

Aus der Universitätsklinik für Herz-Thoraxchirurgie  
der Martin Luther Universität Halle-Wittenberg  
Direktor: Prof. Dr. Rolf-Edgar Silber

**Pathomechanismen bei Ischämie und Reperfusion der Lunge -  
Tierexperimentelle Studien**

Habilitation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med. habil.

vorgelegt dem Rat der medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg

von

Dr. med. Ivar Friedrich

geb. am 22.3.1961 in Würzburg

Gutachter:

1. Prof. Dr. Reiner Körfer
2. Prof. Dr. Jürgen Holtz
3. Prof. Dr. Rolf-Edgar Silber

Verteidigung am 8.7.2003

# Referat und bibliographische Gestaltung

**EINLEITUNG:** Das primäre Organversagen nach Lungentransplantation stellt eine nach wie vor gefürchtete Komplikation dar und ist mit einer hohen perioperativen Letalität behaftet. Als wesentlicher Auslösemechanismus wird ein Reperfusionsschaden angenommen, der durch die unzureichende Konservierung während der Ischämie ausgelöst wird.

**ZIELSETZUNG:** Ziel der vorgelegten Untersuchung war zunächst die Erfassung von pulmonaler und systemischer Hämodynamik, Gasaustausch, pulmonaler Compliance, regionaler Perfusion und Schrankenfunktion der transplantierten und der nativen Lunge nach Ischämie und Reperfusion. Darüber hinaus wurden zelluläre und humorale Aktivierungsmarker wie auch das pulmonale Surfactantsystem detailliert analysiert. Weiterhin wurde dann einer möglichen Attenuierung des an diesen Parametern erkennbaren Reperfusionsschadens durch entweder eine bronchoskopische Surfactantapplikation, eine ischämische Präkonditionierung wie auch durch eine Induktion einer Endotoxin-Toleranz nachgegangen.

**METHODEN:** An 2 experimentellen Tiermodellen am Hund wurden insgesamt 4 Versuchsreihen durchgeführt. Es handelte sich hierbei um ein Transplantationsmodell der linken Lunge (Studien pulmonalvaskulärer Widerstand und Surfactantsubstitution) sowie einem Modell der unilateralen warmen Ischämie und Reperfusion der Lunge (Studien zur ischämischen Präkonditionierung und zur Induktion einer Endotoxin-Toleranz).

## **WESENTLICHE ERGEBNISSE:**

1. In transplantierten Organen kommt es zu einer erheblichen Vasokonstriktion insbesondere in den apikalen und dorsalen Regionen, ohne dass hierdurch der mittlere pulmonalvaskuläre Druck erhöht wurde.
2. Unter der seitengetrennten Beatmung von Transplantat und nativem Organ wurde keine Schädigung des Surfactantsystems der nativen Lunge und auch keine wesentliche Einschränkung des Gasaustausches und der Compliance beobachtet.
3. Durch bronchoskopische Applikation eines Rinderlungen Surfactantextraktes gelingt eine Wiederherstellung der Surfactantfunktion und, entsprechend, eine weitreichende Wiederherstellung von Gasaustausch und Compliance im Transplantat. Die Permeabilitätsstörungen konnten hingegen kaum beeinflusst werden.
4. Ischämische Präkonditionierung über 5 Minuten (aber nicht 2 Zyklen von 10 Minuten ) verbessert die postoperative Lungenfunktion signifikant.
5. Durch die präoperative Induktion einer Endotoxin-Toleranz konnte ebenfalls eine deutliche Abschwächung des Reperfusionsschadens nach 3-stündiger warmer Ischämie bewirkt werden.

**SCHLUSSFOLGERUNG:** Nach Ischämie und Reperfusion ist ein inflammatorisch getriggelter Lungenschaden, mit einer Störung der pulmonalen Vasomotion, einer gesteigerten endothelialen wie epithelialen Permeabilität mit Ödembildung, einer Transmigration inflammatorisch kompetenter Zellen in das alveoläre Kompartiment, einer konsekutiver Schädigung sessiler Zellpopulationen und einer Beeinträchtigung der Zusammensetzung und der Funktion des pulmonalen Surfactantsystems zu beobachten. In der Summe entwickelt sich eine ausgeprägte Gasaustauschstörung und ein Verlust der pulmonalen Compliance, die in diesem Stadium wesentlich auf die Schädigung des Surfactantsystems zurückgeführt werden kann. Eine gezielte Beeinflussung der inflammatorischen Antwort durch ischämische Präkonditionierung oder durch Induktion einer Endotoxin-Toleranz ist genauso wie die Verabreichung großer Mengen eines exogenen Surfactantpräparates zur Korrektur der entstehenden Surfactantschädigung möglich und bewirkt eine deutliche Verbesserung des Gasaustausches und der Lungendehnbarkeit nach pulmonaler Ischämie und Reperfusion. Die hier beschriebenen Beobachtungen könnten zu einem verbesserten Verständnis der Pathomechanismen beitragen und damit die Entwicklung klinischer Strategien zur Protektion von Lungentransplantaten fördern.

Friedrich, Ivar

Ischämie und Reperfusion der Lunge - Tierexperimentelle Studien

Halle, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Medizinische Fakultät

Habilitationsschrift, 100 Seiten, 2002

**Für Andrea, Sarah und Malte**

# GLOSSAR

ARDS	acute respiratory distress syndrome
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BALF	bronchoalveoläre Spülflüssigkeit
CI	cardiac index
CO	cardiac output
DPPC	Dipalmitoyl-phosphatidyl-cholin
EC	Euro-Collins Konservierungslösung
ET	Endotoxin Toleranz
IL-1	Interleukin-1
IPC	Ischämische Präkonditionierung
I/R	Ischämie/Reperfusion
HSP	heat-shock protein
MODS	multi-organ system failure
MAP	mean arterial pressure
LPD	low potassium dextrane Konservierungslösungen
LSA	large surfactant aggregates
LTX	Lungentransplantation
PAF	Platelet-Activating-Factor
PCWP	pulmonary capillary wedge pressure
PRR	post-implantation response
PVR	pulmonary vascular resistance
UW	University of Wisconsin Konservierungslösung
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SVRI	systemic vascular resistance index
TNF	Tumor Nekrose Faktor
ZVD	zentralvenöser Druck

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	VORWORT.....	1
1.2	GESCHICHTE DER LUNGENTRANSPLANTATION.....	1
1.3	KLINISCHE LUNGENTRANSPLANTATION.....	2
1.4	SAUERSTOFFVERSORGUNG DES PULMONALEN GEWEBES .....	4
1.5	KONSERVIERUNG DER LUNGENTRANSPLANTATE .....	5
1.6	PATHOPHYSIOLOGISCHE GRUNDLAGEN VON ISCHÄMIE UND REPERFUSION .....	8
1.7	ISCHÄMIE UND REPERFUSION NACH LUNGENTRANSPLANTATION.....	9
1.8	SYSTEMISCHE FOLGEN VON ISCHÄMIE UND REPERFUSION .....	11
1.9	LEUKOZYTEN-ENDOTHEL INTERAKTION .....	13
1.10	LIPIDOXYGENIERUNG.....	16
1.11	NO UND ISCHÄMIE/REPERFUSION .....	17
1.12	MIKROZIRKULATION NACH ISCHÄMIE UND REPERFUSION .....	18
1.13	SURFACTANT.....	19
1.14	ISCHEMIC PRECONDITIONING.....	20
1.15	ENDOTOXIN TOLERANZ.....	23
<b>2</b>	<b>Fragestellungen .....</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>Studien .....</b>	<b>28</b>
3.1	MODELLE UND METHODEN .....	28
3.1.1	Transplantationsmodell.....	30
3.2	PULMONALVASKULÄRER WIDERSTAND IN DER TRANSPLANTIERTEN LUNGE .....	33
3.2.1	Einleitung.....	33
3.2.2	Ergebnisse.....	35
3.3	BRONCHOSKOPISCHE INSTILLATION VON SURFACTANT NACH EXPERIMENTELLER LUNGENTRANSPLANTATION .....	38
3.3.1	Einleitung.....	38
3.3.2	Ergebnisse.....	39
3.4	BAL-ANALYTIK .....	43
3.5	ISCHEMIC PRECONDITIONING.....	47
3.5.1	Einleitung.....	47
3.5.2	Ergebnisse der IPC-Versuche.....	50
3.6	ENDOTOXIN TOLERANZ (ET).....	55
3.6.1	Einleitung.....	55
3.6.2	Endotoxin Toleranz im Hundemodell .....	55
3.6.3	Ergebnisse ET-Versuche .....	60
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>66</b>

4.1	EINLEITUNG.....	66
4.2	IM RAHMEN DES REPERFUSIONSSYNDROMS KOMMT ES ZU REGIONALEN VERTEILUNGSSTÖRUNGEN DES PULMONALEN BLUTFLUSSES .....	67
4.3	IM GEFOLGE DES REPERFUSIONSSCHADENS TRETEN ERHEBLICHE PERMEABILITÄTSSTÖRUNGEN AUF .....	68
4.3.1	VILI und unilaterale Transplantationsmodelle.....	71
4.4	VERMINDERUNG DES AUSMASSES EINES I/R-SCHADENS DURCH ISCHÄMISCHE PRÄKONDITIONIERUNG .....	72
4.5	VERMINDERUNG DES AUSMASSES EINES I/R-SCHADENS DURCH ENDOTOXINTOLERANZ .....	74
4.6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....	77
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>79</b>
<b>6</b>	<b>Thesen.....</b>	<b>93</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>96</b>
7.1	LEBENS LAUF .....	96
7.2	ERKLÄRUNGEN .....	97
7.3	DANKSAGUNG.....	98

# **1 EINLEITUNG**

## **1.1 VORWORT**

Die Lungentransplantation ist sowohl in der Frühphase nach der Operation als auch im weiteren Verlauf mit einem deutlich höheren Risiko als die Transplantation anderer solider Organe behaftet. Insbesondere das Frühversagen der transplantierten Lunge ist immer noch ein ungelöstes Problem. Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen war die Entwicklung von Methoden zur Verbesserung der postoperativen Organfunktion. Die Versuche wurden unter der Aufsicht von Herrn Prof. Dr. med. vet. Militzer im Zentralen Tierlabor der Universität Essen durchgeführt und standen in Einklang mit den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes. Die Genehmigung der Versuche an Wirbeltieren wurde vom Regierungspräsidium Düsseldorf (Az.322/95) erteilt. Die Durchführung des Projektes war durch die großzügige Unterstützung der Hans und Gerti Fischer Stiftung für Herz und Kreislaufforschung, Mülheim möglich. Dafür möchte ich mich im Namen der gesamten Arbeitsgruppe bedanken.

## **1.2 GESCHICHTE DER LUNGENTRANSPLANTATION**

Die erste Lungentransplantation am Menschen wurde am 11. Juni 1963 von J.D. Hardy und W.R. Webb an dem University of Mississippi Medical Center durchgeführt. Der Empfänger war ein 58jähriger Patient mit einem zentral sitzenden Karzinom im Bereich des linken Hauptbronchus. Die linke Lunge war durch die subtotale Stenose des Hauptbronchus bereits atelektatisch verändert. Klinisch befand sich der Patient in einem deutlich reduzierten Allgemeinzustand und litt unter ausgeprägter Dyspnoe. Zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme bestand ein produktiver Husten mit purulentem Auswurf. Die rechte Lunge war emphysematisch verändert. Zusätzlich komplizierend bestand eine Niereninsuffizienz im Stadium der kompensierten Retention. Der Patient war Insasse einer Haftanstalt und zu einer lebenslänglichen Freiheitsstrafe verurteilt worden. Wegen des sich rasch verschlechternden Allgemeinzustandes bot man ihm als letzten möglichen Eingriff eine linksseitige Lungentransplantation an. Diesem Angebot stimmte er zu und nach einer Wartezeit von ca. 3 Monaten wurde ein Spenderorgan gefunden. Der in Frage kommende Spender hatte einen schwereren Herzinfarkt mit Entwicklung eines kardiogenen Schocks erlitten und befand sich in einem moribunden Zustand. Kurze Zeit nachdem die Zustimmung zur Organentnahme durch die Angehörigen eingeholt werden konnte kam es zum Herz-Kreislaufversagen, das eine kardiopulmonale Reanimation erforderlich machte. Nachdem abzusehen war, dass es keine Chance zur Wiederherstellung der Herzfunktion gab,

wurden alle Vorbereitungen für die Organentnahme und die Transplantation getroffen. Bis zur Entnahme der linken Lunge wurde die kardiopulmonale Reanimation fortgeführt. Nach Entnahme des Organs erfolgte die Perfusion mit eiskalter Kochsalzlösung zur Organkonservierung.

Der linke Hauptbronchus des Organempfängers war von Tumormassen so stark infiltriert, dass eine vollständige Exzision aller befallenen Anteile nicht möglich war. Trotz dieser technischen Schwierigkeiten gelang eine suffiziente Anastomosierung des Spenderorgans. Die transplantierte Lunge erschien gut durchblutet und die primäre Organfunktion war exzellent. Postoperativ erholte sich der Empfänger zunächst gut und war am 2. postoperativen Tag ansprechbar und spontanatmend. Die Immunsuppression bestand aus Azathioprin, Prednisolon und Kobald-60 Bestrahlung des Mediastinums. Wegen der vorbestehenden Primärerkrankung war der Patient allerdings so ausgezehrt, dass er nicht mehr mobilisiert werden konnte. Er verstarb am 18. postoperativen Tag im terminalen Nierenversagen. Bei der Obduktion fand sich ein unauffälliges Transplantat ohne Zeichen der Organabstoßung.

Dieser Pionierleistung war eine Phase jahrzehntelanger tierexperimenteller Vorarbeit vorangegangen. Die Grundlagen für die Transplantation solider Organe legte Alexis Carrel, der für die Entwicklung der Gefäßanastomosierung und der erstmaligen tierexperimentellen heterotopen Herztransplantation 1912 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde. Im Jahre 1947 erzielte Demikhov in Versuchen am Hund erstmalig postoperative Überlebenszeiten von 7 Tagen nach orthotoper Lungentransplantation. Bereits 1946 hatte er erstmals erfolgreich eine orthotope Herz- und Herz-Lungentransplantation am Hund vorgenommen.

Die klinische Lungentransplantation blieb über einen langen Zeitraum ohne Erfolg. In den Jahren 1963 bis 1982 wurden insgesamt 38 Lungen transplantiert, ohne dass ein Patient die unmittelbare postoperative Phase überlebt hätte. Das immunsuppressive Regimen mit Kortikosteroiden in hoher Dosierung, Azathioprin und Bestrahlung konnte einerseits Abstoßungsreaktionen nicht suffizient verhindern, führte aber andererseits zu schwersten Komplikationen wie z.B. Bronchusdehiszenzen sowie zu nicht beherrschbaren Infektionen. Erst mit der Entwicklung von Cyclosporin A im Jahre 1983 und der klinischen Anwendung ab 1986 war die erste langfristig erfolgreiche Lungentransplantation durch Joel Cooper mit der Toronto Lung Transplant Group möglich(1-4).

### **1.3 KLINISCHE LUNGENTRANSPLANTATION**

Durch die schlechten Erfahrungen während der Anfänge der klinischen Lungentransplantation wurden in den Folgejahren klare Definitionen von Indikation und Kontraindikation zur



Lungentransplantation entwickelt. Die geschilderte erste erfolgreiche Lungentransplantation widerspricht in fast allen Punkten den heutigen Prinzipien zur Indikations- und Kontraindikationsstellung. So ist ein bestehendes Tumorleiden eine Kontraindikation zur Transplantation. Purulenter Husten und Infektionszeichen sowie eine bereits vorbestehende Niereninsuffizienz sind ebenfalls zumindest relative Kontraindikationen. Das Spenderorgan sollte möglichst wenig traumatisiert sein und so schließt ein Lungenödem in Folge eines kardiogenen Schocks die Verwendung des Organs aus. Eine längerfristige Reanimation stellt u.a. wegen der Traumatisierung der Organe, der möglichen Hypoxie sowie der Schädigung durch Schockmediatoren für die klinische Medizin derzeit eine Kontraindikation zumindest zur Verwendung des Herzens und der Lungen dar. Zwar gibt es inzwischen eine Fülle tierexperimenteller Daten zur erfolgreichen Verwendung von Organen von „non heart-beating donors“, aber dieses Konzept hat noch keinen Eingang in die klinische Praxis gefunden.

Die Konservierung des Organs wird heute zumeist mit Euro-Collins(EC) -, University of Wisconsin(UW)- , oder Low Potassium Dextrane(LPD)- Lösungen vorgenommen. Reine Kochsalzlösung ist nicht zur Gewährleistung einer anhaltenden Organprotektion geeignet. Die immunsuppressive Therapie wird heutzutage in der Regel zumeist mit einer 3-er Kombination aus Cyclosporin oder Tacrolimus, Azathioprin oder MMF und Prednisolon durchgeführt. Die vormals übliche Bestrahlung des Mediastinums ist mittlerweile obsolet. Schließlich ist heutzutage auch die Compliance des Patienten sowie ein intakter sozialer und emotionaler Hintergrund entscheidend für den Langzeiterfolg einer Lungentransplantation

Dass die erste Lungentransplantation zumindest primär erfolgreich verlief, ist vor allem den brillanten Fähigkeiten von J.D. Hardy und seiner Arbeitsgruppe zu verdanken, die diesen Eingriff unter denkbar ungünstigen Voraussetzungen durchführten (5-9).

Die Hauptindikationen zur einseitigen Lungentransplantation sind heute die idiopathische Fibrose, der alpha1-Proteaseninhibitormangel und das Lungenemphysem. Patienten mit zystischer Fibrose werden wegen der chronischen Besiedlung mit hochpathogenen Keimen und der damit verbundenen Infektionsproblematik beidseitig transplantiert. Weitere Indikationen zur beidseitigen Transplantation stellt die pulmonale Hypertonie idiopathischer Genese oder aufgrund langfristig bestehender Herzvitien dar. Weltweit werden zur Zeit ca. 600 einseitige und 400 beidseitige Lungentransplantationen pro Jahr durchgeführt. Die 1-Jahres Überlebensquote beträgt ca. 75% und nach 5 Jahren leben noch etwa 50% der Transplantierten. Die Überlebensrate nach beidseitiger Transplantation ist unabhängig von der primären Diagnose ab dem 5. postoperativen Jahr signifikant höher als nach einseitiger Transplantation. Wegen der begrenzten Anzahl an Spenderorganen verbietet sich die routinemäßige beidseitige Transplantation, so dass ein Dilemma zwischen dem Tod auf der Warteliste wegen Mangels an

Spenderorganen und der möglichst optimalen Versorgung der transplantierten Patienten besteht. Im frühen postoperativen Verlauf sind die Patienten vornehmlich durch Infektionen und Abstoßungen bedroht. In der Spätphase ist die Hauptkomplikation die Entwicklung einer Bronchiolitis obliterans. Bereits nach dem ersten postoperativen Jahr leiden ca. 12% der Transplantierten an dieser Komplikation, die im weiteren Verlauf eine hohe Progredienz aufweist. Innerhalb weniger Jahre kommt es zur völligen Destruktion des Transplantates. Durch die Infiltration von Fibroblasten in das Innenlumen der Bronchioli und der dadurch zunehmenden Stenosierung erleiden die Patienten eine progrediente Atemnot. Ein suffizienter Gasaustausch ist im Terminalstadium nicht mehr möglich. Diese schwere Komplikation stellt das große ungelöste Problem der Lungentransplantation im Spätverlauf dar und ist bereits im 3. Jahr nach Transplantation das größte Mortalitätsrisiko. Nach 5 Jahren ist ein Drittel aller Transplantierten an Bronchiolitis obliterans in verschiedenen Schweregraden erkrankt. Als Auslöser dieser Erkrankung wird u.a. die schleichende Abstoßung (smouldering rejection) angenommen. Aus multivariaten Analysen ergibt sich ein besonders hohes Risiko zur Entwicklung von Bronchiolitis obliterans bei Empfängern älterer Spenderorgane in der Kombination mit langer Ischämiezeit. Eine spezifische Therapie gibt es derzeit nicht. Es bleibt allein die Intensivierung der immunsuppressiven Therapie und gegebenenfalls die Re-Transplantation. Durch die intensive immunsuppressive Therapie sind die Patienten nach Lungentransplantation zudem im besonderen Maße durch die Entwicklung von Tumoren (8% nach 5 Jahren) bedroht (10).

#### **1.4 SAUERSTOFFVERSORGUNG DES PULMONALEN GEWEBES**

Die Lunge hat drei verschiedene Quellen, die die nutritive Sauerstoffversorgung gewährleisten:

1. Über das pulmonalarterielle Blut wird die Lunge bei einem  $pO_2$  von 40 mmHg noch ausreichend mit Sauerstoff versorgt. Der ATP/ADP Quotient im Lungengewebe sinkt erst unterhalb einer intrazellulären Sauerstoffspannung von 0,7 mmHg (11). Dieser Wert liegt wesentlich unterhalb dem anderer Gewebe und damit ist der Eigenbedarf der Lunge an Sauerstoff vergleichsweise gering.
2. Das System der Bronchialarterien ist nach Klemmen der Pulmonalarterie in der Lage, den Sauerstoffbedarf der Lunge zumindest soweit zu decken, dass keine Infarzierung des Lungengewebes auftritt (12).
3. Selbst durch das Blähen der Lunge mit Luft kann über einen längeren Zeitraum die intrazelluläre ATP-Konzentration im Lungengewebe konstant gehalten werden (13, 14).

## 1.5 KONSERVIERUNG DER LUNGENTRANSPLANTATE

Anfänglich wurden Ex- und -implantationen in nebeneinanderliegenden Operationssälen durchgeführt, um die Ischämiezeit möglichst kurz zu halten. Die Ischämiezeiten waren so auf ca. 60 min begrenzt. Über diese Zeitspanne hinaus konnte unter Verwendung kalter kristalliner Infusionslösungen wie Ringer-Laktat keine befriedigende postoperative Organfunktion erzielt werden. Erst die Arbeiten von Belzer und Collins und das aufkommende Wissen um die pathophysiologischen Veränderungen während Ischämie und Reperfusion führten zu optimierten Konservierungsverfahren, die in einer akzeptablen Organfunktion auch nach längerer Ischämiezeit resultierten. Zunächst wurde das „donor core cooling“ angewendet, bei dem mit Hilfe der Herz-Lungenmaschine die Körpertemperatur des Organspenders auf eine Ösophagustemperatur von 10°C abgesenkt wurde und das heparinisierte Eigenblut des Spenders als Konservierungsperfusat benutzt wurde. Die Funktionsparameter der transplantierten Organe lagen allerdings bezüglich des Gasaustausches, der pulmonalen Compliance und des pulmonalen Gefäßwiderstandes unterhalb derjenigen von kristalloid-perfundierten Organen. In der weiteren Folge ist diese Technik wegen des hohen apparativen Aufwandes und den letztlich ungünstigeren Ergebnissen verlassen worden. Die eingeschränkten Organfunktionen nach donor core cooling sind wahrscheinlich aufgrund einer pro-inflammatorischen Aktivierung des Spenderorgans durch die Herz-Lungenmaschine verursacht worden (15, 16). Es folgte die Entwicklung einer Fülle verschiedener Konservierungslösungen, von denen sich einige wenige in der klinischen Praxis durchgesetzt haben: Euro Collins-Lösung in verschiedenen Modifikationen (mod. EC), University of Wisconsin (UW) - Lösung und low potassium dextran (LPD) - Lösung mit verschiedenen Additiven. Gemeinsam ist diesen Lösungen die kristalline Zusammensetzung und die Infusionstemperatur von 4°C. Alternativ wurden blutbasierte Konservierungslösungen wie die Wallwork Solution, die aus 800ml Ringer-Laktat, 200 ml Blut, 32g/l Albumin und 16 g/l Mannitol besteht (17), entwickelt. Zwei Gruppen von kristallinen Lösungen können unterschieden werden: 1. Lösungen, die bezüglich der Natrium- und Kaliumkonzentration der intrazellulären Zusammensetzung ähneln (EC und UW) und 2. extrazelluläre Lösungen wie Celsior<sup>®</sup> und Perfadex<sup>®</sup> (LPD), deren Natrium- und Kaliumkonzentrationen dem extrazellulären Raum entsprechen (siehe Abb. 1).

