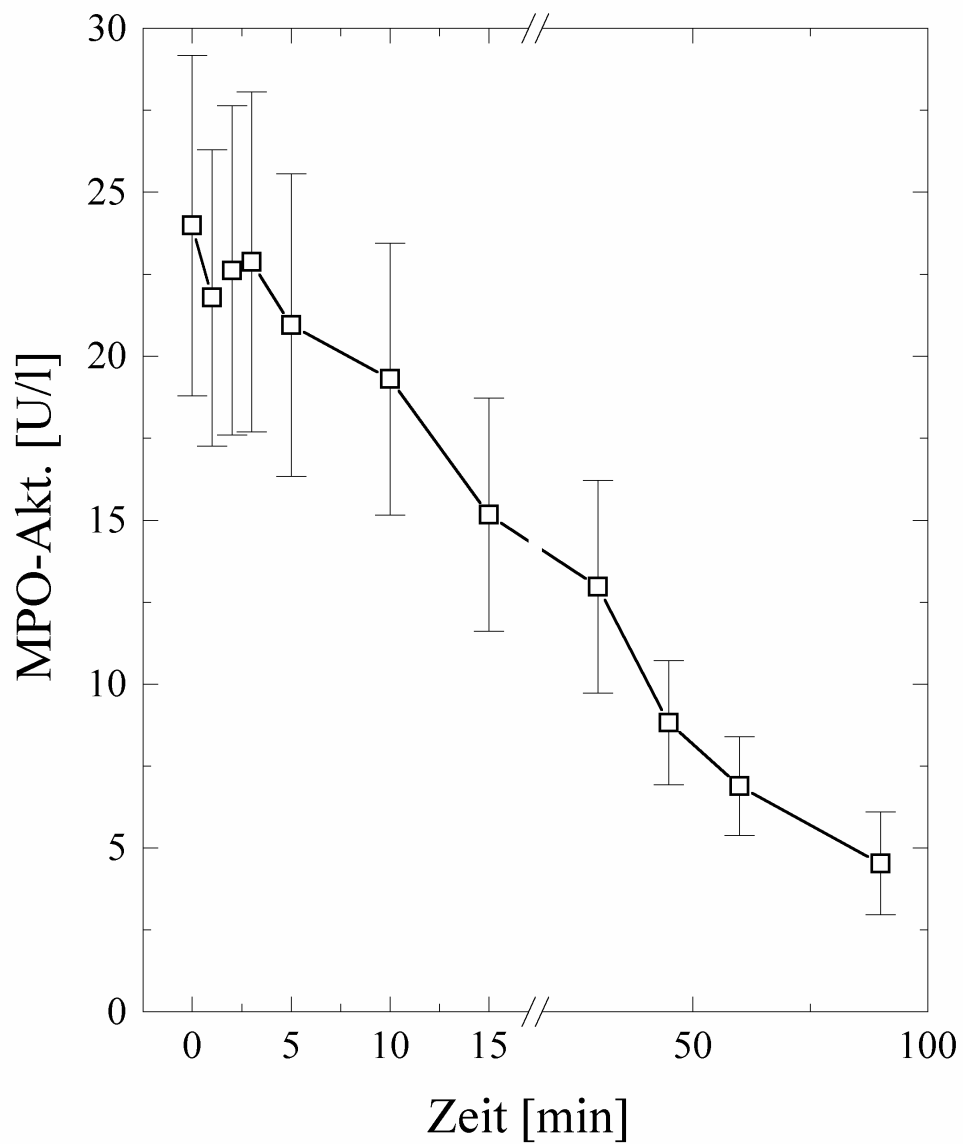


Abbildung 7: Zeitverlauf der Myeloperoxidaseaktivität im Perfusat der MPO-Gruppe.

Angaben als Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwerte.

3.2 Lipidperoxidation

Malonaldehyd (MDA) ist ein Endprodukt von Lipidperoxidationsprozessen. Als ein Maß für die im Lungengewebe abgelaufene Lipidperoxidation ist in Abbildung 8 die Gewebekonzentration an Malonaldehyd (MDA) dargestellt.

Die Kontrollgruppen (K-0 min und K-105 min) unterscheiden sich nicht im Gewebe-MDA-Gehalt. Dieser betrug ca. 1,4 nmol/mg Protein. Unter Kontrollperfusion tritt also offensichtlich keine Lipidperoxidation auf.

Nach kontinuierlicher Applikation von HOCl wurde ein Gewebe-MDA-Gehalt von 2,0 nmol/mg Protein gemessen, der im Vergleich zum Kontrollwert signifikant erhöht ist. Der Gewebe-MDA-Gehalt nach Infusion von H₂O₂ zeigte sich mit 2,1 nmol/mg Protein ebenfalls im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Ebenso führt das H₂O₂-MPO-System in der MPO-Gruppe zu einem signifikant erhöhten Gewebe-MDA-Gehalt von 2,0 nmol/mg Protein. Zwischen dem Gewebe-MDA-Gehalt der HOCl-, H₂O₂- und MPO-Versuchsgruppe besteht kein Unterschied. Ein unterschiedliches Ausmaß an Lipidperoxidation erklärt die beobachteten Unterschiede im Effekt auf die pulmonale Zirkulation, die von den verschiedenen Modellen für oxidativen Stress hervorgerufen werden, also offensichtlich nicht.

3.3 Akute oxidative Lungenschädigung und Lipidperoxidation

In den vorausgegangenen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass verschiedene Modelle für oxidativen Stress durch nichtradikalische Oxidantien, wie die kontinuierliche Infusion von HOCl oder H₂O₂ und die Infusion von H₂O₂ in MPO-haltiges Perfusat, zu einer Schädigung der pulmonalen Zirkulation führen. Diese Schädigung kommt durch unterschiedliche Muster des Anstiegs von PAP und Gefäßpermeabilität zum Ausdruck und ist mit einer Anreicherung des Lipidperoxidationsproduktes MDA im Lungengewebe verbunden. Während sich die verschiedenen untersuchten Modelle für oxidativen Stress hinsichtlich des Schädigungsmusters, d. h. hinsichtlich des Ausmaßes und des zeitlichen Verlaufs des Anstiegs von PAP, K_{f,c} und Flüssigkeitsretention, unterscheiden, bestehen keine Unterschiede im Ausmaß der ablaufenden Lipidperoxidation, gemessen am Gewebe-MDA-Gehalt.

In den Tabellen 4 und 5 sind nun die Korrelationskoeffizienten r und Irrtumswahrscheinlichkeiten p für die Korrelation zwischen maximalem Druckanstieg (vgl. Abbildung 9) bzw. maximalem K_{f,c} (vgl. Abbildung 10) und Gewebe-MDA-Gehalt der einzelnen Versuchsgruppen dargestellt. Dabei zeigt sich, dass in allen Versuchsgruppen für die genannten Parameter der Lungenschädigung keine Korrelation zum Gewebe-MDA-Gehalt besteht. Die im Gewebe ablaufende Lipidperoxidation steht also in den untersuchten Modellen für oxidativen Stress in keinem ursächlichen Zusammenhang zur Schädigung der pulmonalen Zirkulation.

Tab.4: Korrelation zwischen der MDA-Konzentration im Gewebe und dem K_{f,c} max der einzelnen Versuchsgruppen

Versuchsgruppe	Korrelationskoeffizient r	Irrtumswahrscheinlichkeit p
HOCl	-0,53	0,18
H ₂ O ₂	-0,30	0,47
MPO	-0,14	0,79

Tab.5: Korrelation zwischen der MDA-Konzentration im Gewebe und dem $\Delta\text{PAP}_{\text{max}}$ der einzelnen Versuchsgruppen

Versuchsgruppe	Korrelationskoeffizient r	Irrtumswahrscheinlichkeit p
HOCl	0,33	0,42
H ₂ O ₂	0,38 (PAP _{max1})	0,35 (PAP _{max1})
	0,21 (PAP _{max2})	0,62 (PAP _{max2})
MPO	0,027	0,96

4 Diskussion

4.1 Lungenschädigung durch oxidativen Stress – Diskussion des verwendeten Modells

Die Lungenschädigung im Rahmen eines akuten Atemnotsyndroms (ARDS) ist gekennzeichnet durch einen Anstieg der Kapillarpermeabilität, ein nicht-kardiogenes Lungenödem sowie einen Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (11, 16, 23). Obwohl ein ARDS auch bei neutropenischen Patienten beobachtet wurde (85, 86), sind neutrophile Granulozyten an der akuten Lungenschädigung unter anderem durch die Freisetzung reaktiver Sauerstoffmetabolite maßgeblich beteiligt (11-14, 84). Oxidativer Stress, hervorgerufen von neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen, gilt als eine wichtige Endstrecke der akuten Lungenschädigung.

In der Literatur finden sich verschiedene Modelle für akute Lungenschädigung. Beispielsweise zeigen Brigham et al. (16) und Hammerschmidt et al. (31), dass aktivierte neutrophile Granulozyten in der Lunge einen Anstieg der Kapillarpermeabilität und des PAP hervorrufen. Dodd et al. (87) berichten über akute Lungenschädigung nach Ischämie und Reperfusion. In weiteren Studien werden Endotoxin (88), IgG-Immunkomplexe (89) sowie die Aktivierung des Komplement-Systems (90) als Auslöser einer akuten Lungenschädigung eingesetzt. In diesen Studien wird die Beteiligung von oxidativem Stress durch den Nachweis von Lipidperoxidationsprodukten (wie z.B. Malonaldehyd und Hydroxyalkenalen) im Gewebe bzw. durch eine Verringerung des Glutathiongehalts im Gewebe bewiesen. Die beobachteten Effekte können jedoch nicht einem bestimmten Oxidans zugeordnet werden. Überdies sind in den Modellen, in denen neutrophile Granulozyten eingesetzt werden, verschiedene Mechanismen an der beschriebenen Lungenschädigung beteiligt, da neutrophile Granulozyten außer hochreaktiven Sauerstoffmetaboliten auch proteolytische Enzyme (14, 75) und Prostaglandine (91, 92) freisetzen. Daher sollten in dieser Arbeit die biochemischen/biologischen Wirkungen einzelner reaktiver Sauerstoffverbindungen (von H₂O₂, HOCl und MPO/ H₂O₂) untersucht werden. Die Nutzung eines isolierten Organmodells bietet dabei den Vorteil, die Effekte dieser

einzelnen Substanzen auf die pulmonale Mikrozirkulation unabhängig von Reaktionen des Gesamtorganismus zu untersuchen.

Quantitative Analysen von Suspensionen neutrophiler Granulozyten haben ergeben, dass 10^6 maximal stimulierte Neutrophile in zwei Stunden ca. 2×10^{-7} mol HOCl sezernieren (79, 75). Bei dieser Produktionsrate und einem gesamten Perfusatvolumen von 300 ml ist eine Anzahl von $2000 \mu\text{l}^{-1}$ neutrophilen Granulozyten erforderlich, um die in dieser Arbeit verwendete Dosis von $1000 \text{ nmol min}^{-1}$ HOCl freizusetzen. Unter physiologischen Bedingungen stellt dies eine eher niedrig-normale Anzahl dar, die während eines entzündlichen Geschehens, wie einer Sepsis oder einem ARDS, um ein mehrfaches übertroffen wird. In Anbetracht dieser Berechnungen erscheint die Applikation von $1000 \text{ nmol min}^{-1}$ HOCl angemessen.

Die Applikation von 1000 nmol/min HOCl führt bei einem Perfusatfluss von 100 ml/min zu einer Perfusatkonzentration von $10 \mu\text{M}$. Im Vergleich zu anderen Arbeiten handelt es sich dabei um eine niedrige Konzentration. Beispielsweise applizierten Pullar et al. (82) bis zu $50 \mu\text{M}$ HOCl, Fliss (60) und Cochrane (81) $100 \mu\text{M}$ und Schraufstätter et al. (74) bis zu $200 \mu\text{M}$, wobei die Schwelle zur Zytotoxizität mit $20\text{-}30 \mu\text{M}$ HOCl angegeben wird. Die in der Literatur beschriebenen Konzentrationen für H_2O_2 liegen mit 5 mM (74) und $10 \mu\text{M}$ bis 10 mM (83), 20 mM (60) und $25\text{-}1000 \mu\text{M}$ (81) meist ebenfalls höher als die in dieser Arbeit eingesetzten $10 \mu\text{M}$ H_2O_2 . Aufgrund dieser Daten kann man davon ausgehen, dass die beobachteten Effekte durch spezifische Modulation von Molekülen verursacht werden und nicht Ausdruck einer unspezifischen Zytolyse sind. Diese These wird unterstützt durch regelmäßige Probenahmen aus dem rezirkulierenden Perfusat, in denen kein Anstieg der Kalium- und LDH-Konzentration nachweisbar ist.