	<b>EC</b>	<b>UW</b>	<b>Celsior</b>	<b>Perfadex</b>
Na (mmol/l)	10	27	168	138
K (mmol/l)	115	115	4	6
Cl (mmol/l)	15		103	142
P (mmol/l)	58	25	37	
Mg (mmol/l)		5	2	0,8
Glucose (g/l)	35			9,1
Bicarbonat (g/l)	0,8			
PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mmol/l)				
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mmol/l)				
Glutamat (mmol/l)		20		
Dextran 40 (g/l)			20	5
Raffinose (mmol/l)		30		
Lactobionsre. (mmol/l)		100		
Adenosin (g/l)		1,3		
Gluthation (g/l)		0,9		
Allopurinol (g/l)		0,1		
HAS (g/l)		50		
Osmolarität				

Tab. 1: Zusammensetzung der intrazellulären Konservierungslösungen EC und UW und der extrazellulären Lösungen Celsior<sup>?</sup> und Perfadex<sup>?</sup> (grau unterlegt)

In einer Reihe von tierexperimentellen und klinischen Studien wurde die Qualität der konservierten Organe nach Einsatz jeweils einer dieser Konservierungslösungen untersucht. Die UW-Lösung enthält Additive, die der Entstehung eines Reperfusionsschadens entgegenwirken sollen. So soll Allopurinol als Hemmstoff der Xanthin-Oxidase die Produktion von Superoxidanion in der Frühphase der Reperfusion hemmen. Gleiches gilt für das beigefügte Gluthation, das als Katalysator der Wasserstoffperoxid-Reduktion zu H<sub>2</sub>O ebenfalls die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen unterbinden soll. Das Additivum Adenosin soll die strukturellen Veränderungen der reperfundierten Zellen durch Hemmung der Myosin-Leichtketten-Phosphorylierung verhindern (18). In Folge von Ischämie und Reperfusion

retrahieren sich die Aktin-Myosin Filamente in glatten Muskelzellen, aber auch in Endothelzellen durch einen ATP- und Calcium/Calmodulin abhängigen Mechanismus. Die Retraktion wird durch eine Phosphorylierung der Myosin-Leichtketten-Kinase (MLK-K) ausgelöst. Die Retraktion der Endothelzellen kann zu einer Öffnung von Zell-Zellverbindungen und damit zu einer vermehrten Durchlässigkeit der Gefäßwand für Wasser und Proteine führen. Durch eine Adenosin-abhängige Phosphorylierung der MLK-K durch die Phospho-Kinase-A (PK-A) sinkt der Pool an unphosphorylierten MLK, der für die Myosin-Phosphorylierung zur Verfügung steht. So kann durch Zugabe von Adenosin die Kontraktion von glatten Muskelzellen und Endothelzellen und damit eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität verhindert werden (19). Weiterhin wird durch die Adenosin A<sub>2</sub>-Rezeptoraktivierung und den konsekutiven Anstieg des intrazellulären cAMP in aktivierten PMN die Produktion von Superoxidanion gehemmt (20). Weitere Ingredienzien der UW-Lösung sind Hydroxy-Äthylstärke und Raffinose, zwei onkotisch wirksame Substanzen, die die extrazelluläre Osmolarität aufrecht erhalten und damit einer Zellschwellung vorbeugen sollen. Wenngleich die UW-Lösung vom theoretischen Ansatz her bessere Konservierungseigenschaften haben sollte als die EC-Lösung, konnte ein eindeutiger Vorteil für die UW-Lösung in der klinischen Lungentransplantation nicht nachgewiesen werden. Die hohe Kaliumkonzentration der intrazellulären Lösungen führt unmittelbar bei Beginn der Infusion bereits zur pulmonalarteriellen Vasokonstriktion. Dies hat eine inhomogene Perfusion des Organs zur Folge. Durch die Addition von Prostaglandin E<sub>2</sub> zur EC-Lösung bzw. die Infusion von PGE<sub>2</sub> vor Organperfusion lässt sich die Gefäßkonstriktion nicht vollständig verhindern (21). Die Literatur der letzten Jahre wird von den deutlich besseren Ergebnissen der extrazellulären Kompositionen beherrscht. Nach Addition von Glucose zur LPD-Lösung und Inflation der Lunge mit 100% Sauerstoff bei 10°C konnte ein aerober Metabolismus aufrecht erhalten werden. Dies resultierte in einer verbesserten Organfunktion nach Reimplantation (22-24). Diese experimentellen Ergebnisse wurden in klinischen Studien bestätigt, die ein geringeres Auftreten von schweren Reperfusionstörungen nach Verwendung von LPD-Lösungen zeigten (25, 26). Entgegen der klinischen Praxis, bei der das Perfusat mit einer Temperatur von 4°C eingesetzt wird, scheint auch eine mildere Hypothermie (10°) des Perfusats Vorteile für die postoperative Organfunktion zu haben. Es konnte gezeigt werden, dass eine Konservierungstemperatur von 10°C der von 4°C und von 15°C deutlich überlegen ist (27, 28). Dies hängt wahrscheinlich mit der Funktion der Zellmembran gebundenen Transportsysteme wie zum Beispiel der Na/K-ATP-ase zusammen, die bei einer Temperatur von 10°C noch aufrecht erhalten wird. Eine weitere Abkühlung führt zu einer Inaktivierung dieser Systeme, dadurch zu einer Zellschwellung durch Natrium und Wasser-Akkumulation und letztendlich zu einer Störung der Zellhomöostase (27, 28). Bisher sind unter anderem auch aus praktischen Erwägungen

(Eiswasser hat eine Temperatur von 4°C) diese Überlegungen nicht in die klinische Praxis übernommen worden. Weitere Additiva wie Trehalose zur Substitution von Glucose (29), Antioxidantien und freie Radikale Fänger wie Superoxid Dismutase (SOD) (30) und Dimethylurea (DMTU) (31, 32), Calcium-Antagonisten wie Verapamil (33) und Platelet-Activating-Factor (PAF)-Antagonisten (34) konnten in verschiedenen Tiermodellen eine Protektion des Organs bewirken, haben jedoch bisher nicht den Weg in die klinische Praxis gefunden. Die fehlende Umsetzung der tierexperimentellen Ergebnisse in die klinische Praxis hat sicher auch mit der mangelnden Vergleichbarkeit der unterschiedlichen experimentellen Modelle zu tun. Relevante Parameter wie Spezies, kalte Konservierung und Transplantation oder warme Ischämie, Art der Konservierungslösung, Ischämiezeit, isoliertes Organ- oder *in-vivo*-Untersuchungen, Beatmungsform, Nachbeobachtungszeit, Interventionsalgorithmus (z.B. Volumengabe, Katecholamine), beobachtete Parameter usw. unterscheiden sich in den experimentellen Studien erheblich. Ein wichtiges Ziel wäre es daher ein allseits anerkanntes, referentielles Transplantationsmodell zu entwickeln, um eine Vergleichbarkeit von experimentellen Bedingungen zu gewährleisten.

## **1.6 PATHOPHYSIOLOGISCHE GRUNDLAGEN VON ISCHÄMIE UND REPERFUSION**

Nach Verschluss einer Endstreckenarterie kommt es im Versorgungsgebiet des Gefäßes zu einem Infarkt, der dann nach einer längeren Zeit (Tage) als Koagulationsnekrose imponiert. Eine transiente Ischämie (Minuten, Stunden) führt zunächst nicht zu morphologisch fassbaren Veränderungen des histologischen Bildes. Erst nach der Reperfusion kommt es zur Exazerbation der Verletzung und zu einem dann sichtbaren, irreversiblen Zelluntergang. Während der Ischämie gehen also zelluläre Veränderungen zunächst unsichtbar vor sich, die offensichtlich die Zellen für den Kontakt mit Sauerstoff und Blutzellen sensibilisieren. Dazu hat Reimer den Begriff des „lethal reperfusion injury“ geprägt, der definiert wurde als „Konversion von reversibel geschädigten Zellen zu irreversibel geschädigten Zellen nach Wiedereröffnen des arteriellen Gefäßes“ (35). Der Begriff der tödlichen Reperfusion ist jedoch umstritten. So gehen andere Autoren davon aus, dass die Reperfusion lediglich die irreversible Schädigung der Zellen offenbart und nicht seinerseits für die Zellzerstörung verantwortlich ist (13). Im histologischen Bild imponiert ein Reperfusionsschaden mit fokalen Endothelschwellungen, adhären PMN, Hämorrhagien und Fibrinablagerungen. Bereits wenige Sekunden nach Einsetzen einer Ischämie fällt die intrazelluläre ATP-Konzentration ab und der aerobe Metabolismus wird in einen anaeroben umgeschaltet. Es folgt ein Anstieg von Laktat und ein Abfall des intrazellulären pH-

Wertes. Dadurch werden die ATP-abhängigen Ionen-Transportsysteme gestört und so kommt es zur Akkumulation von Natrium, Wasser und Calcium in der Zelle. Die Folge sind: Komplementaktivierung, Zellschwellung und Aktivierung von Phospholipase A2, die eine Degradation der Membranphospholipide herbeiführt (36). Durch die Zellschwellung und durch die Freisetzung gerinnungsaktiver Substanzen kann es weiterhin zu einem no-reflow Phänomen kommen. Der Blutfluss in die Gefäßperipherie nach Wiedereröffnung ist dann durch das geschwollene Endothel sowie durch fibrinreiche Plättchen-Thromben, Erythrozyten und PMN unterbrochen.

## **1.7 ISCHÄMIE UND REPERFUSION NACH LUNGENTRANSPLANTATION**

Die perioperative Sterblichkeit nach Lungentransplantation liegt mit ca. 20% im Vergleich zur Transplantation anderer solider Organe wie Herz, Leber oder Niere deutlich höher (ISHLT Registry 2001). Nach Lungentransplantation tritt bei in 40% der Fälle ein Reperfusionsschaden mit Dysfunktion der transplantierten Lunge (pulmonary reimplantation response (PRR), early graft dysfunction) auf (37). 10-20% der Lungentransplantierten entwickeln eine schwere respiratorische Insuffizienz und eine ausgeprägte pulmonale Ödembildung, die eine verlängerte Beatmungsdauer mit hohen Beatmungsdrücken und hoher Sauerstoffkonzentration nötig macht (38-40). Nach einseitiger Transplantation ist das native, durch die Grunderkrankung vorgeschädigte, Organ kaum in der Lage den Gasaustausch sicherzustellen. Das klinische Bild ähnelt dem eines adult respiratory distress syndrome (ARDS), mit den typischen Symptomen Hypoxämie, Hyperkapnie, verminderte pulmonale Compliance, erhöhter pulmonaler Gefäßwiderstand und ausgeprägtes Lungenödem. Nach Anheften von polymorphkernigen neutrophilen Leukozyten (PMN) an die Gefäßstrombahn und Freisetzung toxischer Metabolite entstehen auf vaskulärer Seite durch Degradation der interzellulären Kittsubstanz (u.a. Fibronectin) und durch Zellschrumpfung der endothelialen Oberfläche Defekte, durch die Flüssigkeit und Proteine aus dem vaskulären in das interstitielle und später in das alveoläre Kompartiment strömen. Die entstandenen Lücken zwischen vaskulärem, interstitiellen und alveolärem Kompartiment sind so groß, dass neben Plasmaproteinen und Fibrin(ogen) samt seinen Spaltprodukten selbst IgM-Moleküle in der bronchoalveolären Flüssigkeit (BALF) nachgewiesen werden können. Durch das Ausströmen von Plasmaproteinen in das alveoläre Kompartiment wird die Surfactantfunktion inhibiert, was wiederum die Ausbildung von Atelektasen, eine weiter erhöhte pulmonale Compliance und einen erhöhten funktionellen rechts-links shunt begünstigt. Die entstandene Hypoxämie kann auch durch Erhöhung des

Sauerstoffangebotes kaum beeinflusst werden, da aufgrund der atelektatischen Veränderungen ein Gasaustausch nicht mehr stattfindet. Zudem ereignet sich ein Anstieg des pulmonal vaskulären Widerstandes (PVR), der zum einen durch das Entstehen von Atelektasen und der hierbei möglicherweise noch intakten hypoxischen Vasokonstriktion, zum anderen durch Freisetzung vasokonstriktorischer Substanzen, hier vor allem von Lipidmediatoren (Thromboxan) aus der Lunge hervorgerufen wird. Die Vasokonstriktion im pulmonalen Gefäßbett mit Erhöhung des pulmonal vaskulären Widerstandes führt zu einer Rechtsherzbelastung, die ein Herz-Kreislaufversagen zur Folge haben kann. Das Auftreten von PRR ist nicht abhängig vom Alter, Geschlecht, Einzel- oder Doppellungentransplantation und dem pulmonalarteriellen Druck vor Transplantation. Auch die Grunderkrankung scheint keinen Einfluss auf das Auftreten des primären Transplantatversagens zu haben. Während einige Autoren einen Zusammenhang zwischen der Länge der Ischämiezeit und dem Auftreten von PRR sehen (40, 41) konnte in anderen Studien dieser Zusammenhang nicht festgestellt werden (42). Lediglich die Verwendung der extrakorporalen Zirkulation bei der Transplantation (odds Ratio 1,8) scheint ein vorhersehbares Risiko für das Auftreten eines PRR zu sein (39).

Die Mortalität des frühen Transplantatversagens wird mit ca. 25% angegeben. Die bisherige Behandlungsform dieser Komplikation entspricht der eines ARDS. Das notwendigerweise eskalierte Beatmungsregimen zieht wie beim ARDS eine ganze Kette weiterer Komplikationen nach sich. So steigt bei Patienten mit schwerem Reperfusionsschaden die Inzidenz von pulmonalen Infektionen und es ist zu vermuten dass auch PRR Patienten prinzipiell eine Beatmungsinduzierte Schädigung der Lungen (ventilatory induced lung injury: VILI) entwickeln können. Bei den überlebenden Patienten erholt sich auch hier, entsprechend dem Verlauf des ARDS, nach 3-8 Tagen die Lunge spontan. Lungentransplantate nach Ischämie/Reperfusionsschaden (I/R) -schaden zeigen allerdings vermehrt Abstoßungsreaktionen und Heilungskomplikationen an der Bronchusanastomose. Eine mögliche Erklärung dafür ist die vermehrte Expression von MHC Klasse II Antigenen (43) und ein vermehrtes Auftreten von zytotoxischen Killer-Zellen (44). Zudem gibt es Hinweise, dass bei Patienten die postoperativ einen schweren Reperfusionsschaden durchgemacht haben, gehäuft Bronchiolitis obliterans des Transplantates auftritt(45).

Verschiedene Faktoren können Einfluss auf die Lungenfunktion nach Transplantation haben. Spenderseitig, empfängerseitig und durch den operativen Eingriff selbst ist das Transplantat pathogenen Einflüssen ausgesetzt. Spenderseitige Einflüsse auf das Organ entstehen durch den Hirntod selbst, eine eventuelle Aspiration von Blut oder Mageninhalt während einer Bewusstlosigkeit, durch ein stattgehabtes Trauma sowie die Intensiv- und Beatmungstherapie. Einflüsse durch die Operation sind: Unterbrechung des Lymphflusses, Unterbrechung der



bronchialarteriellen Durchblutung, Denervierung der Lunge, u.U. Verwendung der extrakorporalen Zirkulation sowie die (inadäquate) Konservierung des Organs. Empfängerseitig kann das Organ durch Abstoßung, inflammatorische Reaktionen oder Infektionen geschädigt werden.

Das Phänomen der hyperakuten Abstoßung wurde für die Lunge bisher nicht beschrieben. Eine Abstoßung des Transplantates tritt erstmals 2-5 Tage nach Implantation auf (46, 47).

Für das primäre Transplantatversagen wird der Ischämie und Reperfusionsschaden nach Ausschluss chirurgischer Komplikationen als ursächlich angesehen. In den tierexperimentellen Studien an gesunden Tieren nach Lungentransplantation wird ein PRR durch eine verlängerte Ischämiezeit induziert.

## **1.8 SYSTEMISCHE FOLGEN VON ISCHÄMIE UND REPERFUSION**

Die pathophysiologischen Konsequenzen von Ischämie und Reperfusion sind in der Chirurgie häufig und können sowohl eine Folge der Primärerkrankung als auch eine Komplikation der notwendigen chirurgischen Therapie sein. Durch das Wiedereröffnen eines verschlossenen Gefäßes wird ein Cocktail aus pro-inflammatorischen Mediatoren, toxischen Stoffwechselprodukten und aktivierten Zellen in die systemische Strombahn gespült. Somit wird eine lokalisierte Inflammation in den Gesamtorganismus getragen (remote injury) und löst durch die Reaktion mit dem Endothel anderer Organe eine inflammatorische Reaktion des gesamten Systems aus (Systemic Inflammatory Response Syndrome=SIRS). Dies kann zu einer Störung von Organfunktion bis hin zum Totalausfall eines oder mehrerer Organsysteme führen (Multiple Organ Dysfunction Syndrome =MODS) und ist mit einer hohen Letalität behaftet. Dieser Mechanismus wurde als „remote injury“ bezeichnet und in verschiedenen klinischen und tierexperimentellen Untersuchungen in seinen Auswirkungen auf den Gesamtorganismus beschrieben (36, 48). Auch nach Ischämie und Reperfusion einer Lunge konnten an der contralateralen Lunge ebenfalls inflammatorische Veränderungen wie Lungenödembildung, Neutrophilen- und Proteininflux in das alveoläre Kompartiment festgestellt werden (49-52). Nach Ischämie und Reperfusion lassen sich in verschiedenen Modellen erhöhte Spiegel von TNF-alpha, IL-1, IL-6 und IL-8 nachweisen (53). TNF-alpha ist ein passe-partout für die Aktivierung von Mediatoren der proinflammatorischen Immunantwort. Unterschiedliche Zellen wie z.B. PMN, Makrophagen, Natural Killer- (NK)-Zellen, Lymphokin-aktivierte Killerzellen, Astrozyten, Endothelzellen und Lymphozyten können nach spezifischer oder unspezifischer Aktivierung TNF-alpha freisetzen. TNF-alpha bindet an zwei verschiedene TNF-Rezeptoren

TNF RI und TNF RII deren Liganden (CD27, CD40 und Fas-Ligand), zur Gruppe der „nerve growth factor receptors“ gehören. Nach Bindung von TNF-alpha an den Rezeptor werden eine verschiedene Signaltransduktionen in Gang gesetzt, die zur Expression weiterer pro-inflammatorischer Mediatoren führen. Die Folge sind: PMN-Aktivierung, Endothelzell-Aktivierung, respiratory burst, Expression von Adhäsionsmolekülen, Produktion von Stresshormonen, Induktion von Apoptose und Nekrose, die Entwicklung von Fieber und eine weitere Fülle von Einflüssen auf den Stoffwechsel und auf das endokrine System.

Die Freisetzung von IL-1 aus reperfundierten Geweben führt ebenfalls zur Amplifizierung der pro-inflammatorischen Reaktion mit vermehrter Freisetzung von IL-1 selbst, TNF-alpha und IL-6, zur Expression von Adhäsionsmolekülen und Aktivierung von NK-Zellen. IL-1 übt einen chemotaktischen Reiz auf PMN aus und trägt zur Akkumulation von PMN im inflammatorischen Gewebe bei. Durch die Freisetzung von Sauerstoffradikalen und dem amplifizierenden Effekt auf die Eigenproduktion, aber auch auf die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine kommt es zu einer Potenzierung der Inflammation insgesamt. Der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B, durch TNF-alpha, IL-1 und Endotoxin aktiviert, setzt eine weitere Produktion von IL-6 in Gang. IL-6 führt zur B- und T-Zell Differenzierung und hat eine pro-inflammatorische Wirkung auf Makrophagen. In der Lunge wird IL-6 von Alveolarmakrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten gebildet. In einer klinischen Studie von Pham et al. korrelierte die Höhe des IL-6 Spiegels (>1000pg/ml) 4 Std. postoperativ nach Lungentransplantation mit dem Auftreten eines Reperfusionsschadens während Patienten ohne Reperfusionsschaden nur einen IL-6 Serumspiegel von < 500 ng/ml hatten. Dabei korrelierte IL-6 invers mit dem pO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> und dem Überleben der Patienten. Sie schlussfolgern, dass IL-6 ein guter Prädiktor zur Identifikation von Reperfusionsschäden nach Lungentransplantation ist (54).

Die Freisetzung von IL-8 aus Bindegewebszellen, Endothelzellen und mononukleären Zellen wird ebenfalls durch IL-1 und TNF-alpha und Endotoxin stimuliert. Freie Radikale induzieren *in vitro* unter NF $\kappa$ B Beeinflussung die Transkription von IL-8 (55). Zielzelle ist vor allem der PMN bei dem durch IL-8 Rezeptoraktivierung ein respiratory burst induziert wird. IL-8 führt sowohl zur Expression von LFA-1 auf PMN als auch zur Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und hat damit Wirkung auf die PMN Endothelinteraktion (56). Durch den starken chemotaktischen Reiz führt die Freisetzung von IL-8 im Interstitium zur Migration von PMN aus dem vaskulären in den interstitiellen Raum. Durch Liberation von IL-8 aus Alveolarmakrophagen kommt es zur Akkumulation dieses Zytokins im Alveolarraum. Dies stellt den Reiz zur Diapedese von PMN in das alveoläre Kompartiment dar und so finden sich im Vollbild des PRR massenhaft PMN in der BALF. Die Höhe des IL-8 Plasmaspiegels ist eng mit der Transplantatfunktion korreliert (57).

Neben der Expression pro-inflammatorischer Zytokine kommt es nach kurzer Zeit zur Gegenregulation durch anti-inflammatorische Mediatoren. Hierzu zählen IL-4, IL-10, IL-11, IL-13, transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ), colony stimulating factor (CSF) und lösliche Rezeptorantagonisten wie ra-TNF-alpha und ra-IL-1. Die immunsupprimierende Gegenregulation kann zu einem Nebeneinander von Pro- und Anti-Inflammation als mixed anti-inflammatory response syndrome (MARS) oder bei Nachlassen der pro-inflammatorischen Phase zu einem compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) führen. Die immunologische Dysregulation hat auf der pro-inflammatorischen Seite (SIRS) Organinsuffizienzen auf Grund der generalisierten Inflammation zur Folge. Auf der Seite der immunologischen Anergie (MARS, CARS) besteht eine Immuninkompetenz mit der Gefahr der Infektion und Sepsis bei reduzierter Infektabwehr. Die Letalität im Vollbild der Dysregulation beträgt 30-50%.

## 1.9 LEUKOZYTEN-ENDOTHEL INTERAKTION

Nach Ischämie und Reperfusion im experimentellen Modell wie in der klinischen Medizin ist die Adhäsion von PMN an, und Transmigration durch die Gefäßendothelschicht ein regelmäßiges Phänomen. In Folge der Transmigration von aktivierten PMN und der konsekutiven Liberation von Proteasen, inflammatorischen Mediatoren und Sauerstoffradikalen in das umgebende Gewebe, ergeben sich weitreichende pathophysiologische Auswirkungen. Der Kontakt zwischen PMN und Endothelzellen findet über Adhäsionsmoleküle statt, die sich in Selektine, Integrine und Immunglobulin-Supergen-Familie einordnen lassen. Sie unterscheiden sich in ihrem Molekülaufbau, der Lokalisation und der Funktionalität voneinander. Nach einem inflammatorischen Reiz kommt es zunächst zu einem „rolling“ der PMN auf dem Gefäßendothel. Dieses Rolling entsteht aufgrund einer schwachen Adhäsion der Leukozyten an Adhäsionsmolekülen aus der Klasse der Selektine auf dem Endothel, während die Leukozyten im Blutstrom weiterbewegt werden. Diese Klasse besteht aus den bisher bekannten **Leukozyt-, Platelet-, und Endothel-Selektinen**. L-Selektin wird auf der Leukozytenoberfläche konstitutionell exprimiert und interagiert mit P-Selektin und E-Selektin auf der Endothelseite. P-Selektin findet sich zudem auf der Oberfläche von Thrombozyten. Während P-Selektin konstitutionell auf der Zelloberfläche vorhanden ist, wird E-Selektin nur nach Zellaktivierung exprimiert. P- und E-Selektine werden in Weibel-Palade-Körperchen oder alpha-Vesikeln gespeichert und nach Kontakt der Endothelzelle mit Histamin, Thrombin, Komplement C5b oder Sauerstoffradikalen innerhalb von wenigen Minuten an der Zelloberfläche präsentiert(58). Die transkriptionelle Regulation erfolgt durch Endothelkontakt mit TNF-alpha und Endotoxin(59). Die Expression

von Selektinen erreicht nach 3-8 Std. ein Maximum und verschwindet innerhalb von 12-24 Std. von der Zelloberfläche.

Integrine werden auf Leukozytenoberflächen exprimiert und bestehen aus einer nicht kovalenten Bindung von alpha- und beta-Subeinheiten. Während die  $\beta_2$ -Subeinheit bei allen Integrinen konstant vorhanden ist (CD18) kann die alpha-Subeinheit in 3 weitere Untergruppen unterteilt werden (CD11a, CD11b und CD11c). Auf allen Leukozyten ist CD11a/CD18 konstitutionell vorhanden. Die Expression dieses Moleküls kann zwar nicht durch Aktivierung des Leukozyten vermehrt, aber die Affinität zu ICAM-1 und ICAM-2 kann durch FMLP (f-Met-Leu-Phe) und IL-8 verstärkt werden(60). Die Expression von CD11b/CD18 und CD11c/CD18 nach pro-inflammatorischer Aktivierung führt zu einer 3- bis 10-fachen Erhöhung dieser Liganden auf der Leukozytenoberfläche.

In der Immunglobulin-Superfamilie wurden bisher 4 Angehörige identifiziert, die konstitutionell auf Endothelzellen vorhanden sind. Sie sind aus mehreren IgG-ähnlichen Domänen aufgebaut und binden an Integrine auf der Leukozytenoberfläche. Einzig PECAM-1 ist sowohl auf Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen vorhanden und heftet sich an die jeweils homologe Domäne. Während die Expression von ICAM-1 und PECAM-1 durch pro-inflammatorische Zytokine gesteigert werden kann, ist dies bei ICAM-2 nicht der Fall. Nach 5-9 Std. erreicht die Expression ihren Höhepunkt und hält sich für ca. 24 Std. Im Unterschied zu den Selektinen, die nur ein „rolling“ von PMN auf dem Gefäßendothel verursachen ist die Verbindung zwischen  $\beta_2$ -Integrinen und ICAM wesentlich stabiler, so dass es zur Adhäsion des Leukozyten an der Gefäßwand kommt. PECAM-1 und ICAM-1, zu einem geringen Maße auch ICAM-2 fördern die subendotheliale Transmigration der Leukozyten (61).

Die PMN sind im Immunsystem die Soldaten der vordersten Front, deren Aufgabe in der Zellzerstörung von Bakterien oder veränderten Körperzellen besteht. Das Waffenarsenal besteht aus über 50 verschiedene toxische Substanzen, die sich kompartimentiert in den intrazellulären Vesikeln der PMN befinden. Diese Substanzen lassen sich in verschiedene Gruppen wie Zytokine, toxische Sauerstoffradikale, Arachidonsäuremetabolite, proteolytische Enzyme und das Myeloperoxidasesystem einteilen. PMN können durch verschiedene spezifische und unspezifische Substanzen aktiviert werden. Neben der Aktivierung über Rezeptoren ( u.a. TNF-alpha, PAF, IL-1) ist auch die unspezifische Aktivierung z.B. durch Antigen-Antikörperkomplexe möglich. Wenn nun die Aktivierung der PMN nicht lokalisiert sondern generalisiert geschieht und die enthaltenen Substanzen ungerichtet freigesetzt werden, kommt es zur diffusen Schädigung des Endothels in allen Organsystemen. Eine Fülle von pro-inflammatorischen Mediatoren, die nach Ischämie und Reperfusion liberiert werden, haben Einfluss auf die Granulozyten-Endothel Interaktion. Sauerstoffradikale verstärken die Adhäsion und Emigration

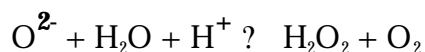
von PMN. Durch Gabe von Antioxidantien ließ sich die Zahl der adhäsiven und emigrierten Leukozyten in einem I/R-Modell an Darmvenolen signifikant reduzieren(62, 63). Unklar ist bisher, ob Superoxidanion Konformitätsänderungen an Adhäsionsrezeptoren verursacht oder es zur Oxidation anti-adhäsiver Substanzen wie NO kommt (64, 65).

Aktivierte PMN setzen eine Vielzahl von inflammatorischen und toxischen Metabolite wie Proteasen (Elastase) und Sauerstoffradikale frei, die durch Lipidperoxidation der Zellmembran das Lungengefäßendothel direkt schädigen. Durch Proteasen werden auch Komplementfaktoren, Transportproteine und Immunglobuline vermehrt gespalten(66). Substrat für die Elastase ist Elastin und Fibronectin(67), Typ III- und IV-Kollagen sowie Kern-Proteine von Bindegewebs-Grundsubstanz. Elastase spaltet aber auch Gerinnungsfaktoren, Immunglobuline und Komplement-Proteine mit konsekutiver Aktivierung von Kaskadensystemen (68, 69). Das resultierende Proteasen-Proteaseninhibitoren Ungleichgewicht führt zu einer weiteren Spaltung von Enzymen und Proteinen, die anti-inflammatorisch wirksam sind, wie u.a. ATIII,  $\alpha$ 2-PI, C1-Esterase-Inhibitor und Faktor XIII. Die unspezifische Aktivierung von PMN kann bereits die membranständige NADPH-Oxidase aktivieren, die ihrerseits eine große Menge an Superoxidanion und  $H_2O_2$ -Molekülen freisetzt. Nach Fc-Rezeptorbindung phosphoryliert die aktivierte Proteinkinase C Proteine des NADPH-Oxidase-Komplexes. Diese Reaktion setzt den respiratory (metabolic, oxidative) burst in Gang, in dessen Verlauf hochreaktive Superoxidanionen gebildet werden(70).

Die NADPH-Oxidase katalysiert die folgende Reaktion:

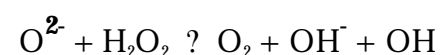


Das Superoxidanion ist extrem aggressiv und daher kurzlebig und wird in wässriger Lösung bei saurem pH zu einem großen Teil von der Superoxiddismutase (SOD) zu Wasserstoffsuperoxid umgebaut:

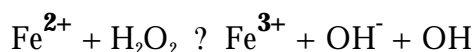


Bei dieser Reaktion kann auch Singulett-Sauerstoff gebildet werden.

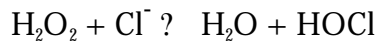
Das durch die NADPH-Oxidase entstandene Superoxidanion kann in der Haber-Weiss-Reaktion zusammen mit Wasserstoffsuperoxid Hydroxylradikale bilden:



Laktoferrin katalysiert eisenabhängig in der Fenton-Reaktion die Synthese von  $OH^-$ .



Wasserstoffsuperoxid steht in Anwesenheit von Chlorid als Substrat für eine Myeloperoxidase katalysierte Reaktion zur Verfügung:



Das MPO-HOCl-System ist der stärkste zytotoxische Mechanismus des PMN. HOCl ist zwischen 100 und 1000 mal stärker zytotoxisch als Superoxidanion oder  $\text{H}_2\text{O}_2$  und auf Grund dieser Aggressivität in der Lage verschiedene biologisch aktive Proteine an der primären Aminogruppe zu oxidieren oder zu chlorieren(71).

Die große Kontroverse über die Frage, ob die Anwesenheit von PMN essentiell für die Entwicklung eines Reperfusionsschadens sind, soll hier nicht abschließend beantwortet werden. Auch wenn sich inflammatorische Veränderungen der Lunge nach PMN-Depletion auslösen lassen, ist der pathophysiologische Ablauf der Reperfusionsphase immer mit Leukozytenadhäsion und Diapedese verbunden.

## 1.10 LIPIDOXYGENIERUNG

Nach Ischämie und Reperfusion entstehen Sauerstoffradikale auf unterschiedliche Wege. Durch den Abfall der intrazellulären ATP-Konzentration fallen jeweils als Folgeprodukte vermehrt AMP, Adenosin, Inosin und Hypoxanthin an. Darüber hinaus wird bei Sauerstoffmangel die normalerweise vorhandene Xanthin-Dehydrogenase durch eine Calcium-abhängige Protease in Xanthin-Oxidase konvertiert. Nach Wiedereinsetzen der Sauerstoffversorgung in der Reperfusionsphase wird in Anwesenheit von Xanthin-Oxidase aus Hypoxanthin, unter Abgabe eines aggressiven Superoxidanion ( $\text{O}_2^-$ )-Moleküls, Xanthin gebildet. Das auf diese Weise in der Frühphase der Reperfusion entstandene Superoxidanion, reagiert zusammen mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  in der Haber-Weiss-Reaktion oder der Eisen-abhängigen Fenton-Reaktion zu  $\text{OH}^-$  und  $\text{O}_2^-$ . Diese äußerst aggressiven Metabolite werden in die Zelle und das umgebende Gewebe freigesetzt.

Die strukturelle und funktionelle Integrität der Zellmembran kann durch Oxidation einzelner Membranbestandteile empfindlich gestört werden. Die Zellmembran, bestehend aus hydrophilen Anteilen wie Phosphoglycerol an der Außenseite der Membran und den lipophilen Seitenketten, die in das Zellinnere gerichtet sind, bietet verschiedene Angriffspunkte für die schädigende Wirkung von Sauerstoffradikalen. Sauerstoffradikale oxidieren vornehmlich die mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie Linolsäure oder Linolensäure, die vom Körper nicht synthetisiert und als essentielle Fettsäuren nur über die Nahrung aufgenommen werden können. Durch den oxidativen Angriff kommt es zu einer Kettenreaktion, in der nach Kontakt eines Lipidmoleküls mit einem Sauerstoffradikal, hunderte Lipidmoleküle in Lipidoxide, Lipidperoxide und Aldehyde transformiert werden. Als Folge der Reaktionen der Molekularstruktur kommt es zu physiko-chemischen Veränderungen der Zellmembran. In Anwesenheit von Sauerstoffradikalen kann es

zur Oxidation von membranständigen Rezeptoren mit der Folge einer Konformitätsänderung an Rezeptoren kommen. Hierdurch werden Änderungen der intrazellulären Signaltransduktion oder auch Gen-Induktion ausgelöst. Durch Lipidperoxidation gebildete Lipidhydroperoxide induzieren Apoptose, insbesondere bei einer verminderten intrazellulären Konzentration antioxidativer Substanzen. Linolsäureperoxide sind in der Lage Phospholipase D direkt zu aktivieren, die ihrerseits Protein Kinase C aktiviert und damit einen Weg für die Dysfunktion der endothelialen Barriere darstellt.

## **1.11 NO UND ISCHÄMIE/REPERFUSION**

Die Freisetzung von NO aus den Endothelzellen erfolgt durch die Calcium-abhängige konstitutionelle NO-Synthetase (cNOS) und die Calcium-unabhängige induzierbare NO-Synthetase (iNOS). L-Arginin zerfällt in Anwesenheit von NOS zu NO und Citrullin. NO wiederum aktiviert lösliche Guanylatcyclase, die die Umwandlung von GTP in cGMP katalysiert. Die intrazelluläre Erhöhung von cGMP bewirkt einen Abfall der intrazellulären Calcium-Konzentration und damit eine Relaxation der Muskelzelle. Während die cNOS mit einem Grundlevel von NO-Freisetzung aus den Endothelzellen den Vasotonus reguliert, wird die iNOS in erster Linie durch Inflammation angeschaltet. Durch maximale Aktivierung der iNOS wird die etwa 20-30-fache Menge an NO freigesetzt als es durch die maximale Aktivierung der cNOS möglich wäre. Promotoren für die Freisetzung von NO durch cNOS sind unter anderem: Scherstress, ATP, Histamin, Thrombin, Endothelin und PAF. Inflammatorische Mediatoren wie IFN- $\gamma$ , TNF-alpha und IL-1 aber auch Substanzen wie LPS stimulieren die iNOS(72). Wenngleich die Rolle von NO bei der Inflammation noch nicht vollständig verstanden wird und es Hinweise für anti- aber auch für pro-inflammatorische Eigenschaften von NO gibt erscheint ein wichtiger anti-inflammatorischer Effekt gesichert: die inhibitorische Wirkung von NO auf NF- $\kappa$ B, einem nukleären Transkriptionsfaktor, der die Generierung verschiedener pro-inflammatorischer Mediatoren wie u.a. TNF-alpha, IL-1, IL-8 und Leukozytenadhäsionsmoleküle reguliert (siehe Seite 18) (73, 74).

Die wichtigste derzeit bekannte biologische Eigenschaft von NO ist die vasodilatierende Wirkung, die zu einer verbesserten Gewebepfusion führt. Zusammen mit thrombozytenaggregationshemmenden Eigenschaften und der anti-adhäsiven Wirkung auf aktivierte PMN und Endothelzellen führt die Freisetzung von NO zu einer verbesserten Mikrozirkulation. Der Einfluss von NO auf inflammatorisches Gewebe ist jedoch zweischneidig und zu den protektiven Effekten des NO gesellen sich auch einige, die sich nachteilig auswirken können.

Im inflammatorischen Gewebe reagiert NO in Anwesenheit von Superoxidanion und bei niedrigem pH zu Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ), das seinerseits ein potentes Oxidanz ist. Niedrige Konzentrationen an Peroxynitrit können Apoptose durch die Oxidation von DNA auslösen und höhere Konzentrationen haben einen direkt zytotoxischen Effekt(75). Aber auch die direkte Wirkung von NO auf inflammatorische Zellen ist gegensätzlich. Während Neutrophile durch eine Aktivierung der Guanylatcyclase eine verlängerte Lebensspanne haben, induziert NO bei Makrophagen Apoptose (76). Die Gesamtwirkung des NO auf die Gefäßpermeabilität, die einerseits durch die Gefäßrelaxation vergrößert und andererseits durch die anti-inflammatorischen Wirkungen des NO vermindert ist, kann nicht sicher abgeschätzt werden.

## **1.12 MIKROZIRKULATION NACH ISCHÄMIE UND REPERFUSION**

Eine Fülle verschiedener Substanzen, die lokal exprimiert oder systemisch in die Endstrombahn gelangen, haben relaxierende und/oder vasokonstringierende Wirkung. Diese Substanzen lassen sich in folgende Klassen einordnen: Arachidonsäuremetabolite, Endothelin, NO, Adenosine, Katecholamine, oxygen-derived free radicals (ODFR), das lokale Renin-Angiotensin System und endothelial-derived hyperpolarization factors (EDHF). Einige Substanzen wirken immer vasokonstringierend wie  $\text{TxA}_2$  andere immer vasodilatierend wie NO. Andere wie Endothelin haben vasokonstringierende Effekte über  $\text{ET}_A$ - und  $\text{ET}_B$ -Rezeptoren an glatten Muskelzellen.  $\text{ET}_B$ -Rezeptoren an Endothelzellen verursachen jedoch eine Freisetzung vasodilatierender Substanzen wie  $\text{PGI}_2$  und NO.

Während Hypoxie in fast allen Geweben eine Vasodilatation verursacht, wird in der Lungenstrombahn durch Hypoxie eine Vasokonstriktion ausgelöst. Dieser Effekt führt zu einem Ventilations/Perfusionsmismatch durch eine Umverteilung der Perfusion von peripheren zu zentralen Arealen. Diese Vasokonstriktion wird durch die Synthesehemmung der Calcium-abhängigen cNOS sowie von  $\text{PGI}_2$  im pulmonalen Gefäßbett verursacht. Gleichzeitig kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von Endothelin-1 und Thromboxan  $\text{A}_2$ (77). Im Falle einer Einzellungentransplantation führt der massiv erhöhte vaskuläre Widerstand im Transplantat zu einer deutlichen Minderperfusion der transplantierten Lunge. Da durch Wegfall der bronchialarteriellen Durchblutung der pulmonalarterielle Fluss gleichzeitig der nutritive Fluss ist, besteht zudem die Gefahr der fortwährenden Ischämie der transplantierten Lunge. Bei entsprechender Grunderkrankung kann die Erhöhung des pulmonalen Gesamtwiderstandes in der weiteren Folge zum Rechtsherzversagen führen.



### 1.13 SURFACTANT

Pulmonaler Surfactant ist ein Lipoproteinkomplex. Er besteht zu über 90% aus Lipiden, die ihrerseits zu etwa 90% aus Phospholipiden zusammengesetzt sind. Innerhalb der Phospholipidfraktion entfallen etwa 80% auf das mit jeweils zwei 16:0 Palminsäure substituierte also dipalmitoylierte Phosphatidylcholin (DPPC). Weitere 10% entfallen auf die zweite wichtige Komponente Phosphatidylglycerol (PG). Neben dieser Lipidkomponente sind gegenwärtig 4 Surfactant-spezifische Apoproteine bekannt, die der Reihenfolge ihrer Entdeckung nach als SP-A, SP-B, SP-C und SP-D bezeichnet werden. Pulmonaler Surfactant wird von den alveolären Typ-II-Zellen gebildet, in Form sogenannter Lamellarkörperchen gelagert und auf verschiedene Reize sezerniert. Die Lamellarkörperchen erfahren innerhalb der alveolären Hypophase, eine strukturelle Umwandlung in das sog. tubuläre Myelin und große, multilamelläre Vesikel, die zusammen auch als „large surfactant aggregates“ bezeichnet werden. Für die Oberflächenaktivität oder biophysikalische Funktion des Surfactant sind folgende Komponenten essentiell: DPPC, PG, SP-B und SP-C. SP-A, ermöglicht rezeptorgesteuert die Wiederaufnahme der Phospholipide in die Alveolarzellen Typ II.

Durch Absenkung der alveolären Oberflächenspannung stabilisiert Surfactant also die Alveolen vor allem in Endexpirationsstellung, verhindert somit deren Kollaps und macht spontanes Atmen bei regulären transthorakalen Druckverhältnissen erst möglich. Die physikalische Grundlage hierfür liefert das LaPlace'schen Gesetz ( $p=2\sigma/r$ ), demzufolge der Druck abhängig von dem Radius und invers abhängig von der Oberflächenspannung ist. Es lassen sich folgende, organphysiologische Hauptfunktionen des Surfactantsystems ableiten: Wie von von Neergard 1929 erstmalig erkannt, hängt die pulmonale Compliance zu einem großen Prozentsatz von der alveolären Oberflächenspannung ab. Weiterhin kommt es zwischen zwei ungleich großen, kommunizierenden Blasen (=Alveolen) in Abwesenheit von Surfactant oder bei funktionell inaktivem Surfactant unweigerlich zu einer Umverteilung der Luft zu Gunsten der größeren Blase, weshalb Surfactant früher auch als Anti-Atelektasen-Faktor bezeichnet wurde. Folgerichtig lassen sich bei surfactantdefizienten ARDS-Patienten histologisch atelektatische neben überblähten Lungenarealen abgrenzen. Schließlich übt Surfactant durch die Stabilisierung der Alveolen einen erheblichen Einfluss auf die Ventilations-Perfusions-Verteilung aus. In diesem Sinne begünstigt das Fehlen oder die gestörte Funktion des Surfactant das Auftreten eines pulmonalen shunt-Flusses. Bei einem ARDS ist der Verlust der Fähigkeit zur Senkung der Oberflächenspannung durch Surfactant hinreichend aus BALF-Material dokumentiert. Dieser Funktionsverlust ist einer veränderten biochemischen Zusammensetzung, der Inaktivierung durch Plasmaproteine und der Wirkung inflammatorischer Mediatoren wie Sauerstoffradikale und Proteasen zuzuschreiben. Zudem kommen metabolische Veränderungen der Alveolar Typ

II-Zellen, die die Surfactant Wiederaufnahme und Sekretion hemmen (78-80). So konnte in einer Fülle von experimentellen Modellen und klinischen Anwendungen ein verbesserter Gasaustausch nach intrabronchialer Applikation von bovinem Surfactant nachgewiesen werden (81, 82). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Surfactant durch die Herabsetzung der alveolären Oberflächenspannung den intravaskulär-interstitiellen Druckgradienten und damit den transepithelialen Flüssigkeitseinstrom reduziert (83). Fracica et al. fanden an einem Primatenmodell protektive Effekte durch Surfactantapplikation auf das alveoläre Epithel und das Endothel nach ARDS Induktion durch Hypoxämie (84). Schließlich, wenngleich nicht vollständig charakterisiert, lassen sich Einflüsse auf die komplexe Interaktion zwischen Surfactant-Fraktionen und mikrobiellen Keimen und ihren Bestandteilen (z.B. LPS) sowie immunkompetenten Zellen finden, die den Verlauf des inflammatorischen Geschehens in der Lunge beeinflussen (85-87). Aufgrund der Parallelitäten die sich aus den pathophysiologischen Veränderungen bei einem ARDS und einem Ischämie-Reperfusionsschaden ergeben, liegt es nahe, dass die Inaktivierung des Surfactant-Systems auch im Falle des Reperfusionsschadens besteht. In tierexperimentellen Untersuchungen nach Lungentransplantation am Hund und an der Ratte sind bei unterschiedlichen Ischämiezeiten (6-38h) Surfactantveränderungen gefunden worden. Durch Surfactantapplikation konnte die Lungenfunktion verbessert werden (88-93). Es bestanden veränderte Phospholipid Profile, verminderter Gehalt von SP-A, eine Reduktion des relativen Anteiles von „large surfactant aggregates“ und der Verlust der biophysikalischen Surfactantfunktion. Eine detaillierte Untersuchung der Fettsäureprofile und ihrer molekularen Spezies von Phosphatidylcholin sowie der Einflüsse auf die hydrophoben Surfactant Apoproteine SP-B und SP-C nach Lungentransplantation sind erstmals von unserer Arbeitsgruppe publiziert worden.