Da H_2O_2 und HOCl in Perfusatproben aus dem venösen Schenkel ebenfalls nicht messbar sind, kann man davon ausgehen, dass sie während der ersten Lungenpassage vollständig mit Zielstrukturen reagieren.

In vivo lassen sich die Konzentrationen dieser beiden Oxidantien nur sehr schwer messen, da sie sich wegen ihrer hohen Reaktivität in Körperflüssigkeiten nicht stabil halten. Aus diesem Grund rufen reaktive Sauerstoffmetabolite ihre Effekte in unmittelbarer Umgebung ihres Entstehens hervor. Diese lokalen Konzentrationen sind

einer Messung nicht zugänglich. Während einer akuten Lungenschädigung entstehen reaktive Sauerstoffmetabolite in verschiedenen Kompartimenten. Als Quellen reaktiver Sauerstoffmetabolite müssen aktivierte Neutrophile, Makrophagen und Endothelzellen angesehen werden. Makrophagen und Neutrophile migrieren durch das vaskuläre Endothel in das Interstitium und den Intraalveolarraum. Die Freisetzung von Oxidantien erfolgt daher sowohl intravasal, als auch im Interstitium und intraalveolär. Die Infusion der Oxidantien in den arteriellen Schenkel der isolierten Lunge spiegelt zunächst nur die Wirkung der intravasal freigesetzten Oxidantien wider. Primärer Angriffspunkt sollten daher Endothelzellen sein. Inwieweit mit dieser Applikationsart auch Effekte an extravasalen Strukturen (glatte Muskelzellen der Gefäßwand, Interstitium, Alveolarepithel) hervorgerufen werden, hängt entscheidend vom Diffusionsvermögen durch biologische Membranen und der Reaktivität der einzelnen Oxidantien ab (vgl. unten).

4.2 Vergleich der Effekte verschiedener Oxidantien

Betrachtet man die Effekte von HOCl, H₂O₂ und MPO/H₂O₂ auf die pulmonale Mikrozirkulation, so finden sich verschiedene Reaktionsmuster. Die kontinuierliche Applikation von HOCl führt zu einem relativ frühen und steilen Anstieg der Kapillarpermeabilität mit Bildung eines schweren Ödems, während der pulmonal-arterielle Druck erst deutlich später und höher ansteigt als in der H₂O₂-Gruppe. In der H₂O₂-Gruppe zeigt sich dagegen bereits nach einigen Minuten ein zweigipfliger Druckanstieg, wobei der maximale PAP unter dem der HOCl-Gruppe liegt. Der Anstieg der Kapillarpermeabilität erfolgt unter der Infusion von H₂O₂ langsamer und führt später zur Bildung eines Ödems. Die Effekte von MPO/H₂O₂ nehmen eine Mittelstellung ein: der PAP steigt wenige Minuten nach Versuchsbeginn stufenförmig an und erreicht ein Maximum, das über dem der H₂O₂- und unter dem der HOCl-Gruppe liegt. Die Zunahme der Kapillarpermeabilität erfolgt anfangs ebenfalls stärker als unter H₂O₂ und weniger stark als unter HOCl, insgesamt bleibt sie allerdings unter den Maximalwerten dieser beiden Gruppen.

Da HOCl mit einem pKa-Wert von 7,5 bei einem physiologischen pH-Wert ungefähr zu gleichen Teilen ionisiert bzw. als Molekül vorliegt (53), diffundiert HOCl weniger weit als H₂O₂, das nur in Molekülform vorliegt. Außerdem ist HOCl wesentlich reaktiver als H₂O₂ (60), so dass es seine Wirkung in nächster Umgebung entfaltet, während H₂O₂ auch weiter entfernte Strukturen erreicht. Überträgt man diese Überlegungen auf das Modell der isolierten Lunge, in dem die Oxidantien in den arteriellen Schenkel infundiert werden, so kann man davon ausgehen, dass HOCl zuerst hauptsächlich mit Strukturen des Endothels reagiert und erst wenn die endotheliale Schrankenfunktion angegriffen ist die subendotheliale glatte Muskulatur erreicht. Dies wird im früheren Anstieg des K_{f,c} und späteren Anstieg des PAP widerspiegelt. Bei geringerer Reaktivität und besserer Diffusion dringt H₂O₂ recht schnell bis in die Muskularis vor und bewirkt einen frühen Anstieg des PAP.

Die Effekte in der Versuchsreihe mit H₂O₂ und MPO entstehen einerseits durch das zugesetzte H₂O₂ selbst und andererseits durch die vom MPO/H₂O₂-System freigesetzte HOCl (75). Allerdings wird durch die oxidative Wirkung der HOCl auch die MPO inaktiviert (75), was in der sinkenden MPO-Aktivität des Perfusats zum Ausdruck kommt (vgl. Abb.7). Daher wird mit zunehmender Versuchsdauer immer weniger H₂O₂ zu HOCl umgesetzt. Die Wirkung des H₂O₂ zeigt sich im frühzeitigen PAP-Anstieg, während die K_{f,c}-Erhöhung und Flüssigkeitsretention weitgehend den Effekten des HOCl entsprechen, solange eine ausreichende MPO-Aktivität nachweisbar ist.

Daraus lässt sich schließen, dass in Systemen mit einer entsprechenden MPO-Aktivität, wie zum Beispiel in der bronchoalveolären Lavage von ARDS-Patienten (15,17), das vorhandene H₂O₂ und die zu H₂O₂ dismutierten Superoxidanionenradikale weiter in HOCl umgesetzt werden. Somit spielt HOCl eine wichtige Rolle bei der durch oxidativen Stress verursachten akuten Lungenschädigung.

4.3 Mechanismen der durch oxidativen Stress verursachten Zellschädigung

HOCl oxidiert vor allem Thiol- und Thioethergruppen (60, 73) und bewirkt dadurch eine Modifikation freier funktioneller Gruppen von Proteinen. In niedrigen Konzentrationen, wie sie in dieser Arbeit eingesetzt werden, führt HOCl zu einer Oxidation von Sulfhydrylgruppen von Membranproteinen und damit zu einer Funktionsstörung der Zellmembran (74). So wurde in Zellkulturen eine Inaktivierung der Transportproteine für Glucose und Aminosäuren sowie ein Verlust des intrazellulären Kaliums nachgewiesen. Ebenso wurde eine Hemmung der ATP-Bildung und eine Inaktivierung der GAPDH beobachtet. Die HOCl-induzierte Zellschädigung wird also zumindest teilweise durch die Störung des zellulären Energiehaushaltes vermittelt. Diese entspricht eigenen Daten, in denen HOCl-abhängige ATP-Depletion im Gewebe nachgewiesen werden konnte (93). Vissers et al. (94) konnten zeigen, dass HOCl in der Lage ist, die Zellmembran von Erythrozyten zu passieren und intrazelluläres GSH zu oxidieren. GSH ist das wichtigste nicht proteingebundene Thiol, das ubiquitär in eukaryonten Zellen vorkommt (95). Es dient zur Aufrechterhaltung des intrazellulären Redox-Gleichgewichtes und damit dem Schutz vor Oxidation. Da die Regeneration von GSH energieabhängig ist, fällt die intrazelluläre GSH-Konzentration mit anhaltendem oxidativem Stress ab und es kommt zur Oxidation von funktionell relevanten Thiol-Gruppen an Enzymen und Transportproteinen.