## **1.14 ISCHEMIC PRECONDITIONING**

Ischemic preconditioning (IPC) bedeutet, dass eine kurze, vorübergehende Ischämie eines Organs die Toleranz gegenüber einer langandauernden ischämischen Episode erhöht. IPC wurde zuerst am Herzen entdeckt, wo Murry et al. eine verminderte Infarktgröße nach IPC und nachfolgender Okklusion eines Koronargefäßes feststellte (94). Diese Entdeckung hat ein eigenes Forschungsfeld begründet, dem sich immer noch weitere Horizonte erschließen. Die Verkleinerung der Infarktareale aber auch die zelluläre Protektion des ischämischen Grenzbereiches ziehen am Herzen messbare funktionelle Verbesserungen nach sich:

### 1. Vermindertes stunning

Die Kontraktilität der IPC-Herzen ist höher als in der Kontrollgruppe. Dieser Effekt geht in großem Maße auf das Konto der verkleinerten Nekrose aber die myokardiale Kontraktilität im Ischämie-Grenzbereich ist ebenso verbessert (95).

### 2. verminderte Arrhythmien

Die Vulnerabilität des Herzens nach IPC ist geringer als in der Kontrollgruppe (96). Der mechanistische Zusammenhang zwischen Infarktgröße und „myocard at risk“ zur Auslösung von Arrhythmien drängt sich auf. Dieser Zusammenhang ist aber weder aus klinischer noch aus theoretischer Sicht zwingend.

### 3. veränderter Metabolismus

Murry et al. fanden verminderte Laktat-Spiegel nach IPC, was auf eine verminderte anaerobe Glycolyse hinweist. Die Entstehung der Gewebsazidose war in der IPC-Gruppe ebenfalls vermindert. Die intrazellulären ATP Spiegel waren in der IPC-Gruppe höher was auf einen verminderten Verbrauch energiereicher Phosphate hindeutet (94, 97, 98).

### 4. remote preconditioning

Es konnte gezeigt werden, dass die molekularen Prozesse, die durch ischemic preconditioning ausgelöst werden, Wirkung an weiteren Organen entfalten können. Nach Induktion von IPC an einem Organ findet sich eine gewisse Protektion auch an anderen Organen. Dies spricht für eine Freisetzung von Substanzen in den systemischen Kreislauf die die Fernwirkung medieren (99).

Nach Entdeckung des IPC-Phänomens hatte es viele Spekulationen bezüglich eines kompensatorisch funktionellen Hintergrundes gegeben, der einen eigenen molekularen Mechanismus des IPC negiert. Sowohl die Kollateralgefäß-Hypothese, mit der die verminderte Nekrosebildung durch die vermehrte Kollateraldurchblutung erklärt werden sollte, als auch die Stunning-Hypothese bei der es nach IPC durch myokardiale Minderkontraktion zum geringeren Verbrauch von energiereichen Phosphaten kommen soll, konnte als alleinige Erklärung für die protektive Wirkung des IPC aufrecht erhalten werden. Stark verkürzt stellt man sich derzeit den molekulare Mechanismus wie folgt vor:

1. Das aus ischämischen Zellen freiwerdende Adenosin wirkt über den A<sub>1</sub>-Rezeptor.
2. Durch die G<sub>i</sub>-Rezeptor-Stimulation wird Phospholipase C (oder D) aktiviert was wiederum zur Bildung von Diacylglycerol (DAG) und Inositrtriphosphat (IP<sub>3</sub>) führt.
3. DAG aktiviert weitere Kinasen so zum Beispiel die Tyrosin-Kinase (TK), der inzwischen eine Hauptrolle bei der Transduktion des IPC zugesprochen wird. Die Aktivierung von Phosphokinase C (PKC) ist wahrscheinlich nur ein Epiphänomen.

4. Der ATP-sensitive  $K^+$ -Kanal ( $K_{ATP}$ ) wird als Effektor des IPC angesehen, ohne dass die genauen molekularen Mechanismen bisher geklärt wären.

Die molekularen Hintergründe des IPC sind noch nicht vollständig charakterisiert. Nach der ersten Phase der Protektion (Intervall zwischen Reperfusion und Insult), die nach 60-120 min vollständig verschwindet, öffnet sich nach 24-72 Std. ein „second window of protection“. Nach 1-24 Std. verschwindet der protektive IPC-Effekt vollständig um dann, wenngleich in verminderter Wirksamkeit, erneut wiederzukehren. Die molekularen Hintergründe zwischen den Mechanismen des klassischen ischemic preconditioning und dem second window of protection sind offenbar unterschiedlicher Natur.

Auch über den Mechanismus des second window of protection gibt es mehrere Theorien, die ebenfalls in aller Kürze aufgezählt werden:

1. Heat shock proteine (u.a. HSP-70) werden nach Hitzeschock, oxidativem Stress, I/R, und anderen Traumata exprimiert. Durch Induktion von HSP, z.B. durch Gen-Transfektion lassen sich ähnliche Effekte wie nach IPC auslösen(100, 101). HSP-Induktion ist nach IPC nachweisbar.
2. Subletale Ischämie, Hitze-Exposition und Zytokingabe führen zu einer Akkumulation von intrazellulären Antioxidantien. Diese könnten bei einer erneuten Ischämie die Induktion des Reperfusionsschadens mit Zellwanddestruktion durch oxidative Metabolite und nachfolgender Lipidperoxidation (Zerstörung von membranständigen Rezeptoren) verhindern.
3. Die zweite Protektion kann beim Kaninchen ebenfalls durch einen Adenosinrezeptor blockiert werden. Weiterhin kann sie durch einen PKC-Blocker (Cheleritrine) gehemmt werden. Wie die Kinasen in den Protektionsmechanismus eingreifen ist derzeit unklar.

Dabei ist die Wirksamkeit des IPC sehr stark Organ- Spezies- und Altersabhängig. Für das Organ Herz sind Parameter wie Zeitdauer des IPC (zwischen 5 und 10 min.), Anzahl der IPC Episoden (1-10), des Zeitintervalls (1. Reperfusion) zwischen IPC und Insult (2-90 min) und der Zeitdauer der ischämischen Insultes (-60 min) variabel, ohne dass der Effekt gänzlich verschwindet. Für ein bestimmtes Organ und eine Spezies lassen sich diese Parameter optimieren und können dann den Reperfusionsschaden (Nekrose) auf bis zu 20% des Kontrollwertes reduzieren. Protektive Effekte des IPC wurden in verschiedenen Organen wie Herz und Leber, Niere, Skelettmuskel und Nervengewebe war dieses Phänomen nachweisbar (102). In jüngster Zeit ist die Verminderung

der Expression pro-inflammatorischer Zytokine nach IPC am Herzen und am Nervengewebe publiziert worden (103).

Sehr wenig war bisher über die Wirkung von IPC an der Lunge bekannt. Du et al. beschrieben erstmals einen protektiven Effekt an einem heterologen Lungentransplantationsmodell. Nach 12 Stunden kalter Ischämie war der Gasaustausch in der IPC-Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe (104).

## **1.15 ENDOTOXIN TOLERANZ**

Bei der Induktion von Fieber zur Therapie von Infektionskrankheiten wurde bereits in den 40er Jahren die Beobachtung gemacht, dass bei Patienten, die mit hitze-inaktivierten gram-negativen Bakterien geimpft wurden, immer höhere Dosen notwendig waren, um eine Temperaturerhöhung auszulösen (105). Auch Mäuse, die mit steigenden Dosen von *Serratia marcescens* infiziert wurden, überlebten nach einigen Zyklen einer subletalen Dosis, die 16-fache LD<sub>50</sub> für unbehandelte Tiere (106). Zunächst wurde vermutet, dass der Hintergrund dieses Phänomens eine erhöhte Aufnahme und Inaktivierung von Endotoxin durch das reticulo-endotheliale System sei (107). Weitere Untersuchungen zeigten, dass es neben einer frühen, O-Antigen unabhängigen Toleranz eine späte Toleranz gibt. Während die frühe Toleranzentwicklung innerhalb von 72 Std. nachlässt, entwickelt sich die späte Phase nach ca. 96 Std. und hält einige Tage an (108). Mit der Verfügbarkeit von TNF-alpha als rekombinante Substanz stellte sich eine Kreuzreaktion mit Endotoxin heraus d.h. nach TNF-alpha Injektionen wurden Versuchstiere tolerant gegenüber Dosiserhöhungen von TNF-alpha aber auch gleichzeitig gegenüber Endotoxininjektionen und umgekehrt. Der Schluss lag nahe, dass die frühe Endotoxin/TNF-alpha Toleranz die Konsequenz einer verminderten Expression inflammatorischer Zytokine durch Makrophagen ist (109) während die späte, O-Antigen abhängige, durch spezifische Antikörperbildung gegenüber Endotoxin ausgelöst wird. Der genaue Mechanismus der Toleranzinduktion ist bisher nicht vollständig entschlüsselt. Die passive Übertragbarkeit der Endotoxin-Toleranz durch Serumtransfer wurde bereits 1960 von Friedman et al. beschrieben (110). Neuere Untersuchungen geben Hinweis auf einen noch nicht näher beschriebenen Inhibitor, der nach repetitiver Gabe von Endotoxin gebildet wird und die Zytokin-Freisetzung aus Makrophagen supprimiert. Glucocorticoide und IL-10 wurden verdächtig die Effektoren der Endotoxin Toleranz zu sein, was allerdings durch experimentelle Untersuchungen ausgeschlossen werden konnte (111, 112). In einem Modell an der Maus konnte gezeigt werden, dass nach Injektion von Endotoxin (80µg/Maus) und einer erneuten Gabe am 4. Tag (160µg/Maus) das Serum dieser Maus die TNF-alpha-Freisetzung aus Endotoxin-

stimuliertem Vollblut signifikant reduzierte. Es kam lediglich zur Suppression der Freisetzung, jedoch nicht zur Beeinflussung der biologischen Wirksamkeit von TNF-alpha. Dieses inhibitorische Serumbestandteil war nicht identisch mit IL-10 und keinem anderen bekannten anti-inflammatorischen Zytokin. Auch die CD-14 Rezeptorfunktion ist nach Endotoxin-Toleranz nicht herunterreguliert (113, 114). Ähnliche Befunde ließen sich auch bei der Stimulation von Peritonealmakrophagen erheben (unveröffentl. Ergebnisse).

Die Vermittlung der ET auf zellulärer Ebene ist bisher nicht geklärt. Szabo et al. fanden Hinweise für eine Hemmung der iNOS bei ET-Ratten nach Endotoxininfusion. Die Aktivierung der iNOS wird für hämodynamische Auswirkungen wie Gefäßdilatation und Blutdruckabfall im septischen Schock verantwortlich gemacht. Die Autoren folgerten aus ihren Ergebnissen, dass es durch Induktion einer ET zur erhöhten Produktion endogener Kortikoide kommt, die ihrerseits die iNOS hemmen. Durch die Hemmung der iNOS kam es bei den ET-Tieren nicht zum Blutdruckabfall und zum vasomotorischen Tonusverlust, der in der Kontrollgruppe zu beobachten war. Der Effekt der Verhinderung des vasomotorischen Tonusverlustes nach Endotoxininfusion ließ sich durch Gabe des Kortikoidantagonisten RU 38486 wieder aufheben (115). Die Rolle der NO-Freisetzung bei ET wird jedoch kontrovers diskutiert.

Auf der Ebene der Signaltransduktion lässt sich in Mäuse-Makrophagen nach ET-Induktion eine, im Vergleich zur Kontrollgruppe, verminderte Aktivierung des Transkriptionsfaktors für pro-inflammatorische Zytokine, NF $\kappa$ B, im Gel-shift-assay nachweisen (116). Nach Induktion von Endotoxin-Toleranz konnte an NF $\kappa$ B in monomac-6 Zellen eine Konformitätsänderung an der Bindungsstelle für die DNA-Transkription gezeigt werden, die zu einer Transkriptionshemmung an der Bindungsstelle und damit zur kompetitiven Antagonisierung der Transkription von pro-inflammatorischen Zytokinen führt (117). NF $\kappa$ B wird durch Phosphorylierung und Abspaltung seines Inhibitors I $\kappa$ B aktiviert. Die Phosphorylierung von I $\kappa$ B erfolgt durch zwei weitere Kinasen I $\kappa$ B-Kinase-alpha und I $\kappa$ B-Kinase-beta. Diese werden wiederum durch die Signal-regulierten Kinasen (c-Jun NH $_2$ -terminal Kinase und p38-Kinase) aktiviert. Medvedev et al. fanden bei ET-Mausmakrophagen einen Mechanismus der durch die Inhibition der Signal-regulierten Kinasen die verminderte Phosphorylierung der IKKs, die verminderte Phosphorylierung von I $\kappa$ B und damit die verminderte Aktivierung von NF $\kappa$ B erklärt. In diesen Versuchen waren verschiedene NF $\kappa$ B-abhängige pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine vermindert exprimiert. Toleranzentwicklung gegenüber chemischen und physikalischen Noxen wie heat-schock, Hypoxie, subletaler hämorrhagischer Schock, ischemic preconditioning, und LPS bzw. TNF Einwirkungen sind in der Literatur mehrfach beschrieben. Ob es ein „missing link“ zwischen all diesen Toleranzentwicklungen gibt, dem ein gemeinsamer Mechanismus zu Grunde liegt, ist derzeit unklar. Mendez et al. konnten zeigen, dass nach subletalem hämorrhagischen Schock eine

Kreuztoleranz gegenüber einer LPS-Injektion besteht. Durch Gabe eines Makrophageninhibitors (CNI-1493) kann die Toleranzentwicklung verhindert werden. Mendez et al vermuten eine Änderung der Signaltransduktion in Makrophagen durch ET-Induktion. Die inhibitorischen Effekte nach ET beschränken sich nicht auf die verminderte Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine aus Makrophagen sondern verändern die Signaltransduktion der Endothelzellen wie Lau et al. nachweisen konnte. Folgende inhibitorischen Effekte auf Inflammation können durch ET ausgelöst werden: Verminderung von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche, verminderte Bildung von Sauerstoffradikalen und Freisetzung inhibitorischer Mediatoren wie HSP-70 (118-121).

Nachdem in einer Reihe von tierexperimentellen Sepsis-Modellen wie Coecal-Ligatur und Panktion (CLP) nachgewiesen werden konnte, dass die Induktion von Endotoxin Toleranz zu einer verminderten Expression pro-inflammatorischer Zytokine führt und damit bezüglich des Überlebens der Versuchstiere Vorteile bringt (122-125), sind weitere Versuche unternommen worden Krankheitsbilder mit erhöhter pro-inflammatorischer Zytokin-Freisetzung zu untersuchen. Bei Ratten im hämorrhagischen Schock konnte nachgewiesen werden, dass die Gabe von TNF-Antikörpern vor Induktion des Schocks signifikante Überlebensvorteile bietet (126). Flohe et al konnten allerdings bezüglich der Expression von HSP-70-mRNA aus Lunge und Leber von toleranten Mäusen nach LPS Gabe in der semiquantitativen RT-PCR keinen signifikanten Unterschied zwischen der ET-Gruppe und der Kontrollgruppe feststellen (127).

Nach 90 minütiger warmer Ischämie und nachfolgender Reperfusion der Leber, die in der Kontrollgruppe zu einer Permeabilitätsstörung der Lunge im Sinne eines ARDS führte, konnte nach ET ein Lungenödem verhindert werden. In dieser Untersuchung lagen die Plasma TNF-alpha Spiegel nicht unter denen der Kontrollgruppe (128). In Ischämie/Reperfusionsversuchen am Herzen konnte ein protektiver Effekt der ET bestätigt werden. Nach Okklusion einer Koronararterie fand man in der ET-Gruppe verkleinerte Infarkt-Areale und verminderte Rhythmusstörungen (129-131).

Eine Vielzahl von Arbeitsgruppen haben an unterschiedlichen Modellen ein protektives Prinzip dargestellt, dessen molekulare Hintergründe bisher unverstanden sind. In den dargestellten Modellen wurde durch unterschiedliche Manipulationen eine inflammatorische Reaktion ausgelöst. Es ist vorstellbar, dass der Effekt der Endotoxin-Toleranz an einer Stelle einsetzt, an der die verschiedenen pathophysiologischen Mechanismen der pro-inflammatorischen Antwort zu einer gemeinsamen Endstrecke zusammenlaufen.

## **2 FRAGESTELLUNGEN**

Der Ischämie und Reperfusionsschaden an der Lunge wurde in mehreren Teilprojekten an einem Hundemodell bearbeitet. Die Veränderung des pulmonalen Surfactantsystems, die Wirkung einer bronchoskopischen Surfactantapplikation und pulmonale Perfusion wurde an einem orthotopen Transplantationsmodell untersucht. In einem zweiten Modell mit 3-stündiger warmer Ischämie der linken Lunge wurde der Frage nach der protektiven Wirksamkeit einer ischämischen Präkonditionierung nachgegangen. In einer weiteren Studie wurden protektive Effekte einer Endotoxin Toleranz auf den Reperfusionsschaden der Lunge untersucht.

### I. Veränderungen der pulmonalen Mikrozirkulation nach Transplantation

1. Bestehen Unterschiede bezüglich des regionalen Blutflusses zwischen der transplantierten und der nativen Lunge (Kreuzvergleich)?
2. Ergeben sich Veränderungen des regionalen Blutflusses in der transplantierten und der nativen Lunge nach Transplantation (Longitudinalvergleich)?
3. Gibt es einen Zusammenhang zwischen Ödementwicklung und der Erhöhung des pulmonal-arteriellen Widerstandes der Lunge nach Transplantation und Reperfusion?

### II. Surfactant

1. Sind klinische Zielgrößen wie  $pO_2/FiO_2$  und pulmonale Compliance nach Induktion eines Reperfusionsschadens durch die intrabronchiale Surfactantapplikation zu beeinflussen?
2. Hat Surfactant im vorliegenden Modell klinisch relevante anti-inflammatorische Eigenschaften? Ist die Permeabilitätsstörung nach I/R durch die Surfactantgabe vermindert?
3. Inwieweit ist die Funktion des Surfactantsystems nach Transplantation gestört? Ist eine Wiederherstellung der biophysikalischen Eigenschaften des Surfactantsystems durch Substitution möglich?

### III. Ischemic preconditioning

1. Ist eine ischämische Präkonditionierung (IPC) geeignet Lungenfunktionsparameter wie Gasaustausch und pulmonale Compliance nach warmer Ischämie und Reperfusion zu verbessern?
2. Trifft dies auch für das contralaterale Organ zu?
3. Sind diese Verbesserungen der Lungenfunktion mit unterschiedlichen IPC-Protokollen zu erreichen?



4. Ist eine Verminderung der Permeabilitätsstörung in der reperfundierten und der contralateralen Lunge nachweisbar?
5. Beeinflusst die ischämische Präkonditionierung die Expression pro- oder anti-inflammatorischer Zytokine im Blut, im Lungengewebe oder in den Zellen der bronchoalveolären Spülflüssigkeit nach Ischämie und Reperfusion?

#### D. Endotoxin Toleranz

1. Ist die Induktion von Endotoxin-Toleranz bei Hunden möglich?
2. Besteht ein Zusammenhang zwischen Endotoxin-Toleranz und Ischämietoleranz? Sind Verbesserungen der Lungenfunktion nach Ischämie und Reperfusion in der endotoxin-toleranten Gruppe nachweisbar?
3. Vermindert sich nach Induktion von Endotoxin-Toleranz die Permeabilitätsstörung in der reperfundierten und der contralateralen Lunge?
4. Lässt sich durch Induktion einer Endotoxin-Toleranz die Expression pro- oder anti-inflammatorischer Zytokine im Blut, im Lungengewebe oder in den Zellen der bronchoalveolären Spülflüssigkeit beeinflussen?

## **3 STUDIEN**

### **3.1 MODELLE UND METHODEN**

#### **Besonderheiten des Modells**

Ziel der Untersuchungen war eine Beschreibung von Ischämie- und Reperforationsbedingten Veränderungen der transplantierten bzw. reperfundierten Lunge sowie des nativen, nicht-reperfundierten Organs. Die Wertigkeit potentiell organprotektiver Strategien wie Surfactantinstillation, ischemic preconditioning und Induktion von Endotoxin-Toleranz wurde dann durch den Vergleich mit der Kontrollgruppe ermittelt. Die hier vorgestellten Studien sind an einem experimentellen Modell durchgeführt worden, das gegenüber bisherigen Modellen einige Modifikationen aufweist, von denen wir einen entscheidenden Zugewinn an Information erwarteten. Ein wesentlicher Kritikpunkt an bisherigen Lungentransplantationsmodellen war, dass durch modellimmanente Einflüsse pathophysiologische Reaktionen ausgelöst wurden, die innerhalb dieser Modelle von den pulmonalen Veränderungen durch Ischämie und Reperforation nicht zu trennen waren. Die Forderung an unser Modell lautete: Minimierung der modellspezifischen unphysiologischen Lagerung und Beatmung sowie Verzicht auf Hilusklemmung während der Messzyklen. Dieses experimentelle Modell wurde von unserer Arbeitsgruppe entwickelt und war vorher nicht in der Literatur beschrieben worden.

1. synchronisierte seitengetrennte Beatmung mit zwei Beatmungsgeräten im Master/Slave Modus

Durch diese Beatmungsform wurde ein shift des Atemminutenvolumens (AMV) von der transplantierten Seite zur nativen Seite vermieden. Bei gemeinsamer Beatmung der transplantierten und nativen Lunge über einen Trachealtubus wird die native Lunge (hohe Compliance) überbläht, während die transplantierte Lunge minderventiliert wird (niedrige Compliance). Dieser Mismatch des AMV führt auf der nativen Seite zu einem „ventilation induced lung injury“ (VILI), das einer kürzlich veröffentlichten Studie zufolge zur weiteren Schädigung kompromittierter Lungen führt und das Überleben bei ARDS-Patienten negativ beeinflusst (132). Durch Überblähung (VILI) der nativen Lunge können allein durch die Beatmungsform folgende pathophysiologischen Veränderungen ausgelöst werden: PMN-Migration, systemische und intrapulmonale Zytokinfreisetzung, Schädigung des Surfactant und Einflüsse auf Gasaustausch und Compliance der Lunge. Diese Schädigungen sind experimentell durch erhöhte Tidalvolumina an gesunden Lungen ausgelöst worden. Neben diesen Schäden an der nativen Lunge kommt es bei gemeinsamer Beatmung zur Minderventilation der

transplantierten Seite mit der Konsequenz beatmungsinduzierter Atelektasenbildung und damit akzidenteller Verschlechterung des transplantierten Organs. Durch die getrenntseitige Beatmungsform wurde jeder Lungenseite druckkontrolliert ein über den Beobachtungszeitraum konstantes AMV angeboten.