H₂O₂ ist ebenfalls in der Lage, freie Sulfhydrylgruppen zu oxidieren, ist aber weniger reaktiv als HOCl (60). Erst bei kompletter GSH-Depletion tritt eine Oxidation von Sulfhydrylgruppen an Proteinen auf (74). Im Gegensatz zu HOCl, das verschiedene Enzyme angreift, wird für H₂O₂ die spezifische Oxidation von GAPDH beschrieben. Über die Bildung von Hydroxylradikalen führt H₂O₂ zur Schädigung von DNS, ATPasen (74) und zu Lipidperoxidation (65, 96). Die Peroxidation von Lipiden in biologischen Membranen verursacht einen Fluiditätsverlust, einen Abfall des Membranpotentials und einen Anstieg der Ionenpermeabilität (65).

4.4 Lipidperoxidation in den untersuchten Modellen der akuten Lungenschädigung

In Übereinstimmung mit anderen Autoren (97, 98) konnte auch in dieser Arbeit das Ablufen von Lipidperoxidation in Zusammenhang mit oxidativem Stress nachgewiesen werden (vgl. 3.2). Dabei zeigte sich, dass sowohl nach der Applikation von H_2O_2 wie auch nach HOCl und MPO/ H_2O_2 der Gewebegehalt an Malonaldehyd, einem Lipidperoxidationsprodukt, signifikant ansteigt.

Allerdings finden sich in der Literatur widersprüchliche Angaben über HOCl-vermittelte Lipidperoxidation: Bei der Inkubation von humanen LDL mit Hypochlorid finden Yan (99) und Winterbourn (100) keine und Jerlich (101) nur langsame Raten an Lipidperoxidation, wohingegen Arnhold (102) und Panasenko (103,104) die HOCl-vermittelte Lipidperoxidation in Liposomen und Lipoproteinen beschreiben.

Die Reaktionskette der Peroxidation ungesättigter Fettsäuren beginnt mit dem Entzug eines Wasserstoffatoms aus einer Methylengruppe (65). Durch das Zurückbleiben eines ungepaarten Elektrons bildet dieses Molekül schließlich selbst ein Radikal, das nun seinerseits ein Wasserstoffatom aus einer Doppelbindung entziehen kann. Zur Initiierung dieser Reaktionskette sind radikalische Oxidantien wie Hydroxylradikale, Alkoxyradikale und Hydroperoxyradikale fähig, jedoch nicht die nichtradikalischen Oxidantien H_2O_2 und HOCl (65).

Folgende Überlegungen könnten eine Erklärung für HOCl-vermittelte Lipidperoxidation liefern: Candeias (105) beschreibt die Freisetzung von Hydroxylradikalen in einer Reaktion von HOCl mit Eisen. Obwohl Ionen der Zwischenelemente nicht dem Perfusat zugesetzt waren, sind sie im intrazellulären Kompartiment enthalten. Es ist daher denkbar, dass HOCl in die Zellen diffundiert, mit dem hier vorhandenen Eisen zur Bildung von Hydroxylradikalen führt und somit die Lipidperoxidation in Gang setzt. Andererseits soll HOCl-vermittelte Lipidperoxidation auch in Abwesenheit von Hydroxylradikalen ablaufen (103, 104). Organische Hydroperoxide, die in vivo vorkommen, können mit HOCl reagieren, wobei freie Radikale gebildet werden, die nun ihrerseits die Lipidperoxidation initiieren.

Die Lipidperoxidation unter der Applikation von H_2O_2 ist durch die Fenton-Reaktion erklärbar (65). Hierbei werden in Anwesenheit von Eisenionen aus H_2O_2 Hydroxylradikale gebildet, die die Lipidperoxidation in Gang setzen können.

In dieser Studie konnten Lipidperoxidationsprozesse durch $HOCl$, H_2O_2 und MPO/H_2O_2 nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich keine Korrelation zwischen dem Gewebegehalt an Lipidperoxidationsprodukten und Parametern der Lungenfunktion, so dass die beobachtete Lungenschädigung wohl eher auf die spezifische Modifikation funktioneller Gruppen, v.a. von Thiolen, zurückzuführen ist. Diese Überlegung wird unterstützt durch die Beobachtung von Davreux et al. (88), dass die systemische Gabe von N-Acetylcystein eine Verminderung der durch Lipopolysaccharide induzierten akuten Lungenschädigung bewirkt. N-Acetylcystein ist bekanntlich in der Lage, Disulfidbrücken aufzubrechen und reduziertes Glutathion zu regenerieren. Somit kann das Redox-Gleichgewicht länger aufrecht erhalten und funktionelle Sulfhydrylgruppen wichtiger Enzyme vor Oxidation geschützt werden.

Abschließend kann Lipidperoxidation bei der durch oxidativen Stress vermittelten akuten Lungenschädigung eher als Epiphänomen gewertet werden. Als Pathomechanismus ließe sich die spezifische Modifikation funktioneller Gruppen postulieren.