In bisherigen experimentellen Modellen wurde der Lungenhilus der nativen Lunge geklemmt oder auch die rechte Lunge vollständig entfernt. Dies allerdings birgt die Gefahr einer Beeinflussung der Hämodynamik und der Lungenfunktionsparameter. Der Vorteil des hier vorgestellten Modells liegt in der Möglichkeit der gleichzeitigen Beobachtung von Transplantat und contralateraler Lunge ohne dass es zu einer messbedingten Beeinflussung der Lungenseiten kommt. Auch ein Überschwappen von ödematöser Flüssigkeit von einer Lungenseite zur anderen wird durch die Fixierung des Beatmungsschlauches im linken Hauptbronchus verhindert. Die entnommene BALF repräsentiert somit die Einflüsse von Ischämie und Reperfusion auf die transplantierte und die native Lunge.

## 2. Einlage von pulmonalvenösen Kathetern

Zur Gewinnung von Blutproben aus der nativen und der transplantierten Lunge für die Bestimmung der Blutgase wurden jeweils in die Pulmonalvene des Unterlappens (nativ und TX) ein ZVK-Katheter eingelegt und mit einer Tabaksbeutelnaht fixiert. Durch die Einlage der pulmonalvenösen Katheter war eine getrenntseitige Beobachtung der transplantierten und der nativen Lunge möglich, ohne dass Einfluss auf das Modell (Abklemmen der contralateralen Art. pulm. zur Messung) genommen wurde.

## 3. Aufrechte Lagerung des Versuchstieres um lagerungsbedingte Veränderungen der Lungenfunktion zu minimieren.

Lagerungsbedingte Lungenödeme sind in der Intensivmedizin ein umfangreich beschriebenes Problem, die durch Drehen der Patienten in 135° Lagerung beeinflusst werden können. Ziel der Untersuchung war es neben den Veränderungen im Transplantat auch Schäden der nativen Lunge zu dokumentieren. In Seitenlage sammelt sich bei bestehender Permeabilitätsstörung der Lunge Flüssigkeit im abhängigen Organ. Hierdurch wäre eine sinnvolle Untersuchung der nativen Lunge nicht möglich gewesen. Aus diesem Grunde entwickelten wir die aufrechte Lagerung mit Hilfe einer Vakuummatratze.

### 3.1.1 TRANSPLANTATIONSMODELL

Bei Foxhounds beiderlei Geschlechts mit einem Gewicht zwischen 27-33 kg wurde eine heterologe orthotope Lungentransplantation durchgeführt. Die Spender und Empfängertiere (jeweils 12) wurden so zugeordnet, dass die Gewichts Differenz nicht mehr als 3 kg betrug. Die Versuchstiere wurden veterinärmedizinisch betreut und waren bezüglich der Körpertemperatur, des Blutbildes und der Lungenauskultation frei von Infektionen. Der chirurgische Eingriff wurde unter sterilen Kautelen von einem Herz- Thoraxchirurgen durchgeführt. Alle Tiere waren während des gesamten Verlaufes hämodynamisch ohne Katecholamingabe stabil. Bluttransfusionen waren nicht erforderlich. Die Volumensubstitution erfolgte bei einem ZVD < 8 mmHg und einem mittleren Blutdruck < 60 mmHg mit Ringer Laktat. Zwischen den Gruppen bestand kein Unterschied in der kalten und warmen Ischämiezeit. Therapie- und Kontrollversuche wurden abwechselnd durchgeführt.

#### **Lungenentnahme**

Nach Einleitung der Anästhesie mit Thiopental (30 mg/kg KG) und oropharyngealer Intubation wurden die Tiere mit einer Frequenz von 10/min mit einem  $FiO_2$  von 0,5 in einem volumenkontrollierten (14ml/kg KG) und druckbegrenzten ( $p_{max} < 30$  mmHg) Modus beatmet (EvitaII, Dräger, Lübeck). Das Atemzugvolumen ist entsprechend dem  $pCO_2$  mit einem Richtwert von 35-40 mmHg angepasst worden. Die Anästhesie wurde mit intravenöser Gabe von Fentanyl (0,7 mg/h) Midazolam (5mg/h) und Rocuronium (15 mg/h) fortgeführt. Vor Thorakotomie wurden zusätzlich 1,5 mg Fentanyl appliziert. Die linkslaterale Thorakotomie erfolgte durch den 5. Interkostalraum. Nach Perikarderöffnung und Präparation der Art. pulmonalis wurde ein Perfusionskatheter über eine Tabaksbeutelnaht in die Art. pulm. comm. eingebracht. In der Surfactantgruppe erfolgte nun die bronchoskopische Instillation von insgesamt 50 mg/kg KG bovines Surfactant (Alveofact<sup>2</sup>, Thomae) segmental in die linke Lunge. Die Kontrollgruppe erhielt keine Instillation. Nun erfolgte die Amputation des linken Vorhofohres und die Perfusion mit 60ml/kg KG einer 4°C kalten, modifizierten Euro-Collins Lösung. Dieser Perfusionslösung waren 100µg/l  $PGE_2$  zugefügt. Während der Lungenperfusion wurden die Lungen weiterbeatmet und am Ende mit 20 cm  $H_2O$  gebläht und die Trachea mit einem Stapler verschlossen. Das Herz- Lungenpaket wurde entnommen, in sterile Plastikbeutel verpackt und aufschwimmend in einem Kühlschrank für 24 h gelagert.

### **Lungentransplantation**

Die Anästhesieeinleitung, Beatmung und Thorakotomie erfolgte entsprechend der Lungenentnahme. Nun wurde eine Tracheotomie durchgeführt und ein Tubus unter bronchoskopischer Kontrolle in den rechten Hauptbronchus unter Beachtung des hoch abgehenden Oberlappenbronchus vorgeschoben. Der linke Hauptbronchus, die linke Pulmonalarterie und der linke Vorhof wurde ausgeklemmt, die Lunge exzidiert und ex situ lavagiert. Auf dem Präparationstisch wurde die linke Spenderlunge aus dem Herz-Lungen Block präpariert und orthotop implantiert. Die entnommene Lunge diente als Normalwert-Kontrolle und die rechte nicht transplantierte Lunge als Konservierungskontrolle für die Surfactantanalytik und den wet/dry-ratio. Nach Implantation des Organs wurde ein zweiter Tubus über die Tracheotomie in den linken Hauptbronchus vorgeschoben und mit einem Band fixiert. Dieses Manöver erlaubte die getrenntseitige Ventilation der transplantierten und der nativen Lunge. Nachdem die Ventilation des Transplantats sichergestellt war wurden die Klemmen geöffnet und der Zeitpunkt 0 definiert. Zwei dünne Katheter wurden in die linke und rechte Unterlappenvene zur getrenntseitigen Messung der Blutgase eingebracht. Nach Einlage einer Thoraxdrainage und Thoraxverschluss erfolgte die aufrechte Lagerung des Versuchstieres. In der Surfactantgruppe wurde dann die zweite Dosis (200mg/kg KG) bovines Surfactant ebenfalls bronchoskopisch segmental in beide Lungen gegeben. Nach einer 12-stündigen Beobachtungszeit wurde der Thorax erneut eröffnet und die Tiere durch Längsinzision der rechtsventrikulären Ausflussbahn getötet. Beide Lungen wurden entnommen und nach Probenentnahme zur Bestimmung des wet/dry-ratio lavagiert.

### **Beatmungsmodus**

Nach Reperfusion konnte eine getrenntseitige Beatmung der transplantierten und der nativen Lunge mit zwei Evita II-Beatmungsgeräten im Master/Slave-Modus durchgeführt werden. Wegen des Größenunterschiedes erhielt die rechte Lunge 60% des Atemminutenvolumens und die linke Lunge 40%. Die Beatmungsgeräte wurden mit der oben angegebenen Einstellung an das arterielle  $p\text{CO}_2$  adaptiert und diese Einstellung wurde bis zum Versuchsende nicht mehr verändert.

### **Messung des extravasalen Lungenwassers**

Hier wurden zwei Techniken verwandt:

Der wet/dry-ratio wurde von allen entnommenen Lungen bestimmt. Das Gewicht von jeweils drei Lungenproben des Oberlappens wurde direkt nach Entnahme und nach vollständiger Trocknung (65°C, 14 Tage) gemessen.

Der extravasale Lungenwasserindex (EVLWI) sowie der intrathorakale Blutvolumenindex (ITBVI) wurde mit Hilfe der Doppelindikator-Methode mit einem COLD Z-0-21-Monitor (Pulsion Medical Systems, München) bestimmt. Zu diesem Zweck war es nötig einen zweiten fiberoptischen Thermistorkatheter über die Femoralarterie einzulegen. CI, EVLWI, ITBVI konnten nach Injektion von 8ml eisgekühlter indocyanine-green-Lösung (ICG) (1mg/ml) über den zentralvenösen Katheter bestimmt werden. Mit dieser Methode errechnet sich das EVLW und der ITBVI wie folgt:

$$\text{ITBVI} = \text{CI} * \text{MT}_{\text{ICG}}$$

$$\text{EVLW} = (\text{CI} * \text{Mt}_{\text{therm}}) - \text{ITBVI}$$

Wobei  $\text{MT}_{\text{ICG}}$  die mittlere Transitzeit von ICG und  $\text{Mt}_{\text{therm}}$  die mittlere thermale Transitzeit ist. EVLWI und ITBVI wurden nach Anästhesieeinleitung, 1h, 3h, 6h, 9h, 12h nach Reperfusion bestimmt.

## **3.2 PULMONALVASKULÄRER WIDERSTAND IN DER TRANSPLANTIERTEN LUNGE**

### **3.2.1 EINLEITUNG**

In der transplantierten Lunge kommt es im Rahmen eines Reperfusionsschadens zu einer Erhöhung des pulmonalarteriellen Gefäßwiderstandes. Unklar war bisher inwieweit es sich dabei um ein regionales Phänomen handelt oder ob die Vasokonstriktion im pulmonalen Gefäßbett durch die Freisetzung inflammatorischer Mediatoren in die systemische Zirkulation ausgelöst wird. Nach Ischämie und Reperfusion des transplantierten Organs tritt zudem eine ausgeprägte Permeabilitätsstörung im Sinne eines remote injury nicht nur in der transplantierten sondern auch in der nativen Lunge auf. Fraglich war, ob eine Ödementwicklung per se einen Anstieg des vaskulären Widerstandes zur Folge hat. Um diese Fragen zu klären war es zunächst notwendig die pathophysiologischen Mechanismen der Vasokonstriktion nach unilateraler Transplantation zu differenzieren. Methodisch besteht das Problem, dass bei gemeinsamer Beatmung beider Lungen angesichts der extrem unterschiedlichen Compliance eine Minderventilation des Organs mit niedriger Compliance (transplantierte Lunge) auftritt. Die native Lunge mit hoher Compliance wird folglich überbläht. Im transplantierten Organ könnte es durch eine Minderventilation zu einer hypoxischen Vasokonstriktion kommen, die als Folge der gemeinsamen Beatmung hervorgerufen wird. Im vorliegenden Modell wurde die getrenntseitige, volumenkontrollierte und drucklimitierte Beatmung im master-slave Modus etabliert. Dadurch konnte eine adäquate Ventilation beider Lungen sichergestellt werden. Die Perfusion in der transplantierten und nativen Lunge wurde mit Hilfe der sequentiellen Injektion von ca.  $6 \cdot 10^6$  farbigen Mikrosphären ermittelt, die vor und 3 Std. nach Transplantation in die Pulmonalarterie injiziert wurden. Für die Messung in zeitlicher Abfolge standen verschiedene Farben zur Verfügung, so dass die einzelnen Farben den jeweiligen Messzeitpunkten zugeordnet werden konnten. Die Proben aus den postmortem entnommenen Lungen wurden spektral-photometrisch untersucht. Durch Messung der Extinktion konnte auf die Farbkonzentration in der Lungenprobe geschlossen werden. Diese wurde in Korrelation zu einer Referenzprobe mit bekannter Anzahl an Mikrosphären gesetzt. Dadurch konnte die Anzahl der injizierten Mikrosphären und damit der Blutfluss in der untersuchten Region und, bei Kenntnis des HZV (Swan Ganz Katheter), der prozentuale Anteil der regionalen Perfusion am Herzindex (CI) errechnet werden. Die gewonnenen Lungenproben wurden vor der photometrischen Untersuchung getrocknet und dann gewogen. Diese Notwendigkeit ergab sich aus den erheblichen Unterschieden der Herzindices im Versuchsverlauf sowie aus der Tatsache, dass im

Versuchsverlauf das extravasale Wasser in den Lungen massiv zunahm. Durch den Bezug auf das Trockengewicht war der Vergleich der Perfusion zwischen transplantiertem und nativen Organ zu verschiedenen Messzeitpunkten möglich. Weiterhin konnte durch Probenentnahme in unterschiedlichen Regionen der Lunge (apikal, ventral, lateral, dorsal, medial) die Bestimmung der regionalen Perfusion durchgeführt werden.

Die Untersuchungen führten wir an einem orthotopen unilateralen Transplantationsmodell am Hund (Foxhounds, 25-30kg) durch. Nach Narkoseeinleitung erfolgte die aufrechte Lagerung und die Injektion von Mikrosphären in den Hauptstamm der Art. pulmonalis. Diese Messung diente als Referenzpunkt für das transplantierte Organ. Es folgte die Konservierung mit 60ml/kg Euro-Collins Lösung und die Entnahme des Herz-Lungenpaketes. Die Lungen wurden bei 4°C, sterilverpackt und schwimmend im Wasserbad für 24 Std. aufbewahrt.

Die Implantation erfolgte nach 24 Std. in ein größenentsprechendes Versuchstier. Wiederum wurden zunächst Mikrosphären in die pulmonale Strombahn injiziert um einen Referenzwert für die native Lunge zu erhalten. Die Beatmung wurde getrenntseitig mit 2 Beatmungsgeräten (Evita II, Dräger, Lübeck) durchgeführt. Dabei erhielt die rechte Lunge wegen des größeren Volumens 60% und die linke Lunge 40% des Atemzugvolumens. Bei einer Atemfrequenz von 10 /min und einer Druckbegrenzung auf 30 mmHg wurde das Atemminutenvolumen entsprechend dem arteriellen  $pCO_2$  adjustiert. Hämodynamische Parameter wie arterieller Blutdruck, Herzindex, ZVD sowie die systemischen und pulmonalen Gefäßwiderstände wurden stündlich protokolliert. Die Messung des Gasaustausches erfolgte zum einen über einen arteriellen Katheter und zum anderen über pulmonalvenöse Katheter im jeweiligen Unterlappen der Lungen. Zur Bestimmung der Blutgase stand ein Blutgasanalysegerät (ABL4, Radiometer Copenhagen) zur Verfügung. Die dynamische Compliance sowie die Beatmungsdrucke wurden stündlich von den jeweiligen Beatmungsgeräten abgelesen.

Eine detaillierte Beschreibung von Material und Methoden finden sich in der Publikation: Pulmonary blood-flow is inhomogeneously reduced after Euro-Collins preservation and lung transplantation(133).



### 3.2.2 ERGEBNISSE

Die Versuchstiere waren über den gesamten Versuchszeitraum hämodynamisch stabil und benötigten keine Katecholaminunterstützung. Nach Reperfusion kam es zu einem signifikanten Anstieg des Cardiac index ( $2,21 \pm 0,07$  versus  $2,9 \pm 0,06$  l/min\*m<sup>2</sup>;  $p < 0,05$ ) und zu einem konsekutiven Abfall des systemischen Gefäßwiderstandsindex ( $2385 \pm 145,4$  versus  $1699 \pm 41,1$  dyne/cm<sup>5</sup>/m<sup>2</sup>;  $p < 0,05$ ).

#### Regionale Perfusion in der transplantierten Lunge

In allen Regionen der transplantierten Lunge war nach Reperfusion eine verminderte Durchblutung zu verzeichnen. Diese Veränderungen waren am stärksten in der apikalen ( $1,04 \pm 0,28$  versus  $0,17 \pm 0,07$  % CI/min\*100 mg dry weight;  $p < 0,05$ ) und in der dorsalen ( $1,28 \pm 0,18$  versus  $0,61 \pm 0,07$  % CI/min\*100 mg dry weight;  $p < 0,05$ ) Region ausgeprägt (Abb. 1 links). Im Vergleich zwischen den unterschiedlichen Regionen in der transplantierten und der nativen Lunge waren diese Unterschiede noch deutlicher. Besonders in der apikalen Region der transplantierten und der nativen Lunge ergaben sich hochsignifikante Unterschiede ( $p < 0,0001$ ) nach Transplantation (Abb. rechts).

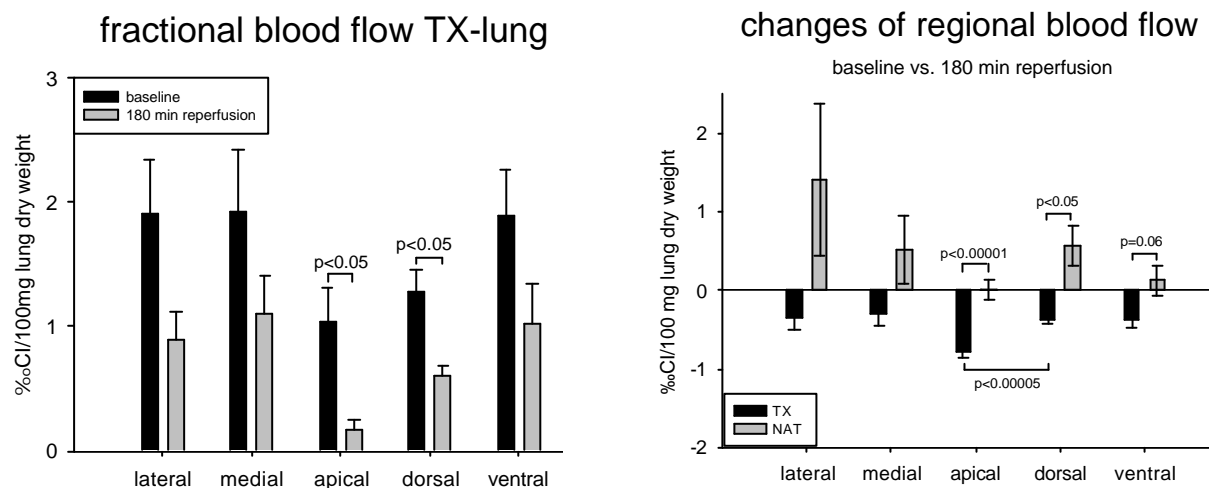


Abb. 1a und b: **Fraktion des pulmonalen Blutflusses** (1a, links) in den einzelnen Regionen der transplantierten Lunge bevor (Baseline) und nach Reperfusion (180 min). In der rechten Abbildung (1b) wurde die Änderung der Perfusion in der transplantierten (TX) und der nativen Lunge (NAT) vor und nach der Transplantation dargestellt. Die Säulen repräsentieren die Differenz der Perfusion in den einzelnen Lungenregionen (n=6). Die graphische Darstellung erfolgte als MW±SEM.

## Regionaler pulmonalvaskulärer Widerstand in der transplantierten und der nativen Lunge

Parallel zur Verminderung der Perfusion ließ sich eine Erhöhung des pulmonalvaskulären Widerstandes in der transplantierten Lunge verzeichnen (Abb.2). Signifikante Anstiege fanden sich in der apikalen, der dorsalen und der ventralen Region. In der nativen Lunge blieb der pulmonalvaskuläre Widerstand nahezu konstant. Ebenfalls der Gesamtwiderstand beider Lungen, der mit Hilfe des Swan Ganz Katheters ermittelt wurde war unverändert (rechte Bildseite).

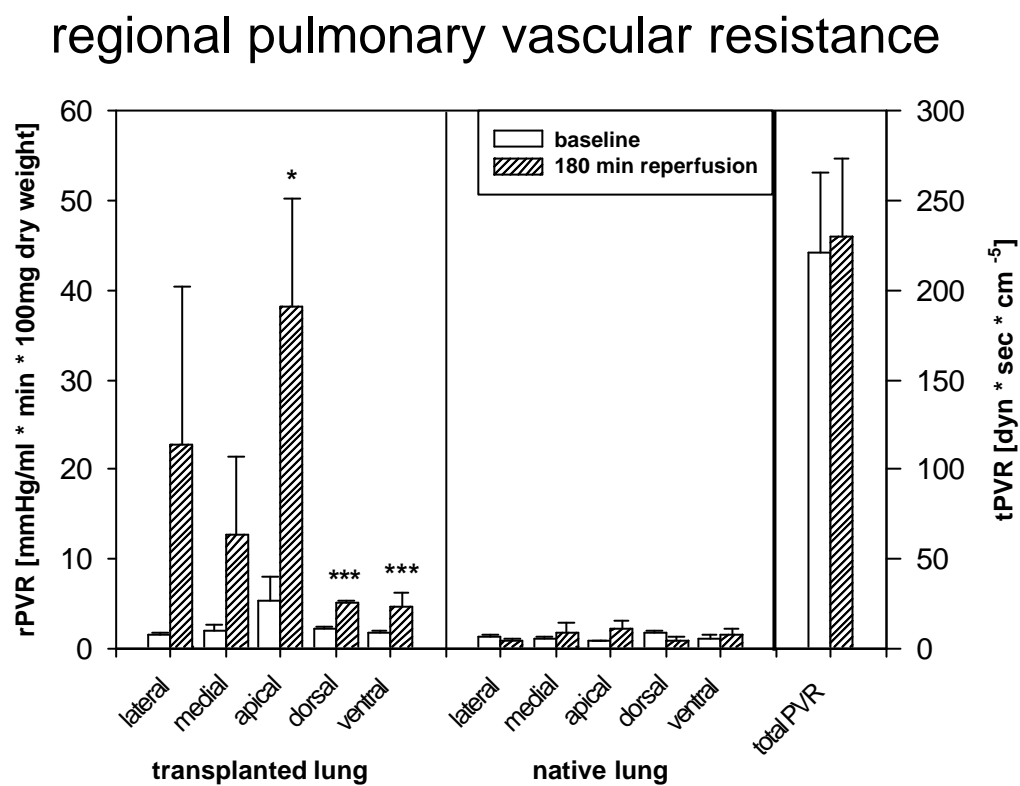


Abb. 2 **Regionaler pulmonalvaskulärer Widerstandsindex (PVRI).**

Auf der linken Seite: Widerstandsveränderungen vor und nach Reperfusion im transplantierten Organ. Bildmitte: PVRI vor und nach Tx in der nativen Lunge. Diese Daten wurden als Quotient aus transpulmonalem Gradienten und fraktionierte Blutfluss errechnet. Rechts: Mit der Thermodilutionsmethode ermittelter Gesamtwiderstand beider Lungen. Die Daten wurden als  $MW \pm SEM$  dargestellt. Statistische Signifikanz: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

## Ödementwicklung

In der transplantierten Lunge ( $5,9 \pm 0,7$  auf  $10,9 \pm 2,5$ ) aber auch im nativen Organ ( $4,9 \pm 0,7$  auf  $8,2 \pm 2,5$ ) kam es nach Reperfusion zu einem massiven Anstieg des Verhältnisses zwischen Feucht- und Trockengewicht (wet/dry-ratio; Abb.3). Während der Anstieg nach Transplantation im Vergleich zu den Ausgangswerten („baseline“ für die native und „preserved“ für die transplantierte Lunge) signifikant war, ergab sich nach Transplantation zwischen der transplantierten und der nativen Lunge kein signifikanter Unterschied. Auch die Konservierung mit EC-Lösung führte im Vergleich zum Ausgangswert (baseline) zu keinem signifikanten Anstieg des wet/dry-ratio. Die Verteilung der extravasalen Flüssigkeit in der Lunge differierte nicht wesentlich in den verschiedenen Regionen.

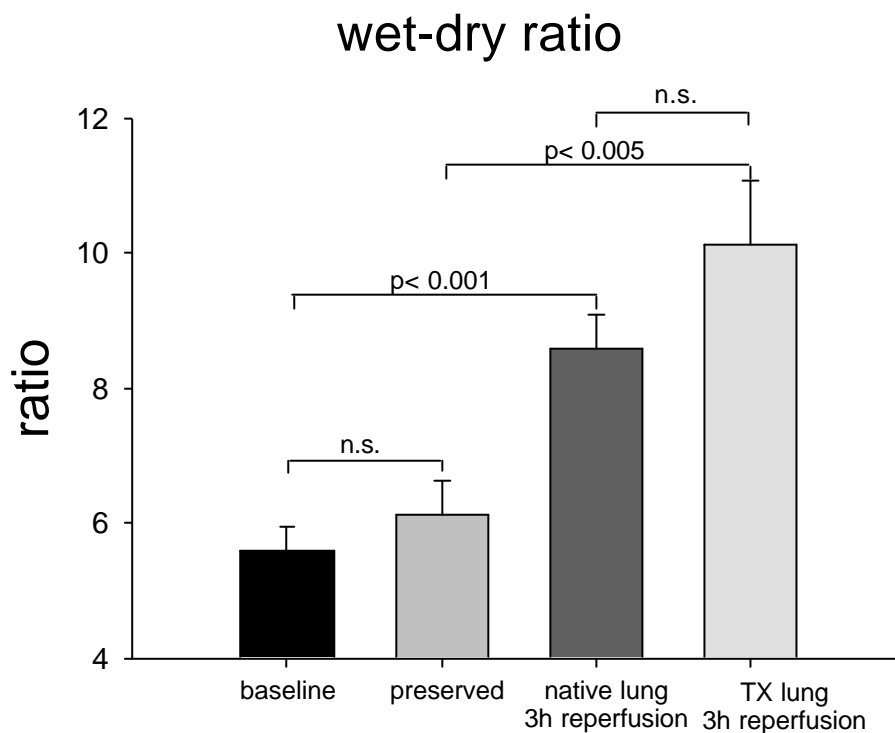


Abb. 3: **Wet/dry ratio.** Baseline (entnommene Empfängerlung), preserved (rechtes Spenderorgan, konserviert aber nicht transplantiert, native lung (rechte Empfängerlung nach 180 min Reperfusion) und TX lung (transplantiertes Organ nach 180 min Reperfusion). Die Daten sind als  $MW \pm SEM$ , dargestellt.

### **3.3 BRONCHOSKOPISCHE INSTILLATION VON SURFACTANT NACH EXPERIMENTELLER LUNGENTRANSPLANTATION**

#### **3.3.1 EINLEITUNG**

Der Ischämie/Reperfusionsschaden der Lunge nach Lungentransplantation ist durch Hypoxämie, Anstieg der pulmonalen Compliance, Anstieg des extravasalen Lungenwassers und Erhöhung des pulmonal-vaskulären Widerstandes gekennzeichnet. Hervorgerufen wird dies durch eine inflammatorische Reaktion mit Einwanderung von Entzündungszellen in das Lungeninterstitium und letztendlich in das alveoläre Kompartiment. Zudem werden pro-inflammatorische Zytokine wie TNF-alpha, IL-6 und IL-8 freigesetzt. Bei der Auslösung wie bei der Aufrechterhaltung der inflammatorischen Reaktion nimmt die Freisetzung von Sauerstoff-Radikalen eine zentrale Rolle ein. Aufgrund der Permeabilitätsstörung kommt es zu einem konsekutiven Einstrom proteinhaltiger Flüssigkeit in das alveoläre Kompartiment. Die surfactant-inhibierende Wirkung von Plasmaproteinen führt im weiteren zur Atelektasenbildung und damit zu Hypoxämie, zur Erhöhung der pulmonalen Compliance und wegen der notwendigen, hohen Beatmungsdrücken zu einer Erhöhung des pulmonalvaskulären Widerstandes. Dies kann eine Rechtsherzbelastung bis hin zu einem Rechtsherzversagen zur Folge haben. Die klinische Symptomatik des Ischämie/Reperfusionsschadens sowie der pathophysiologische Hintergrund lassen Parallelen zum ARDS erkennen. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass der klinische Verlauf des ARDS durch Instillation von Surfactant günstig beeinflusst werden konnte. Entsprechend des beschriebenen Versuchsprotokolls (Seite 36 ff.) wurden insgesamt 12 Transplantationen am Foxhoundmodell durchgeführt. In 2 Versuchsgruppen, einer Kontrollgruppe (C=6) sowie einer Therapiegruppe (S=6), wurde die Wirkung der bronchoskopischen Surfactantapplikation auf den postoperativen Reperfusionsschaden untersucht.

#### **Bronchoalveoläre Lavage**

Nach 6h Reperfusion wurde eine bronchoskopische Lavage zur Gewinnung von bronchoalveolärer Flüssigkeit durchgeführt. Dazu wurde in „wedge-position“ eines Oberlappensegmentbronchus mit 10 mal 20 ml NaCl-Lösung gespült. Etwa 60% der Spüllösung konnte als Probe wieder aufgefangen werden. Für die Lavage der Gesamtlunge wurde der Unterlappen insgesamt mit 500 ml bei einem passiven Druckgradienten von 40 mmHg gespült. Die Lavageflüssigkeit wurde dann über eine sterile Kompresse gefiltert, auf Eis gelagert und bei 200g (4°C, 20min) zentrifugiert um die zellulären Bestandteile zu bestimmen. Färbung und

Differenzierung erfolgte nach Papenheim (2 min Gruenwald- danach 10 min Giemsa-Lösung). Aus dem zellfreien Überstand wurden Proben zur Bestimmung des Proteingehaltes und der Surfactantmessungen gewonnen.

Aus den umfangreichen Untersuchungen des Surfactantsystems, die in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Andreas Günther, Klinik für Innere Medizin, JLU Giessen durchgeführt wurden, sollen hier nur wenige Aspekte herausgegriffen werden. Die Methoden zur Bestimmung der u.a. Parameter wurden in der Publikation „Surfactant abnormalities after single lung transplantation in dogs – impact of bronchoscopic surfactant administration“ ausführlich beschrieben (134).

#### 1. Phospholipid/Protein-Ratio (PPQ)

Durch den Einstrom von Proteinen in das alveoläre Kompartiment nach Reperfusion der Lunge kommt es zum Abfall des Phospholipid/Protein- Ratio im alveolären Raum. Die biophysikalische Wirksamkeit des Surfactant hängt wesentlich von diesem Quotient ab, da Plasmaproteine die Fähigkeit des Surfactant zur Senkung der Oberflächenspannung inhibieren.

#### 2. Anteil der large Surfactant aggregates (LSA)

Die LSA sind die biophysikalisch wirksame multilamelläre Einheit, die aus den Alveolarzellen exprimiert wird. Während die LSA an den gesamten Phospholipiden den weitaus größten Anteil haben, fällt es bei Erkrankungen wie ARDS und idiopathischer Fibrose zum Abfall dieses Anteils. Ein wesentliches Absinken des Anteils an LSA geht mit einer verminderten Aktivität der Surfactantkomposition einher.

#### 3. Veränderung der alveolären Oberflächenspannung

Mit dem Bubble-Surfactometer kann die biophysikalische Fähigkeit von BALF-Proben zur Senkung der Oberflächenspannung direkt gemessen werden. Somit ist ein Einblick in die Spannungsverhältnisse des alveolären Kompartimentes in der Lunge möglich. Lässt sich direkt aus BALF-Proben eine Aussage über die biophysikalischen Fähigkeiten zur Senkung der Oberflächenspannung.

### **3.3.2 ERGEBNISSE**

Im Transplantat verdoppelte sich die wet/dry-ratio, während der Anstieg in der nativen Lunge nach 12 Std. auf den 1.7-fachen Ausgangswert anstieg (Abb. 1). Durch die Thermo-dye Methode ist eine Beobachtung der Dynamik der Wasserzunahme im Lungeninterstitium und im Alveolarraum möglich. Es lässt sich beobachten dass sich das Lungenödem nach ca. 6h entwickelt

und danach nur noch gering zunimmt. Ein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Surfactantgruppe besteht in keiner der untersuchten Lungen.

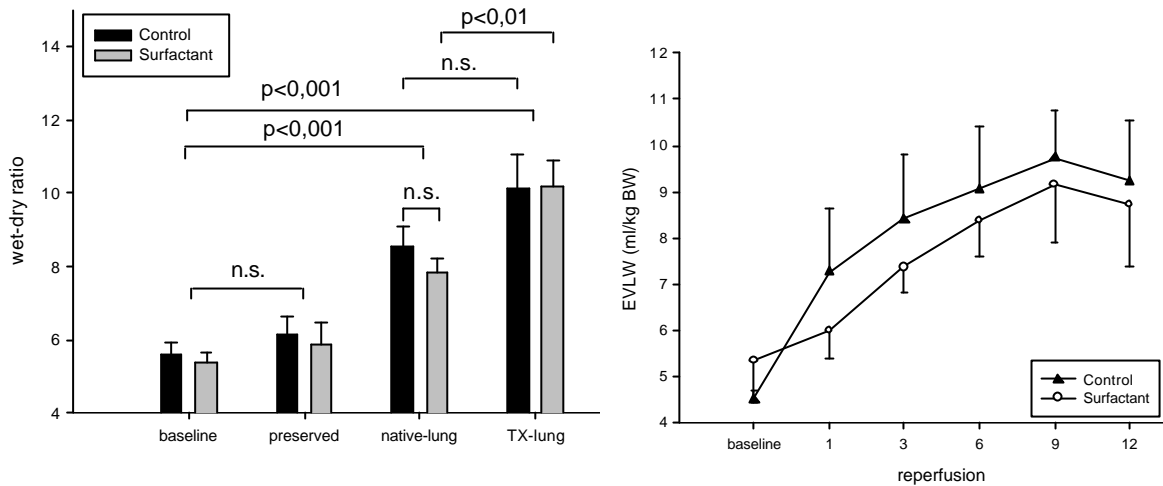


Abb. 4a und b: Effekt der Surfactantgabe auf die **Wet/dry-ratio** nach Transplantation und 12 Std. Reperfusion (4a, links). Wet/dry-ratio der unbehandelten linken Empfängerlung (Baseline), die nicht transplantierte rechte Spenderlung (preserved), die rechte native Empfängerlung (native) und das Transplantat (TX-lung). **Extravaskuläres Lungenwasser** (4b, rechts) während der Reperfusionphase. Als Baseline wurde hier der Meßzeitpunkt vor Beginn des operativen Eingriffs bezeichnet. Signifikanz entsprechend den Angaben in den Abbildungen.

Die bronchoskopische Gabe einer bovinem Surfactantkomposition in das Lungentransplantat vor Entnahme des Organs und unmittelbar nach Reperfusion führte zu einer drastischen Verbesserung des Gasaustausches und der Compliance der transplantierten Lunge. Die Werte für die Compliance der transplantierten Seite waren auch 12h nach Reperfusion nicht niedriger als nach der 1. Stunde Reperfusion während es in der Kontrollgruppe einen stetigen Abfall der pulmonalen Compliance über den gesamten Verlauf der Reperfusion gab. Am Ende der Beobachtungszeit betrug die Compliance der transplantierten Lunge  $18,8 \pm 1,8$  ,bar/ml und auf der nativen Seite  $23 \pm 0,5$  mbar/ml. Auch der mittlere Beatmungsdruck und der Spitzendruck war entsprechend der pulmonalen Compliance in der Surfactant-Gruppe nur geringgradig erhöht während in der Kontrollgruppe signifikante Anstiege dieser Werte zu verzeichnen waren. Durch Surfactantapplikation war, im Vergleich zur Kontrollgruppe, eine signifikante Verbesserung des Gasaustausches möglich. Zu Beginn der Reperfusion betrug im Transplantat der  $pO_2/FiO_2$   $311 \pm 8$  mmHg und nach 12h Beobachtungszeit  $200 \pm 20$  mm Hg. Zwischen Stunde 6 und Stunde 12 post perfusionem war der Unterschied in der Oxygenierung signifikant.

Während der Nachbeobachtungszeit kam es zu deutlichen Veränderungen der Gasaustauschfunktion ( $pO_2/FiO_2$  bei einem unveränderten  $FiO_2$  von 0,5) und der mechanischen Eigenschaften der transplantierten Lunge. In der nativen Lunge waren trotz der messbaren Affektionen (Anstieg alv. Prot., wet/dry-ratio) keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zum Versuchsbeginn zu verzeichnen. Bei Versuchsbeginn betrug die pulmonalvenöse Sauerstoffspannung der transplantierten Lunge  $629 \pm 11,9$  mm Hg, nach Beginn der Reperfusion  $253,5 \pm 15,1$  mmHg, um am Ende des Versuches auf  $119,8 \pm 21,7$  mmHg abzufallen. Gleichzeitig kam es zum Abfall der pulmonalen Compliance, was wiederum Anstiege des mittleren und Spitzenbeatmungsdruckes nach sich zogen. Die Compliance des transplantierten Organs betrug nach 1 Std. Reperfusion  $19,5 \pm 1,6$  mbar/ml und war damit bereits zu diesem Zeitpunkt gegenüber dem Ausgangswert von  $40,2 \pm 5,8$  mbar/ml deutlich eingeschränkt. Bis zum Versuchsende sank die Compliance der transplantierten Lunge in der Kontrollgruppe auf  $11,6 \pm 1,6$  mbar/ml. Im Vergleich dazu war die Compliance der nativen Lunge nach 12h Reperfusion weniger eingeschränkt 27 mbar/ml.

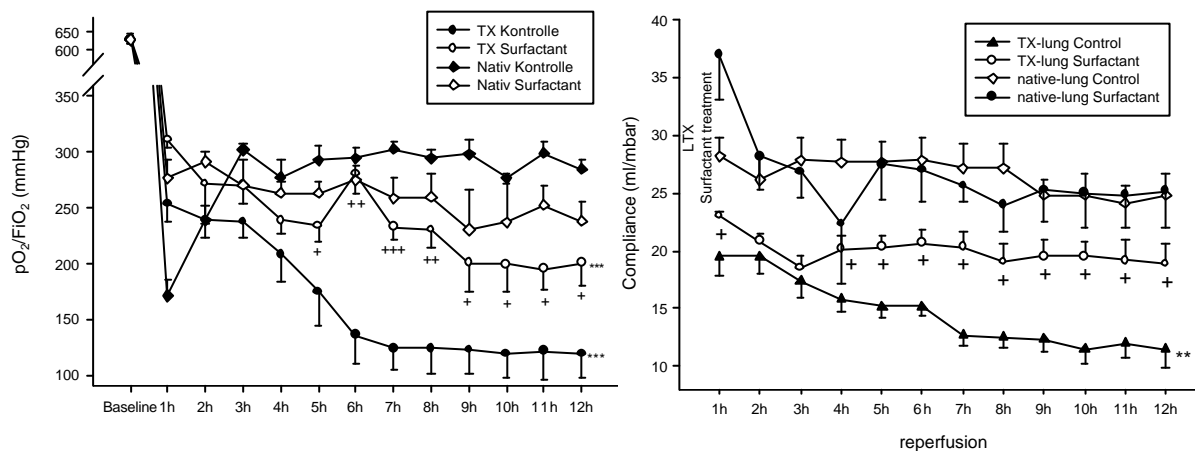


Abb. 5a und b:  $pO_2/FiO_2$  -Werte ( 5a, links) aus pulmonalvenösen Proben aus dem Transplantat (TX-lung) und der rechten Empfängerlunge (nativ). Die Daten entstammen der Kontroll- bzw. den surfactantbehandelten Tieren und wurden als MW  $\pm$  SEM für jeweils 6 Versuchstiere angegeben. Die quasi-statische Compliance ( 5b, rechts) wurde seitengetrengt für die transplantierte (TX-lung) und die rechte Lunge (native-lung) gemessen ( MW  $\pm$  SEM von jeweils 6 Versuchen). Das Signifikanzniveau ist wie folgt bezeichnet: + ( $p < 0.05$ ), ++ ( $p < 0.01$ ) oder +++ ( $p < 0.001$ ) bei Vergleich zwischen Kontroll- und Surfactantgruppe und \*\*\* ( $p < 0.001$ ) bei Vergleich zwischen 1h und 12h Wert.

Alle 6 Organempfänger der Kontrollgruppe waren im gesamten postoperativen Verlauf ohne Katecholamingaben hämodynamisch stabil. Wie in Tabelle 2 dargestellt, traten keine wesentlichen Änderungen des CI, des ZVD oder des PCWP ein. Trotz der nur geringen Steigerung des PAP konnte mit Hilfe der Bestimmung des transpulmonalen Gradienten (TPG) eine Konstriktion der pulmonalen Gefäßstrecke erkannt werden.

	Baseline	5min	1h	3h	6h	9h	12h
CI Con. (l/min)	2,2 ± 0,1	3,3 ± 0,3	3,6 ± 0,4	2,9 ± 0,0	2,9 ± 0,1	2,9 ± 0,3	3,1 ± 0,2
CI Surf. (l/min)	2,3 ± 0,1	2,8 ± 0,3	2,7 ± 0,2	3,0 ± 0,2	2,9 ± 0,1	2,8 ± 0,3	3,5 ± 0,4
CVP Con.(mmHg)	6 ± 0,7	7 ± 0,8	5 ± 1,0	4 ± 0,4	4 ± 0,3	7 ± 0,4	7 ± 0,7
CVP Surf. (mmHg)	6 ± 1,1	6 ± 1,1	6 ± 1,4	6 ± 1,2	6 ± 1,7	7 ± 0,6	7 ± 0,9
PCWP Con. (mmHg)	7 ± 0,8	6 ± 0,5	7 ± 1,1	6 ± 0,6	4 ± 1,0	7 ± 0,5	8 ± 0,2
PCWP Surf. (mmHg)	8 ± 0,8	7 ± 1,1	7 ± 1,0	5 ± 1,0	5 ± 0,9	8 ± 0,6	7 ± 0,9
PAP Con. (mmHg)	15 ± 1,3	15 ± 1,6	13 ± 1,3	15 ± 0,7	15 ± 1,7	17 ± 1,1	19 ± 1,4
PAP Surf. (mmHg)	16 ± 2,1	15 ± 1,2	15 ± 2,5	17 ± 0,7	18 ± 1,5	20 ± 1,0	22 ± 1,6

Tab. 2: Bezüglich der hämodynamischen Daten findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen Surfactant Behandlung und Kontrollgruppe.

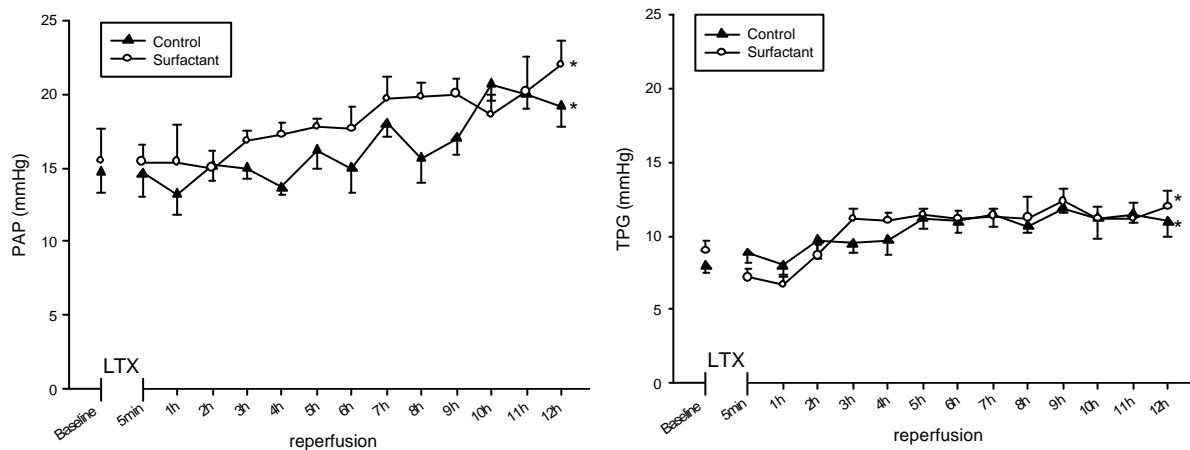


Abb. 6a und b: Der systolische **pulmonalarterielle Druck** (PAP, 6a, links) steigt stetig während der Nachbeobachtung an und erreicht bei Versuchsende Signifikanzniveau im Vergleich zum Ausgangswert. Entsprechend kommt es zum Anstieg des **transpulmonalen Gradienten** (TPG, 6b, rechts). (\*p<0,05 Baseline vs. 12 Std.) Ein Unterschied zwischen Surfactant- und Kontrollgruppe besteht nicht.



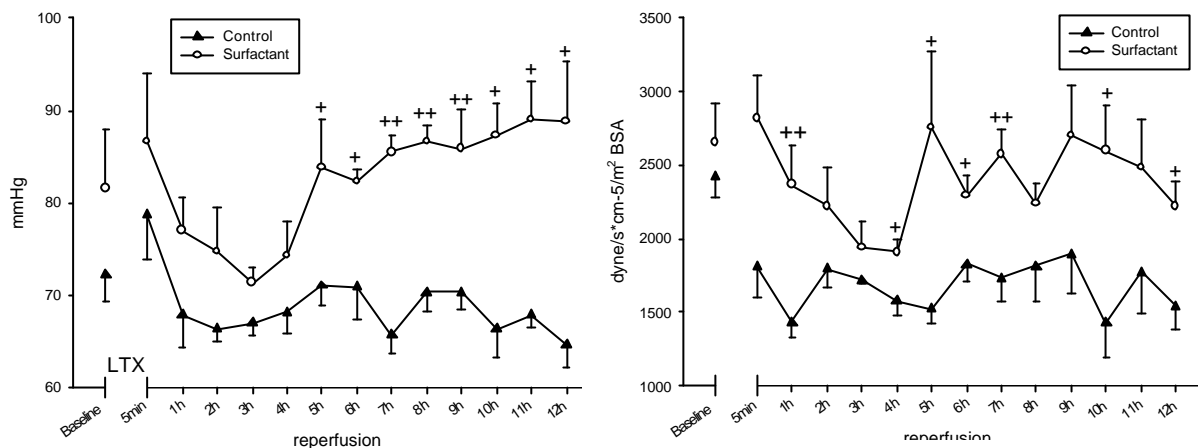


Abb. 7 a und b: Der **mittlere Druck** (Abb. 7a, MAP links) bleibt in der Surfactantgruppe stabil während es in der Kontrollgruppe zu einem deutlichen Abfall des Mitteldruckes kommt. Auch der **systemische Widerstands Index** (SVRI, Abb. 7b, rechts) ist in der Surfactantgruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe. (+ $p < 0,05$ ; ++ $p < 0,01$  im Vergleich zwischen Kontroll- und Surfactantgruppe).