5 Zusammenfassung

Die Lungenschädigung im Rahmen eines akuten Atemnotsyndroms (ARDS) ist gekennzeichnet durch ein nicht-kardiogenes Lungenödem, verursacht durch eine erhöhte Kapillarpermeabilität sowie einen Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes. An der Pathogenese der akuten Lungenschädigung im ARDS sind verschiedene Mechanismen und Mediatoren beteiligt. Obwohl eine akute Lungenschädigung auch bei neutropenischen Patienten und in Leukozyten-freien Tiermodellen beobachtet wurde, spielen neutrophile Granulozyten eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der akuten Lungenschädigung. Dies schlägt sich in der hohen Granulozytenzahl sowie in der erhöhten MPO-Aktivität der bronchoalveolären Lavage von ARDS-Patienten nieder. Stimulierte neutrophile Granulozyten verfügen über mehrere Mechanismen zur Schädigung des umgebenden Gewebes: proteolytische Enzyme, Produkte des Prostanoidstoffwechsels sowie reaktive Sauerstoffmetabolite.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den durch neutrophile Granulozyten produzierten reaktiven Sauerstoffmetaboliten Hypochlorsäure und Wasserstoffperoxid, die zu den nichtradikalischen Oxidantien zählen. Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der Effekte einzelner Oxidantien, wie von Hypochlorsäure und Wasserstoffperoxid, auf die pulmonale Mikrozirkulation. Weiterhin soll das Ablaufen von Lipidperoxidationsprozessen im Rahmen von oxidativem Stress anhand von Endprodukten der Lipidperoxidation im Gewebe nachgewiesen werden. Schließlich soll die Gegenüberstellung von Parametern der akuten Lungenschädigung mit dem Ausmaß der Lipidperoxidation im Gewebe Aufschluss geben über einen eventuellen kausalen Zusammenhang zwischen Lipidperoxidation und Schädigung der Zirkulation.

Am Modell der isolierten ventilierten und perfundierten Kaninchenlunge werden die Effekte von oxidativem Stress auf den pulmonalarteriellen Druck und die Gefäßpermeabilität charakterisiert. Hierzu werden die zu untersuchenden Oxidantien Hypochlorsäure, Wasserstoffperoxid bzw. das System aus Myeloperoxidase und Wasserstoffperoxid kontinuierlich in den pulmonalarteriellen Schenkel infundiert. Pulmonalarterieller Druck, pulmonalvenöser Druck und Flüssigkeitsretention werden kontinuierlich registriert, während der kapilläre Filtrationskoeffizient zu bestimmten Zeitpunkten gravimetrisch ermittelt wird.

Dabei zeigt sich, dass die isolierte Applikation von HOCl, H₂O₂ bzw. des Systems MPO/H₂O₂ in der pulmonalen Strombahn eine Erhöhung des pulmonalarteriellen Druckes und der Gefäßpermeabilität bewirkt, wie es für die akute Lungenschädigung charakteristisch ist. Allerdings unterscheiden sich die Schädigungsmuster der einzelnen Oxidantien im zeitlichen Ablauf der Veränderungen von Gefäßpermeabilität und PAP. So ist unter der kontinuierlichen Infusion von HOCl ein früher Anstieg des K_{f,c} und ein später Anstieg des PAP zu beobachten, während die Applikation von H₂O₂ zu einem frühen zweigipfligen Druckanstieg und einer späten K_{f,c}-Erhöhung führt. Die von dem MPO/H₂O₂-System hervorgerufenen Veränderungen nehmen diesbezüglich eine Mittelstellung ein: Der PAP steigt früh, wie in der H₂O₂-Gruppe, aber der K_{f,c}-Anstieg ähnelt mehr dem Verlauf der HOCl-Gruppe. Dies kann einerseits durch eine gewisse Eigenwirkung des H₂O₂ erklärt werden und andererseits durch eine Autoinaktivierung der MPO durch ihr Produkt HOCl.

In jeder einzelnen Versuchsgruppe konnte eine Anreicherung von Lipidperoxidationsprodukten im Gewebe nachgewiesen werden. Allerdings besteht keine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Anreicherung der Lipidperoxidationsprodukte und dem Ausmaß der Veränderungen der Zirkulation. Es muss also vermutet werden, dass die Bildung von Lipidperoxidationsprodukten durch oxidativen Stress im Rahmen einer akuten Lungenschädigung eher ein Epiphänomen darstellt. Als Pathomechanismus ließe sich die spezifische Modifikation funktioneller sulfhydrylhaltiger Gruppen postulieren.

6 **Literaturverzeichnis**

- 1) Ashbaugh, D.G., D.B. Bigelow, T.L.Petty and B.E. Levine. 1967. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 2: 319-323
- 2) Petty T.L. and D.G. Ashbaugh 1971. The adult respiratory distress syndrom: Clinical features, factors influencing prognosis and principles of management. *Chest* 60: 233-239.
- 3) Bernard, G.R., A. Artigas, K.L. Brigham, J. Carlet, K. Falke, L. Hudson, M. Lamy, J. Legall, A. Morris, R. Spragg and the Consensus Committee. 1994. The American-European Consensus Conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 149: 818-824
- 4) Lewandowski, K.1999. Epidemiological data challenge ARDS/ALI definition. *Intensiv Care Medicine* 25: 884-886
- 5) Hudson L.D., J.A. Milberg, D. Anardi and R.J. Maunder. 1995. Clinical Risks for Development of the Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 151: 293-301
- 6) Roupie E., E. Lepage, M. Wysocki, J.-Y. Fagon, J. Chastre, D.Dreyfuss, H. Mentec, J. Carlet, C. Brun-Buisson, F. Lemaire and L. Brochard for the SRLF Collaborative Group on Mechanical Ventilation. 1999. Prevalence, etiologies and outcome of the acute respiratory distress syndrome among hypoxemic ventilated patients. *Intensive Care Medicine* 25: 920-929
- 7) Luhr O.R., M. Karlsson, A. Thorsteinsson, C. Rylander and C.G. Frostell. 2000. The impact of respiratory variables on mortality in non-ARDS and ARDS patients requiring mechanical ventilation. *Intensive Care Medicine* 26: 508-517

- 8) Krafft P., P. Fridrich, T. Pernerstorfer, R. D. Fitzgerald, D. Koc, B. Schneider, A. F. Hammerle and H. Steltzer. 1996. The acute respiratory distress syndrome: definitions, severity and clinical outcome. An analysis of 101 clinical investigations. *Intensive Care Medicine* 22: 519-529
- 9) Jardin F., J.-L. Fellahi, A. Beauchet, A. Vieillard-Baron, Y. Loubières and B. Page. 1999. Improved prognosis of acute respiratory distress syndrome 15 years on. *Intensive Care Medicine* 25: 936-941
- 10) Amato M.B., C.S. Barbas, D.M. Medeiros, R.B. Magaldi, G.P. Schettino, G. Lorenzi-filho, R.A. Kairalla, D. Deheinzelin, C. Munoz, R. Oliveira, T.Y. Takagaki and C.R. Carvalho. 1998. Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* Feb 5; 338 (6): 347-354
- 11) Sibille Y. and H.Y. Reynolds. 1990. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141: 471-501
- 12) Tate, R.M. and J.E. Repine. 1983. Neutrophils and the adult respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.* 128: 552-559
- 13) Hogg, J.C. 1987. Neutrophil kinetics and lung injury. *Arch. Surg.* 122: 197-203.
- 14) Gadek, J.E. 1992. Adverse effects of neutrophils on the lung. *Am. J. Med.* 92 (Suppl. 6A): 27S-31S
- 15) Weiland, J.E., W.B. Davis and J.F. Holter. 1986. Lung neutrophils in the adult respiratory distress syndrome: clinical and pathophysiologic significance. *Am. Rev. Respir. Dis.* 133: 218-225
- 16) Brigham, K.L. and B. Meyrick. 1984. Interactions of granulocytes with the lungs. *Circ. Res.* 54: 623-635

- 17) Kindt, G. C., J. E. Gadek and J. E. Weiland. 1991. Initial recruitment of neutrophils to alveolar structures in acute lung injury. *J. Appl. Physiol.* 70(4): 1575-1585.
- 18) Grimminger, F., B. Kreuzler, U. Schneider, G. Becker and W. Seeger. 1990. Influence of microvascular adherence on neutrophil leukotrien generation-evidence for cooperative eicosanoid synthesis. *J. Immunol.* 144: 1866-1872
- 19) Leeman, M. 1991. The pulmonary circulation in acute lung injury: a review of some recent advances. *Int. Care Med.* 17: 254-260.
- 20) Vincent, J.L. 1995. Is ARDS usually associated with right ventricular dysfunction or failure? *Int. Care Med.* 21:195-196.
- 21) Voelkel, N.F., K.R. Sternmark, J.T. Reeves, M.M. Maathial and R.C. Murphy. 1984. Actions of lipoxygenase metabolites in isolated rat lungs. *J. Appl. Physiol.* 57: 860- 867.
- 22) Schulz, R. and W. Seeger. 1986. Release of leukotrienes into the perfusate of calcium-ionophore stimulated rabbit lungs: influence of 5-lipoxygenase inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* 35. 183-193.
- 23) Divertie, M.B. 1982. The adult respiratory distress syndrome. *Mayo Clin. Proc.* 57: 371-378.
- 24) Seeger, W., A. Elsner, A. Günther, H.J. Krämer and H.O. Kalinowski. 1993. Lung surfactant phospholipids associate with polymerizing fibrin: loss of surface activity. *Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol.* 9: 213-220.
- 25) Seeger, W., G. Stöhr, H.R.D. Wolf and H. Neuhof. 1985b. Alterations of surfactant function due to protein leakage: Special interaction with fibrin monomer. *J. Appl. Physiol.* 58: 326-338

- 26) Seeger, W., H. Wolf, G. Stähler, H. Neuhof and L. Roka. 1982. Increased pulmonary vascular resistance and permeability due to arachidonate metabolism in isolated rabbit lungs. *Prostaglandins* 23: 157-173
- 27) Hyers, T.M., A.A. Fowler, A.H. Stephenson, P.A. Dettenmeier, B. Fischer and R.O. Webster. 1985. The appearance of neutrophils and metabolites of arachidonic acid in bronchial fluids of patients in risk for ARDS. *Am. Rev. Respir. Dis.* 131: A135.
- 28) Seeger, W., M. Menger, D. Walmrath, G. Becker, F. Grimminger and H. Neuhof. 1987. Arachidonic acid lipoxygenase pathways and increased vascular permeability in isolated rabbit lungs. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136: 964-972.
- 29) Baldwin, S.R., C.M. Grum, L.A. Boxer, R.H. Simon, L.H. Ketani and L.J. Devall. 1986. Oxidant activity in expired breath of patients with adult respiratory distress syndrome. *Lancet* 1:11-14.
- 30) Cochrane C.G., R. Spragg and S.D. Revak. 1983. Pathogenesis of the adult respiratory distress syndrome. Evidence of oxidant activity in bronchoalveolar lavage fluid. *J. Clin. Invest.* 71:754-761
- 31) Hammerschmidt, S. and H. Wahn. 1997. Comparable effects of HOCl and of FMLP-stimulated PMN on the circulation in an isolated lung model. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156: 924-931.
- 32) Tate, R.M., H.G. Morris, W.R. Schroeder and J.E. Repine. 1984. Oxygen metabolites stimulate thromboxane production and vasoconstriction in isolated saline-perfused rabbit lungs. *J. Clin. Invest.* 74: 608-613.
- 33) Sanderud, J., K. Bjoro and O.D. Saugstad. 1993. Oxygen radicals stimulate thromboxane and prostacyclin synthesis and induce vasoconstriction in pig lungs. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 53 (5): 447-455.

- 34) Wahn, H. and S. Hammerschmidt. 1998. Inhibition of PMN- and HOCl-induced vascular injury in isolated rabbit lungs by acetylsalicylic acid: a possible link between neutrophil-derived oxidative stress and eicosanoid metabolism? *Biochim. Biophys. Acta* 1408: 55-66
- 35) Keller, R. 1987. *Immunologie und Immunpathologie*. 3., neubearbeitete und erweiterte Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York
- 36) Rubin, E. and J.L. Farber. 1994. *Pathology*. Second edition. J. B. Lippincott Company, Philadelphia.
- 37) Lew, D.P. 1989. Receptor signalling and intracellular calcium in neutrophil activation. *Eur. J. Clin. Invest.* 19 : 338-346.
- 38) Staub, N.C., E.L. Schultz, K. Koike and K.H. Albertine. 1985. Effect of neutrophil migration induced by leukotrien B₄ on protein permeability in sheep lung. *Fed. Proc.* 44: 30-35
- 39) Doerschuk, C.M., N. Beyers, H.O. Coxson, B. Wiggs and J.C. Hogg. 1993. Comparison of neutrophil and capillary diameters and their relation to neutrophil sequestration in the lung. *J. Appl. Physiol.* 74: 3040-3045.
- 40) Schutte, H., S. Rosseau, D. Walmrath, F. Grimminger, C. Ernst and W. Seeger. 1991. Neutrophil passage through isolated perfused rabbit lungs. *Am. J. Physiol.* 261 (4 Pt 2): H 1317-23.
- 41) Fällmann, M., D.P. Lew, O. Stendhal and T. Andersson. 1989. Receptor-mediated phagocytosis in human neutrophils is associated with increased formation of inositol phosphates and diacylglycerol. *J. Clin. Invest.* 84: 886-891
- 42) Babior, B.L. 1988. Protein phosphorylation and the respiratory burst. *Arch. Biochem. Biophys.* 264 No. 2: 361-367