### 3.4 BAL-ANALYTIK

Durch die Lagerung der Lungen in 4°C kalter EC-Lösung für 24 h sind bei diesen Lungen keine Veränderungen bezüglich des alveolären Proteingehaltes, der Anzahl von PMN im Alveolarraum oder der wet/dry-ratio eingetreten. Im Gegensatz dazu war der alveoläre Proteingehalt wie auch die PMN und das Lungengewicht bereits nach 6h Reperfusion signifikant angestiegen. Diese Parameter waren nicht nur in der transplantierten und reperfundierten sondern auch, allerdings in einem geringeren Maße in der nativen Empfängerlunge angestiegen. Der prozentuale Anteil an Neutrophilen in der BALF stieg von <5% in der entnommenen linken Empfängerlunge (Kontrollwert) auf 82% in der reperfundierten und auf 30% in der nativen Empfängerlunge nach 12 h Beobachtungszeit. Der intraalveoläre Proteingehalt stieg im Transplantat auf den ungefähr zehnfachen Wert und in der nativen Empfängerlunge auf den doppelten Wert im Vergleich zur Kontrolle (Tab. 3).

			Baseline	post ischemia	6 h	12 h
BALF Protein [µg/ml]	Standard Treatment	graft		476.9 ± 59.4	1443.6 ± 720.20 *	1895.6 ± 187.1 ***
		native lung	240.5 ± 34.9		153.8 ± 32.7	501.9 ± 167.7
	Surfactant treatment	graft		393.7 ± 97.8	844.0 ± 269.0	1637.0 ± 253.0 ***
		native lung	290.0 ± 68.7		188.5 ± 32.3	447.4 ± 123.1
PMN in BALF [%]	Standard treatment	graft		1.8 ± 0.6	25.5 ± 14.6	82.0 ± 7.3 ***
		native lung	1.8 ± 0.7		28.8 ± 4.3 ***	30.0 ± 6.7 **
	Surfactant treatment	graft		6.3 ± 3.2	36.0 ± 15.1 p=0.08	84.0 ± 6.4 ***
		native lung	2.0 ± 0.8		13.3 ± 14.4	23.0 ± 13.8

Tab. 3 Oben: Proteingehalt der bronchoalveolären Lavage (BALF). Unten: Anteil der PMN an allen Zellen der BALF. Angegeben werden MW ± SEM der BALF Proteinkonzentration (µg/ml) und der prozentuale PMN-Anteil an den BALF-Zellen (angegeben als % Anteil aller BALF-Zellen). Die Ausgangswerte stammen aus der linken Empfängerlung. Der Konservierungsschaden wurde aus der rechten Spenderlung, die konserviert aber nicht transplantiert wurde entnommen. Das implantierte Spenderorgan wird als graft und die unangetastete rechte Empfängerlung als „native“ bezeichnet. Signifikanzniveau wurde wie folgt definiert.: \* - p < 0.05; \*\* - p < 0.01 oder \*\*\* - p < 0.001.

Durch die Konservierung des Organs mit kalter EC-Lösung sind die von uns gemessenen Parameter unbeeinflusst geblieben. Nach 6h und 12 h Reperfusion bestanden in der Kontrollgruppe weitreichende, signifikante Veränderungen bezüglich verschiedenster Parameter der biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften des Surfactant Systems. Die LSA, mit einem präoperativen Anteil von 90 ± 9%, fielen nach 6h auf einen Wert von 27,9 ± 9% und erholten sich nach 12h auf 65,8 ± 13,1% (Tab. 4).

			Base line	0 = post ischemia	6h post reperfusion	12 post reperfusion
Phospholipid ( $\mu\text{g/ml}$ )	Standard treatment	graft native lung	158.2 $\pm$ 20.3	264 $\pm$ 33.6	71.9 $\pm$ 23.5 52.2 $\pm$ 10.9	146.7 $\pm$ 12.8 137.9 $\pm$ 42.2
	<i>Surfactant treatment</i>	<i>graft native lung</i>	<i>156.4<math>\pm</math>30.0</i>	<i>211.3<math>\pm</math>51.4</i>	<i>501.3<math>\pm</math>63.9 447.7<math>\pm</math>146.7</i>	<i>857.5<math>\pm</math>202.6 539.6<math>\pm</math>69.1</i>
Phospholipid- prot.-quotient	Standard treatment	graft native lung	0.70 $\pm$ 0.07	0.58 $\pm$ 0.05	0.11 $\pm$ 0.02 0.39 $\pm$ 0.08	0.22 $\pm$ 0.15 0.28 $\pm$ 0.07
	<i>Surfactant treatment</i>	<i>graft native lung</i>	<i>0.64<math>\pm</math>0.15</i>	<i>0.57<math>\pm</math>0.09</i>	<i>0.97<math>\pm</math>0.37 2.09<math>\pm</math>0.54</i>	<i>0.56<math>\pm</math>0.11 1.50<math>\pm</math>0.26</i>
LSA (in % of total PL)	Standard treatment	graft native lung	90.6 $\pm$ 8.9	99.0 $\pm$ 5.8	29.7 $\pm$ 9.0 70.1 $\pm$ 4.4	65.8 $\pm$ 13.1 92.5 $\pm$ 24.4
	<i>Surfactant treatment</i>	<i>graft native lung</i>	<i>85.7<math>\pm</math>5.5</i>	<i>70.7<math>\pm</math>8.8</i>	<i>86.3<math>\pm</math>9.6 90.8<math>\pm</math>7.5</i>	<i>97.7<math>\pm</math>13.1 89.0<math>\pm</math>6.7</i>

Tab. 4: Phospholipide (PL), Phospholipid/Proteinquotient (PPQ) und large surfactant aggregates (LSA) zu den verschiedenen Messzeitpunkten.

Im Transplantat fiel der PPQ durch den massiven Einstrom von Plasmaproteinen in das alveoläre Kompartiment auf ein siebtel seines Ausgangswertes. Aufgrund der schwerwiegenden Veränderungen in der Surfactantzusammensetzung (siehe Companion paper) war eine starke Einschränkung der biophysikalischen Funktion der BALF zu erwarten. So stieg die minimale Oberflächenspannung in der BALF auf der transplantierten Seite von einem Ausgangswert von  $\sim 2$  Nm/m auf  $\sim 15$  mN/m nach 6h auf einen Wert von 17 mN/m nach 12h an. Darüber hinaus war auch hier ein deutlicher protein-inhibitorischer Effekt nachweisbar; nach Rekonstitution der LSA mit den Proteinen derselben BAL und im selben Verhältnis, wie für die originale Lavage gemessen, konnte im Transplantat ein weiterer Anstieg der  $\gamma_{\text{min}}$  auf  $\sim 22$  mN/m nach 6h und auf  $\sim 27$  mN/m nach 12h beobachtet werden.

Es ergibt sich ein direkter Zusammenhang zwischen Gasaustausch und Oberflächenspannung in der BALF. Bei stark erniedrigter Oberflächenspannung kommt es konsekutiv zu einer Abnahme der Oxygenierung aus der betreffenden Lunge.

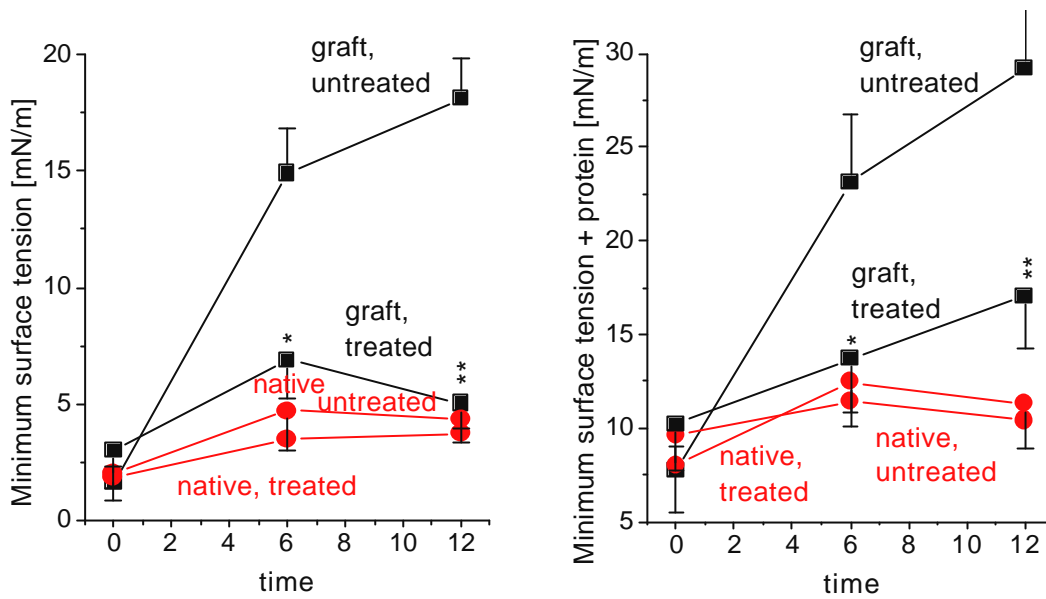


Abb. 8a und b: Minimale Oberflächenspannung der BALF bei Surfactantapplikation und ohne Therapie. Ohne den Einfluss der Plasmaproteine aus der BALF (links) nach Zufügen der Plasmaproteine aus der BALF (rechts)

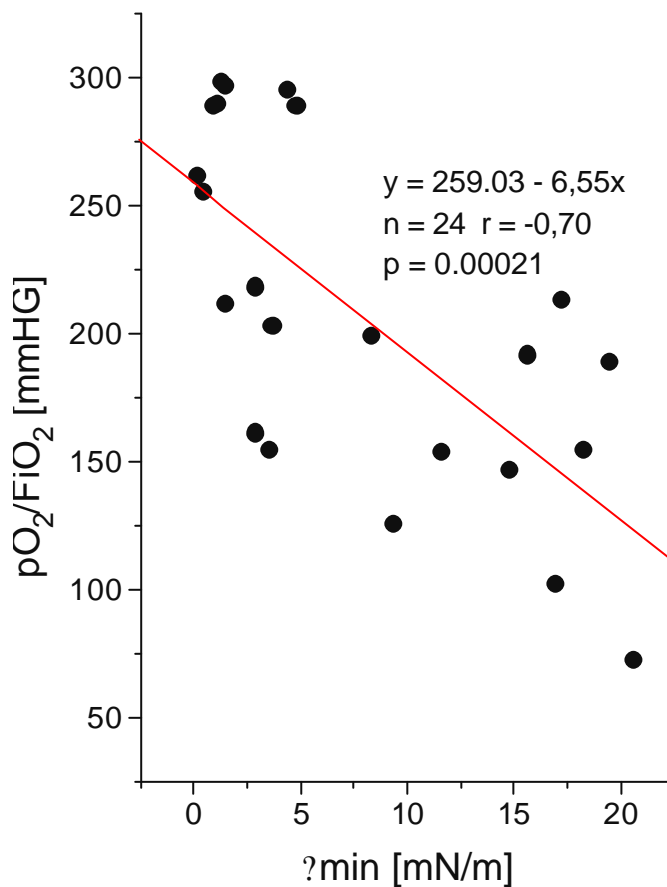


Abb. 9: Gasaustausch in Abhängigkeit zur Oberflächenspannung in der BALF. Die Punkte repräsentieren einen Messpunkt der Oberflächenspannung dem der aktuelle pO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>-Wert zugeordnet wurden.

## **3.5 ISCHEMIC PRECONDITIONING**

### **3.5.1 EINLEITUNG**

Ischemic preconditioning (IPC) ist als protektive Maßnahme zum Schutz vor Ischämie und Reperfusion für verschiedene Organe beschrieben worden. Während die Untersuchungen an Herz, Leber Niere und Hirn deutlich protektive Effekte zeigten, gibt es zum derzeitigen Zeitpunkt nur wenige Publikationen zum Ischemic preconditioning der Lunge. Da eine große Variabilität bezüglich der Effektivität des IPC besteht, die Spezies und Organabhängig ist, orientierten wir das erste IPC-Protokoll an den vorhandenen Studien, die 5min transienter Ischämie (TI) 10min Reperfusion (REP) Du et al.(104), 10 min IPC und 15 min Rep. Li et al.(135, 136), durchgeführt hatten. Du et al. beschrieben erstmals den protektiven Effekt von 5 min IPC auf die Lunge in einem orthotopen Transplantationsmodell an der Ratte. Er untersuchte den Effekt von 5 minütiger transienter Ischämie, nachfolgenden 10 minütiger Reperfusionsphase und Perfusion mit UW-Lösung. Nach 6 bzw. 12 h kalter Ischämie wurden die Lungen transplantiert. In der IPC-Gruppe war die Lungenfunktion nach 12 Std. Ischämiezeit signifikant besser als in der Kontrollgruppe.

Am Herzen ist die Effektivität repetitiver Ischämien umstritten. Während Sandhu et al. (137) eine verbesserte Protektion des Myokard bei bis zu drei repetitiven Zyklen von IPC und REP nachweisen konnte scheint eine größere Anzahl (6-12) repetitiver Zyklen eine Toleranz verursachen (138). Auch dazu lagen für die Lunge keine Daten vor. Die vorhandenen Untersuchungen sind entweder Transplantationsmodelle Du et al. , Li et al. oder ex vivo Perfusionsmodelle Gasparri et al. , Soncul et al., Featherstone et al. (139-141). Die vorliegende Studien mit 1. 2-maliger 10 minütiger TI und REP und 2. 5min TI und 15 min REP am Ganztiermodell mit 3std warmer Ischämie untersucht erstmals gleichzeitig den Einfluss von IPC auf verschiedene pulmonale und hämodynamische Parameter sowie auf die Expression pro-inflammatorischer Zytokine.

#### **IPC Protokoll**

Eine ischämische Präkonditionierung der Lungen wurde mit 2 unterschiedlichen Protokollen durchgeführt. In der ersten Gruppe (IPC-5; n=6) wurde eine TI von 5 min und eine nachfolgende Reperfusion von 15 min und in der zweiten Versuchsgruppe (IPC-10; n=6) eine TI von 10 min und eine REP von 10 min und einer erneuten Wiederholung dieses IPC-Zyklus einer 3 Std. warmen Ischämie vorangestellt. In der Kontrollgruppe (C; n=6) wurde kein IPC durchgeführt.

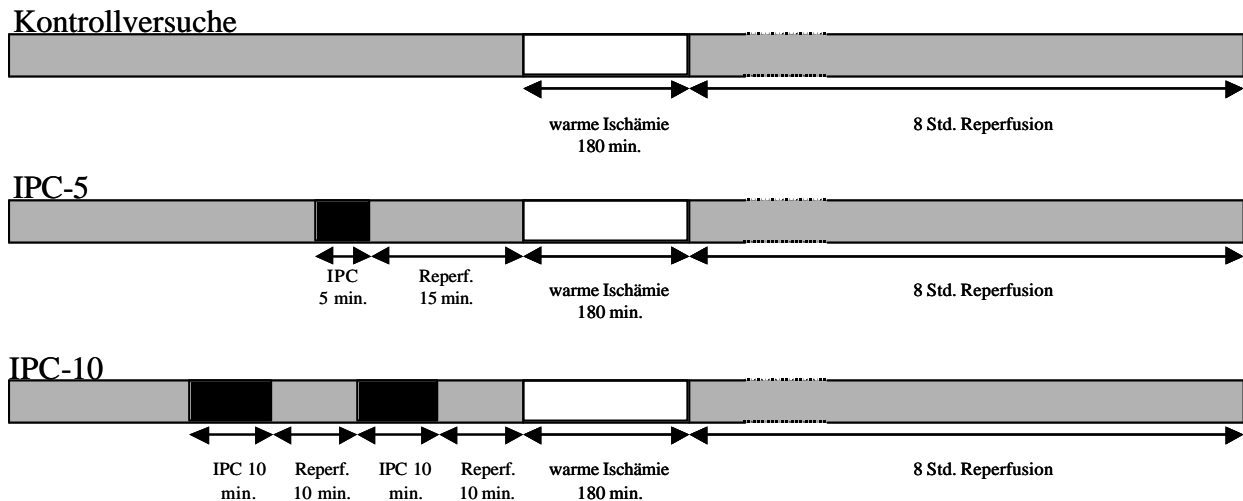


Abb. 10: Zeitverläufe des IPC Protokolls

Alle chirurgischen Eingriffe wurden steril von einem Herz-Thoraxchirurgen durchgeführt. Die Versuchstiere waren über den gesamten Beobachtungszeitraum hämodynamisch stabil und benötigten weder Katecholamine noch Bluttransfusionen. Das Protokoll sah Volumensubstitution bei einem ZVD < 8 mmHg und einem Mitteldruck (MAP) < 60 mmHg vor. Die Versuchstiere wurden abwechselnd in die IPC-5, IPC-10 und in die Kontrollgruppe (C) eingeteilt.

### Chirurgischer Eingriff

Die Anästhesieeinleitung und die Thorakotomie entsprachen dem in der Surfactantuntersuchung bereits beschriebenen Vorgehen. Nach Thorakotomie erfolgte die Präparation der rechten und der linken Art. pulmonalis. Um beide Pulmonalisäste sowie um die Aorta asc. wurde ein Flowdetektor (Transsonic Inc. Ithaca, New York) angelegt. Druckmesskatheter (Millar) wurden in die Art. pulmonalis comm. sowie in den linken Vorhof und Katheter in die V. pulmonalis des rechten und linken Unterlappens eingelegt. Die Tracheotomie erfolgte wie bereits beschrieben. Neben einem Swan Ganz Katheter wurde noch ein arterieller Druckmesskatheter gelegt. Nach Messung der Ausgangswerte erfolgte das zeitgleiche Klemmen der Art. pulm. Und des Lungenhilus mit Unterbrechung der bronchialarteriellen Versorgung. Im Falle von IPC wurde diese entsprechend dem Protokoll durchgeführt. Nun folgte eine 3h warme Ischämie. Nach Lösen der Klemmen wurde der Thorax verschlossen das Versuchstier für die 8-stündige Nachbeobachtung aufrecht gelagert. Die seitengetrennte Beatmung erfolgte nach dem bereits in der Surfactantuntersuchung vorgestellten Verfahren.

Das hämodynamische Monitoring sowie die Bestimmung der Blutgase und die broncho-alveoläre Lavage entsprach ebenfalls dem vorhergehenden Versuch.

### **RT-Multiplex PCR**

Die gesamte RNA aus den Lungenproben, BAL-Zellen sowie aus dem Vollblutes wurde nach der Methode von Chomczynski und Saachi extrahiert und mit dem RNAeasy Mini Kit (Quiagen) präpariert. Die cDNA wurde von 100 ng der gesamt-RNA synthetisiert. Diese RNA-Probe wurde mit hexamer-Primer und Superscript II Rnase RT (Life Technologies) bei 42°C 60 min inkubiert. In zwei unterschiedlichen Reaktionen wurde die Expression von Hunde- $\beta$ -actin, IL-6, IL-10, IL-8, IL-1 $\beta$  und TNF-alpha (Set-1) sowie von Hunde- $\beta$ -actin, ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin (Set-2) in leicht modifizierter Form, entsprechend den Vorgaben des „Custom Multiplex PCR Kit For Dogs Cytokine Genes“ (Maxim Biotech) bestimmt. Zusätzlich zur  $\beta$ -actin expression wurde die 18S rRNA Expression als house-keeping-gene (Genbank Acc.#:M10098) mit einer PCR mit folgendem Primer bestimmt: 5'-GTT GGT GGA GCG ATT TGT CTG G-3' (sense) und 5'-AGG GCA GGG ACT TAA TCA ACG C-3' (antisense). Nach Abtrennung der amplifizierten PCR-Produkte wurden sie auf einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die Banden mit einem Computer-basiertem Laser-densitometer (Molecular Dynamics, Sunnydale, CA) quantifiziert. Obwohl die  $\beta$ -actin Bestimmung im MPCR-Paket enthalten war, erwies sich  $\beta$ -actin als Referenz ungeeignet, da die Expression sehr stark differierte. Nur im Falle der Zytokin mRNA Bestimmung aus BAL konnte  $\beta$ -actin verwandt werden. Hier ergaben sich keine Differenzen zur 18S rRNA Expression.

### 3.5.2 ERGEBNISSE DER IPC-VERSUCHE

#### Gasaustausch

In der Kontrollgruppe kam es nach 3 Std. warmer Ischämie und nachfolgender Reperfusion zu einer deutlichen Verschlechterung des Gasaustausches auf der linken reperfundierten Seite (repLL) aber auch zu einem geringeren Ausmaß auf der rechten kontralateralen Lunge (conRL). Die conRL erholte sich innerhalb von 2h nach Reperfusion und der  $pO_2$  erreichte dann wieder den Ausgangswert von 175mmHg, während die repLL nur einen  $pO_2$  von 75 mmHg erreichte. In der IPC-5 Gruppe war der Gasaustausch der repLL nur geringgradig eingeschränkt und lag mit einem  $pO_2$  von 150 mmHg nicht signifikant unter dem Ausgangswert. In der IPC-10 Gruppe verschlechterte sich der Gasaustausch in einem noch stärkeren Ausmaß als in der Kontrollgruppe.

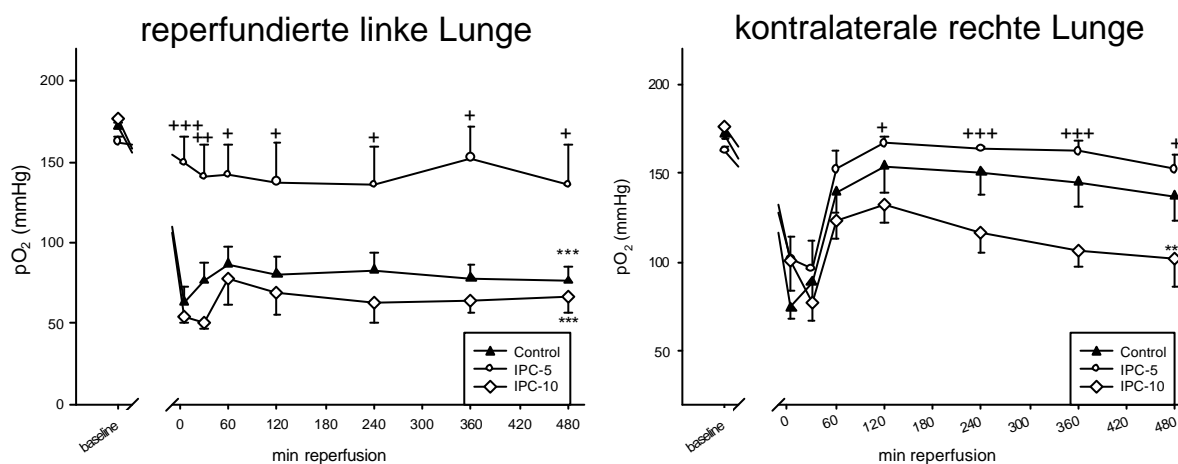


Abb. 11a und b:  **$pO_2$ -Werte** der reperfundierten linken Lunge (11a, repLL, links) und der kontralateralen rechten Lunge (11b, conRL, rechts) vor und nach warmer Ischämie, beatmet mit einem  $FiO_2$  von 0,5. Die Blutproben wurden aus einem Pulmonalvenenkatheter von beiden Lungen getrennt entnommen. Der Baseline-Wert wurde nach Thorakotomie ermittelt. Die Daten werden als MW  $\pm$  SEM von jeweils 6 Versuchen dargestellt. Signifikanzen wurden wie folgt bezeichnet: + ( $p < 0.05$ ), ++ ( $p < 0.01$ ), +++ ( $p < 0.001$ ) im Vergleich zwischen Surfactant und Kontrollgruppe sowie \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ) und \*\*\* ( $p < 0.001$ ) bei Vergleichen zwischen Baseline und 12Std.-Reperfusionen.