- 43) Fantone, J.C. and P.A. Ward. 1982. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am. Ass. Pathologists* 107 No.3: 397-418
- 44) Dahlgren, C. 1989. Is lysosomal fusion required for the granulocyte chemiluminescence reaction? *Free Radic. Biol. Med.* 6: 399-403.
- 45) Borregaard, N., J.M. Heiple, E.R. Simons and R.A. Clark. 1983. Subcellular localisation of the B-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation. *J. Cell. Biol.* 97: 52-61.
- 46) Klebanoff, S.J. and R.A. Clark. 1978. *The neutrophil: function and clinical disorders.* Elsevier/north-Holland Biomedical Press, Amsterdam
- 47) Weiss, S.S., P.K. Rustagi and A.F. LoBuglio. 1978. Human granulocyte generation of hydroxyl radical. *J. Exp. Med.* 147: 316-324.
- 48) Haber, F. and J. Weiss. 1934. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. R. Soc. Lond.* 147: 332-351.
- 49) McCord, J. M. and E.D. Day. 1978. Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex. *FEBS Lett.* 86: 139-142
- 50) Harrison, J.E. and J. Schultz. 1976. Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* 251 No. 5: 1371-1374.
- 51) Klebanoff, S.J. 1968. Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. *J. Bact.* 95: 2131-2138

- 52) Agner, K. 1972. Biological effects of hypochlorous acid formed by MPO peroxidation in the presence of chloride ions. Structure and function of oxidation-reduction enzymes. Vol. 18, Edited by A. Akeson, A. Ehrenburg, Pergamon Press, New York: 329-335
- 53) Morris, J.C. 1966. The acid ionization constant of HOCl from 5 to 35°. J. Physic. Chem. 70, No. 12: 3798-3805
- 54) Koppenol, W.H. 1976. Reactions involving singlet oxygen and superoxide anion. Nature 262: 420-421.
- 55) Kanofsky, J.R. 1989. Singlet oxygen production by biological systems. Chem. Biol. Interact. 70: 1-28.
- 56) Wefers, H. and H. Sies. 1983. Oxidation of glutathione by superoxide radical to the disulfide and the sulfonate yielding singlet oxygen. Eur. J. Biochem. 137, 1-2: 29-36
- 57) Winterbourn, C.C. 1985. Comparative reactivities of various biological compounds with myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride, and similarity of the oxidant hypochlorite. Biochim. Biophys. Acta 840: 204-210.
- 58) Weiss, S.J., R. Klein, A. Slivka and M. Weiss. 1982. Chlorination of taurin by human neutrophils – evidence for hypochlorous acid generation. J. Clin. Invest. 70:598-607.
- 59) Thomas, E.L., M.M. Jefferson and M.B. Grisham. 1982. Myeloperoxidase-catalyzed incorporation of amines into proteins: role of hypochlorous acid and dichloramines. Biochemistry 21:6299-6308.
- 60) Fliss H. 1988. Oxidation of proteins in rat heart and lungs by polymorphonuclear leucocyte oxidants. Mol. Cell. Biochem. 84: 177-188.

- 61) Albrich, J.M., C.M. McCarthy and J.K. Hurst. 1981. Biological reactivity of hypochlorous acid: Implication for microbicidal mechanisms of leucocyte myeloperoxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 No. 1: 210-214
- 62) Wasil, M., B. Halliwell, D.C.S. Hutchison and H. Baum. 1987. The antioxidant action of human extracellular fluids. *Biochem. J.* 243:219-223.
- 63) Kukreja, R.C., M.C. Kontos, K.E. Loesser, S.K. Batra, Y.Z. Qian, C. Gbur Jr., S.A. Nasem, R.L. Jesse and M.L. Hess. 1994. Oxidant stress increases heat shock protein 70 mRNA in isolated perfused rat heart. *Am. J. Physiol.* 267 (6 Pt 2): H 2213-9.
- 64) Edwards, S. W. 1987. Luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence of neutrophils: role of degranulation. *J. Clin. Lab. Immunol.* 22 : 35-39.
- 65) Gutteridge, J. M. C. 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.* 41(12): 1819-1828
- 66) Esterbauer, H., R.J. Schaur and J. Zollner. 1991. Chemistry and Biochemistry of 4-hydroxynonenal malondialdehyde and related aldehydes [Review]. *Free Radic. Biol. Med.* 11: 82-128
- 67) Stocks, J., J.M.C. Gutteridge, R.J. Sharp and T.L. Dormandy. 1974. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids. *Clin. Sci. Mol. Med.* 47: 215-222
- 68) Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge. 1984. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet* i:1396-1398.
- 69) Pereira, W.E., Y. Hoyano, R.E. Summons, V.A. Bacon and A.M. Duffield. 1973. The reaction of hypochlorous acid with alpha-amino acids and dipeptides. *Biochim. Biophys. Acta* 313: 170-180

- 70) Thomas E. L., M.B. Grisham and M.M. Jefferson. 1983. Myeloperoxidase-dependent effect of amines and functions of isolated neutrophils. *J. Clin. Invest.* 72:441-454.
- 71) Min-Fu Tsan. 1982. Myeloperoxidase-mediated oxidation of methionin and amino acid decarboxylation. *Infect. Immun.* 36 No. 1:136-141.
- 72) Min-Fu Tsan. 1982. Myeloperoxidase-mediated oxidation of methionin. *J. Cell. Physiol.* 111:45-49.
- 73) Arnhold, J., S. Mueller, K. Arnold and E. Grimm. 1991. CL-intensities and spectra of luminol oxidation by sodium hypochlorite in the presence of hydrogen peroxide. *J. Biolumin. Chemilumin.* 6: 189-192
- 74) Schraufstatter, I. U., K. Browne, A. Harris, P. A. Hyslop, J. H. Jackson, O. Quehenberger and C. G. Cochrane. 1990. Mechanisms of hypochlorite injury of target cells. *J. Clin. Invest.* 85: 554-562
- 75) Weiss, S. J. 1989. Tissue destruction by neutrophils. *N. Eng. J. Med.* 320: 365-376
- 76) Richardson, P. D. I., D. N. Granger and E. Taylor. 1979. Capillary filtration coefficient: the technique and its application to the small intestine. *Cardiovasc. Res.* 13: 547-561
- 77) Seeger, W., D. Walmrath, M. Menger and H. Neuhofer. 1986b. Increased lung vascular permeability after arachidonic acid and hydrostatic challenge. *J. Appl. Physiol.* 61: 1781-1789
- 78) Lowry, O. H., N.J. Rosebrough, A. L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

- 79) Klebanoff, S.J., A.M. Waltersdorff and H. Rosen. 1984. Antimicrobial activity of myeloperoxidase. *Meth. Enzymol.* 105: 399-403.
- 80) Dodd O.J.M. and D.B. Pearse. 2000. Effect of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on ischemia-reperfusion lung injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* Jul 2000; 279: H 303-12.
- 81) Cochrane, C.G., 1991. Cellular injury by oxidants. *The American Journal of Medicine.* 91 (Suppl. 3C):23S-30S.
- 82) Pullar, J.M.; C. Winterbourn and M. C. M. Vissers. 1999. Loss of GSH and thiol enzymes in endothelial cells exposed to sublethal concentrations of hypochlorous acid. *The American Physiological Society.* 277 (Heart Circ. Physiol. 46): H1505-H1512.
- 83) Davies, K.J.A. 1999. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *Life*, 48:41-47.
- 84) Simons, R.K., R.W. Maier and E.S. Lennhard. 1987. Neutrophil function in a rat model of of endotoxin induced lung injury. *Arch. Surg.* 122: 197-203.
- 85) Ognibene, F.P., S.E. Martin, M.M. Parker, T. Schlesinger, P. Roach, C. Burch, J.H. Shelhamer and J.E. Parrillo. 1986. Adult respiratory distress syndrome in patients with severe neutropenia. *N. Engl. J. Med.* 28; 315 (9): 547-51.
- 86) Maunder, R.J., R.C. Hackman, E. Riff, R.K. Albert and S.C. Springmeyer. 1986. Occurrence of the adult respiratory distress syndrome in neutropenic patients. *Am. Rev. Respir. Dis.* 133(2): 313-6.
- 87) Dodd-O, J.M. and D.B. Pearse. 2000. Effect of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on ischemia-reperfusion lung injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279(1): H 303-12.

- 88) Davreux, C.J., I. Soric, A.B. Nathens, R.W. Watson, I.D. McGilvray, Z.E. Suntres, P.N. Shek and O.D. Rotstein. 1997. N-acetyl cystein attenuates acute lung injury in the rat. *Shock*. 8(6): 432-8.
- 89) Seekamp, A., D.E. Hultquist and G.O. Till. 1999. Protection by vitamin B2 against oxidant-mediated acute lung injury. *Inflammation*. 23(5): 449-60.
- 90) Ward, P.A., K.J. Johnson and G.O. Till. 1985. Current concepts regarding adult respiratory distress syndrome. *Ann. Emerg. Med*. 14(8): 724-8.
- 91) Feinmark, S.J. and P.J. Cannon. 1986. Endothelial cell leukotriene C4 synthesis results from intercellular transfer of leukotriene A4 synthesized by polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem*. 261: 16466-16472.
- 92) Grimminger, F., M. Menger, G. Becker and W. Seeger. 1988. Potentiation of leukotriene production following sequestration of neutrophils in isolated lungs: indirect evidence for intercellular leukotriene A4 transfer. *Blood*. 72: 1687-1692.
- 93) Hammerschmidt, S., H. Wahn, N. Büchler, N. Rüenauer and S. Neubauer. 1999. Akute Lungenschädigung durch oxidativen Stress wird von einer Verarmung an ATP im Lungengewebe begleitet. 105. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Wiesbaden.
- 94) Vissers, M.C.M. and C.C. Winterbourn. 1995. Oxidation of intracellular glutathione after exposure of human red blood cells to hypochlorous acid. *Biochem. J*. 307: 57-62.
- 95) Deneke, S.M. and B.L. Fanburg. 1989. Regulation of cellular glutathion. *Am. J. Physiol*. 257 (4 Pt 1): L 163-73.

- 96) Chang J., N.V. Rao, B.A. Markewitz, J.R. Hoidal and J.R. Michael. 1996. Nitric oxide donor prevents hydrogen peroxide-mediated endothelial cell injury. *Am.J. Physiol.* 270 (6 Pt 1): L 931-40.
- 97) Pacht, E.R., A.P. Timerman, M.G. Lykens and A.J. Merola. 1991. Deficiency of alveolar fluid glutathione in patients with sepsis and the adult respiratory distress syndrome. *Chest.* 100 (5): 1397-403.
- 98) Bunnell, E. and E.R. Pacht. 1993. Oxidized glutathione is increased in the alveolar fluid of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.* 148 (5): 1174-8.
- 99) Yan, L.J., J.K. Lodge, M.G. Traber, S. Matsugo and L. Packer. 1997. Comparison between copper-mediated and hypochloride-mediated modifications of human low density lipoproteins evaluated by protein carbonyl formation. *J. Lipid. Res.* 38 (5): 992-1001.
- 100) Winterbourn, C. C., H. P. Monteiro and C. F. Galilee. 1990. Ferritin-dependent lipid peroxidation by stimulated neutrophils: inhibition by myeloperoxidase-derived hypochlorous acid but not by endogenous lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta* ; 1055(2): 179-85.
- 101) Jerlich, A., J.S. Fabjan, S. Tschabuschnig, A.V. Smirnova, L. Horakova, M. Hayn, H. Auer, H. Guttenberger, H.J. Leis, F. Tatzber, G. Waeg and R.J. Schaur. 1998. Human low density lipoprotein as a target of hypochlorite generated by myeloperoxidase. *Free Radic. Biol. Med.* 24 (7-8): 1139-48.
- 102) Arnhold, J., O.M. Panasenko, J. Schiller, Yu.A. Vladimirov and K. Arnold. 1995. The action of hypochlorous acid on phosphatidylcholine liposomes in dependence on the content of double bonds. Stoichiometry and NMR analysis. 1995. *Chem Phys Lipids*, 78 (1): 55-64.

- 103) Panasenکو, O.M., J. Arnhold, J. Schiller, K. Arnold and V.I. Sergienko. 1994. peroxidation of egg yolk phosphatidylcholine liposomes by hypochlorous acid. *Biochim. Biophys. Acta.* 1215 (3): 259-66.
- 104) Panasenکو, O.M. and J. Arnhold. 1999. Linoleic acid hydrperoxides favours hypochlorite- and myeloperoxidase-induced lipid peroxidation. *Free Radic. Res.* 30 (6):479-87.
- 105) Candeias, L.P., M.R. Stratford and P. Wardman. 1994. Formation of hydroxylradicals on reaction of hypochlorous acid with ferrocyanide, a model iron(II)complex. *Free Radic. Res.* 20 (4): 241-9.