## Lungenmechanik

Die dynamische Compliance wurde, wie bereits beschrieben bei seitengetrennter Beatmung gemessen. Der Ausgangswert für die Einzellungenbeatmung liegt etwa bei 35ml/mbar. Nach Ischämie und Reperfusion gab es einen deutlichen Abfall der Compliance der repLL aber auch der conRL. Während es auf der rechten Seite keine Unterschiede zwischen der Kontroll- und den IPC-Versuchen gab, fiel eine deutliche Verbesserung der Compliance auf der repLL in der IPC-5 Gruppe auf. In dieser Gruppe waren die Compliance-Werte zu allen Messzeitpunkten höher als in der Kontroll- oder der IPC-10 Gruppe. Die Compliance-Werte für IPC-10 lagen zwar über denen der Kontrollgruppe allerdings ist dieser Unterschied nicht signifikant.

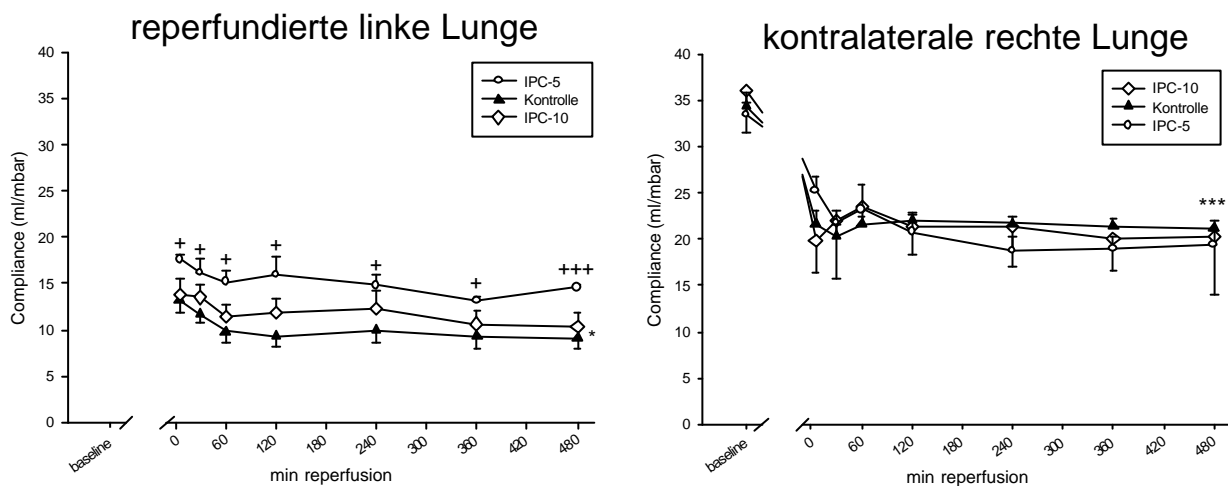


Abb. 12a und b: **Compliance-Werte** der reperfundierten linken Lunge (12a, repLL, links) und der kontralateralen rechten Lunge (12b, conRL, rechts). Die Compliance-Daten wurden von dem Evita II-Monitor (Dräger, Lübeck) ermittelt. Baseline-Werte standen nur für die rechte Lunge zur Verfügung. Die Daten werden als MW ± SEM von jeweils 6 Versuchen dargestellt. Signifikanz wird wie folgt bezeichnet: + ( $p < 0.05$ ), ++ ( $p < 0.01$ ) or +++ ( $p < 0.001$ ) im Vergleich zwischen Surfactant und Kontrollgruppe sowie \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ) und \*\*\* ( $p < 0.001$ ) bei Vergleichen zwischen Baseline und 12h-Reperfusionen.

### Hämodynamische Parameter (PVRI, SVRI)

Die Unterschiede im Ausgangswert resultieren aus den unterschiedlichen Lungenvolumina der rechten und linken Lunge. Während der gesamten Beobachtungszeit kam es zu einem stetigen Anstieg des PVRI in der reperfundierten aber auch in der contralateralen rechten Lunge (conRL). Am Ende der Beobachtungszeit war der PVRI doppelt so hoch wie bei Versuchsbeginn (Baseline). In Bezug auf den PVRI bestand zwischen den Versuchsgruppen IPC-5, IPC-10 und Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied. Der PVRI scheint also durch IPC unbeeinflusst zu sein. Die Herzfrequenz, CI, MAP und ZVD wurden stündlich gemessen. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Ausgangswerten.

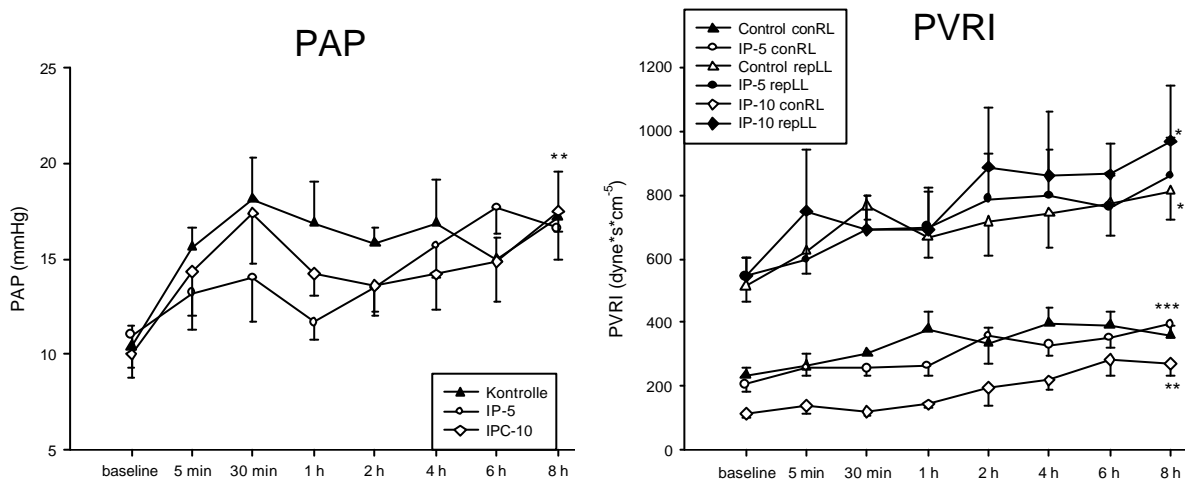


Abb. 13a und b: **Pulmonalarterieller Druck (PAP)** in der Art. pulm. comm. (13a, links). **Pulmonal-vaskulärer Widerstandsindex (PVRI)** der reperfundierten Lungen (13b, rechts). Der PVRI wurde mit der Standardformel errechnet (siehe Methodik). Die Daten werden als MW  $\pm$  SEM von jeweils 6 Versuchen dargestellt. Signifikanz wird wie folgt bezeichnet: \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ) und \*\*\* ( $p < 0.001$ ) bei Vergleichen zwischen Baseline und 12 Std.-Reperfusionen.

### Lungenödem und intraalveolärer Proteingehalt

Als Ausgangsdaten für wet/dry-ratio und intraalveolären Proteingehalt wurden die Werte der vorhergehenden Untersuchung (Surfactant) verwendet, die von den linken unbehandelten Empfängerlungen stammten. Der hierbei gefundene Wert von 5,6 für das Verhältnis von Feucht- zu Trockengewicht in der normalen Hundelunge steht in guter Übereinstimmung zu den Daten aus der Literatur. Nach Reperfusion kam es zu einer Verdreifachung der wet/dry-ratio in der reperfundierten linken Lunge. Die Ödemausbreitung fand sich auch in der nativen Lunge, in der der wet/dry-ratio auf den doppelten Ausgangswert anstieg. Zwischen der Kontroll-, IPC-5 und IPC-10 Gruppe ergab sich bezüglich der Ödemausbildung kein signifikanter Unterschied. Die Ansammlung von Flüssigkeit als Ausdruck der pulmonal-vaskulären Schrankenstörung der reperfundierten Lunge war also von der ischämischen Präkonditionierung unbeeinflusst.

In der Kontroll- und IPC-10 Gruppe fand sich ein massiver Anstieg des intraalveolären Proteingehaltes von Beginn bis zum Ende der Reperfusion. Dieser Proteinanstieg verdreifachte sich in der repLL aber auch in der conRL fand sich eine Verdopplung im Vergleich zum Ausgangswert. Einzig die IPC-5 Gruppe hatte eine signifikant niedrigere Menge an intraalveolärem Protein.

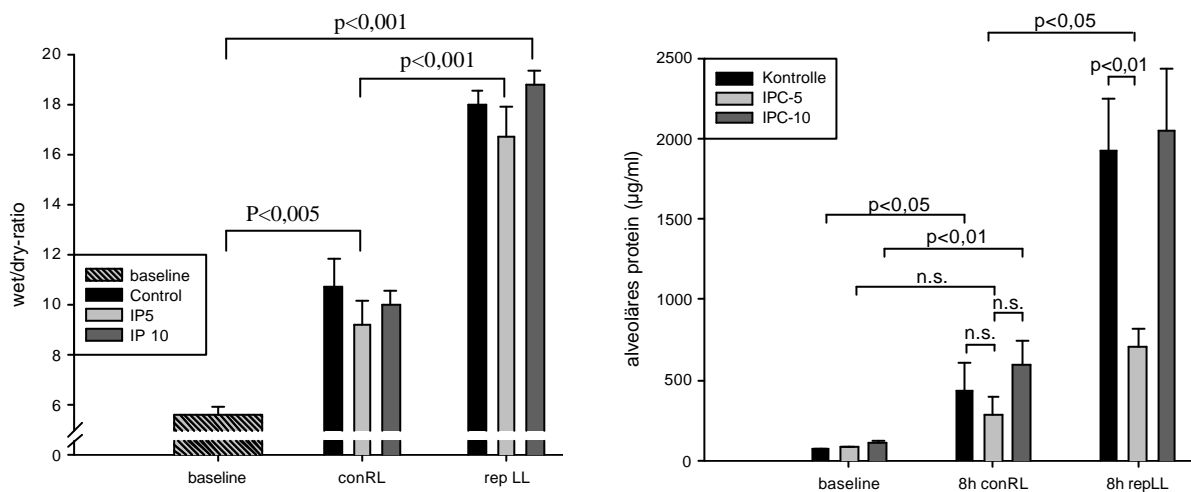


Abb. 14a und b: Der wet/dry-ratio (14a, links) ist von ischemic preconditioning unbeeinflusst. Der intraalveoläre Proteingehalt (14b, rechts), gemessen aus der BALF ist nach 8 Std. Reperfusion in der ET-Gruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe.

### Zytokin-Expression in Lungengewebe und BAL-Zellen

In der Untersuchung mittels semiquantitativen Erfassung der mRNA-Expression für TNF-alpha, IL-6, IL-10, IL-8, E-Selektin, VCAM und ICAM konnte im Lungengewebe kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe, IPC-5 und IPC-10 nachgewiesen werden. In den BAL-Zellen fanden sich Hinweise für eine höhere Expression von TNF-alpha in der

Kontrollgruppe und für IL-10 in der IPC-5 Gruppe. Die Expression von IL-8 erschien in den IPC-Gruppen etwas geringer ohne Signifikanzniveau zu erreichen. Die BAL aus der reperfundierten Lunge zeigen in der Kontrollgruppe eine signifikant höhere Expression an TNF-alpha als in der IPC-5 Gruppe. Auch in der conRL war die Menge an mRNA für TNF-alpha signifikant erhöht. Die IL-8 Expression im Lungengewebe stieg bereits nach der IPC-Phase an und erreichte nach 30 min einen Höhepunkt. In der contralateralen Lunge war bezüglich der IL-8 Expression in der Kontrollgruppe kein Unterschied zwischen conRL und repLL während in der IPC-Gruppe die Expression von IL-8 in der contralateralen Lunge geringer war als in der reperfundierten Lunge.

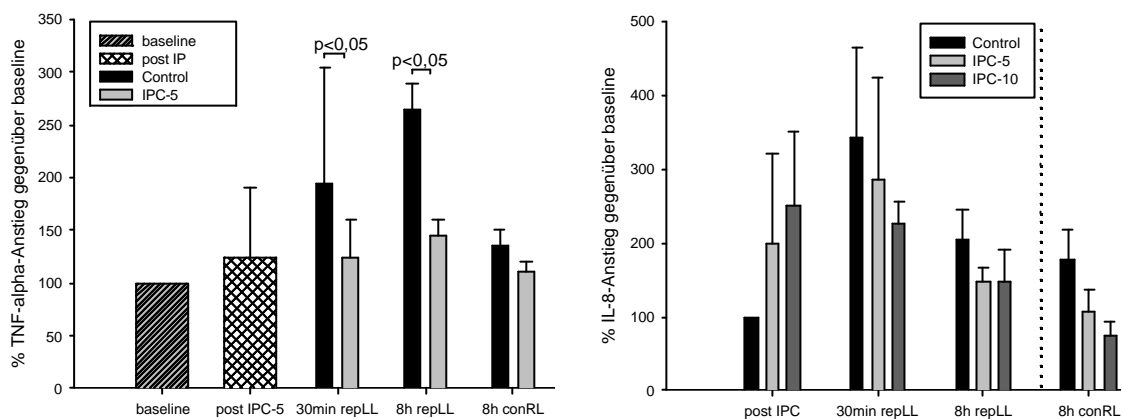


Abb. 15a und b: **mRNA-Expression für TNF-alpha** in den Zellen der broncho-alveoläre Lavage (15a, links). **mRNA-Expression für IL-8** im Lungengewebe (15b, rechts).

## **3.6 ENDOTOXIN TOLERANZ (ET)**

### **3.6.1 EINLEITUNG**

Die Injektion von Endotoxin in einen Organismus verursacht eine massive inflammatorische Antwort mit Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine, Fieber, Leukopenie bzw. Leukozytose und, unter Umständen erheblichen Kreislaufreaktionen. Nach wiederholten Endotoxingaben verringert sich die Heftigkeit der inflammatorischen Antwort und es kommt zu einer verminderten Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine. Die Endotoxintoleranz (ET) aktiviert ähnlich wie das ischemic preconditioning einen biologischen Schutzmechanismus, der nicht nur auf die Gabe von Endotoxin sondern auch auf andere schädigenden Einflüsse wie Hyperthermie und Ischämie protektive Mechanismen in Gang setzt, deren molekularen Hintergründe derzeit noch nicht vollständig bekannt sind. Während protektive Effekte in unterschiedlichen experimentellen Modellen wie Myokardinfarkt, hämorrhagischer Schock und Sepsis bereits nachgewiesen werden konnten fehlten bisher Untersuchungen zum Thema Ischämie und Reperfusion der Lunge.

In der folgenden Studie wurde untersucht, ob nach Induktion einer Endotoxintoleranz die Organschäden nach Ischämie und Reperfusion der Lunge geringer ausgebildet sind als in einer Kontrollgruppe von unbehandelten Tieren. Neben hämodynamischen Parametern wurden pulmonale Parameter wie Gasaustausch, pulmonale Compliance und Ausprägung der Permeabilitätsstörung gemessen.

### **3.6.2 ENDOTOXIN TOLERANZ IM HUNDEMODELL**

Eine detaillierte Methodenbeschreibung findet sich in der Publikation: „Induction of endotoxin tolerance improves lung function after warm ischemia in dogs“ (142)

#### **ET-Induktion *in-vivo***

In der Literatur waren im Rahmen einer Sepsisstudie ET-Gaben von 1mg/kg KG LPS i.v. verwandt worden. Unter dieser Dosierung entwickelte sich bei den Versuchstieren ein schwerer septischer Schock mit Hypotonie und Azidose. In unserer Versuchsreihe kam es nach Applikation von 10-20 µg/kg KG LPS i.v. zu einer milden, transienten Hypotonie, die nach wenigen Stunden nicht mehr nachweisbar war. Aufgrund dieser Daten wurde für die ET-Induktion folgendes Protokoll entwickelt:

Nach einer Anfangsdosis von 10 µg/kg KG i.v. (erster Tag) führten wir eine Dosissteigerung auf 60µg/kg KG i.v. (5.Tag) bei sechs Foxhounds beiderlei Geschlechts mit einem mittleren

Körpergewicht von 25,5±2,3 kg durch. Vor und nach LPS-Gabe wurden Blutproben mit einer pyrogenfreien Spritze, die mit Heparin-EDTA antikoaguliert wurde, entnommen.

Tag 1: Blutabnahme, Gabe von 5µg/kg KG LPS (E. coli) i.v., nach 2h erneute Blutabnahme und Temperaturmessung

Tag 2 dto. 10 µg/kg KG LPS

Tag 3 dto. 20 µg/kg KG LPS

Tag 4 dto. 40 µg/kg KG LPS

Tag 5 dto. 60 µg/kg KG LPS

Tag 6 dto. 60 µg/kg KG LPS

Die Versuchstiere wurden während der gesamten Zeitdauer veterinärmedizinisch betreut und haben die Endotoxin-Injektionen gut vertragen.

### **Chirurgischer Eingriff**

Anästhesie und chirurgischer Eingriff erfolgten in gleicher Technik wie bei den Versuchen zum ischemic preconditioning. Die getrenntseitige Beatmung und die Möglichkeit zur Entnahme von Blutproben aus der reperfundierten linken Lunge (repLL) und der contralateralen rechten Lunge (conRL) hatte sich als eine ausgezeichnete Methode zur Beurteilung des Ischämie und Reperfusionsschadens herausgestellt.

### TNF-alpha Spiegel im peripheren Blut

Nach einmaliger intravenöser Gabe von 10µg/kg KG LPS (E. coli) kam es zu einem deutlichen Anstieg von TNF-alpha im peripheren Blut (Table I). Die weiteren Gaben der nächsten Tage in höherer Dosierung erzeugten keinen weiteren Anstieg von TNF-alpha im peripheren Blut. Während sich das Vollblut am Tag 1 durch in vitro Gabe von LPS (salmonella equi) stimulieren ließ TNF freizusetzen konnte bereits nach einmaliger Injektion keine weitere Erhöhung der TNF Freisetzung weder in vitro noch in vivo ausgelöst werden.

### TNF- ? level

Time Points		Non-stimulated	1 ng/ml LPS	10ng/ml LPS	100ng/ml LPS
Day1	Before LPS	32,66 ? 12,35	170,61?32,37	273,24 ? 37,46	389,29 ? 115,36
	2h after LPS	1351,8 ? 365,62*	1153 ? 327,99*	1088,7 ? 283,12*	1155,2 ? 387,96*
Day2	Before LPS	58,32 ? 31,68	470,9 ? 418,91	537,37 ? 457,26	123,03 ? 39,31
	2h after LPS	57,64 ? 21,44	38,52 ? 14,44	39,86 ? 12,60	68,53 ? 20,98
Day3	Before LPS	27,21 ? 13,52	54,93 ? 21,55	85,2 ? 28,11	180,93 ? 68,44
	2h after LPS	61,87 ? 32,44	55,4 ? 26,01	96,51? 40,04	73,07 ? 31,01
Day4	Before LPS	37,87 ? 27,31	67,26 ? 31,98	104,86 ? 36,63	160,05 ? 38,88
	2h after LPS	65,68 ? 23,85	63,02 ? 28,48	67,34 ? 26,21	96,25 ? 29,88
Day5	Before LPS	61,10 ? 34,32	110,45 ? 31,06	165,30 ? 36,67	199,41? 46,27
	2h after LPS	82,94 ? 37,74	80,22 ? 37,90	89,76 ? 36,07	107,32 ? 43,67
Day6	Before LPS	46,16 ? 19,33	85,08 ? 28,17	106,55 ? 29,58	138,74 ? 30,88
	2h after LPS	48,69 ? 22,1	45,27?24,72	55,75 ? 34,42	47,07 ? 30,20
Day9	Before LPS	39,36 ? 24,89	124,65 ? 42,05	146,23 ? 41,85	152,09 ? 40,12

Tab. 5: Mit einem WEHI-Bioassay ermittelte **TNF-alpha Spiegel** während der Induktion der Endotoxin Toleranz mit LPS (E.coli) in den Vollblut-Überständen. Die erste Spalte repräsentiert die TNF-Spiegel im nicht stimulierten Vollblut. Die TNF-alpha Spiegel nach Zugabe von LPS (1, 10,100 ng/ml) in Vollblutüberstände sind in den weiteren Spalten aufgetragen. Alle Daten sind als MW ? SEM angegeben. (\*p<0,05 verglichen mit Tag1 vor LPS-Gabe (Baseline))

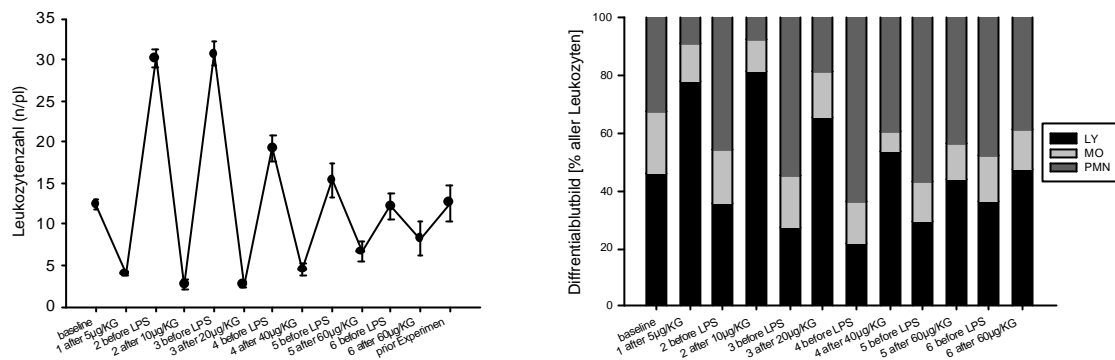


Abb. 16a und b: **Anzahl der Leukozyten** (16a, links) und das **Differentialblutbild** (16b, rechts) während der 6-tägigen Toleranzinduktion. (LY=Lymphozyten, MO=Monozyten, PMN=polymorphkernige neutrophile Granulozyten)

Als Reaktion auf Endotoxininjektionen (LPS E.coli) kam es zunächst zu einem drastischen Leukozytenabfall (Leukozytentrapping) und am darauffolgenden Tag zu einem massiven Anstieg der Leukozyten im peripheren Blut. Durch die erneute Gabe von LPS fielen die Leukozyten wieder stark ab. Diese Oszillation der Leukozytenzahl als Reaktion auf die LPS-Gabe schwingte sich in den darauffolgenden Tagen aus. Das Differentialblutbild (rechts) zeigte starke Verschiebungen der Anteile von PMN und Lymphozyten an der Gesamtleukozytenzahl. Der Anteil an Monozyten war weitgehend konstant. Dieser Effekt ist den Verschiebungen von PMN zuzuschreiben, deren Anzahl im zirkulierenden Pool durch die Adhäsion aktivierter Leukozyten in der Strombahn nach Injektion von LPS abnahm, um nach 24 Std. wieder reaktiv anzusteigen. Auch dieses Pendelphänomen verlor in den folgenden Tagen an Schwung und so bestand in der Anzahl der zirkulierenden Leukozyten und der Verteilung der Zellpopulation im Differentialblutbild am Tag des Ischämie/Reperusionsversuches kein signifikanter Unterschied zu den Ausgangswerten.



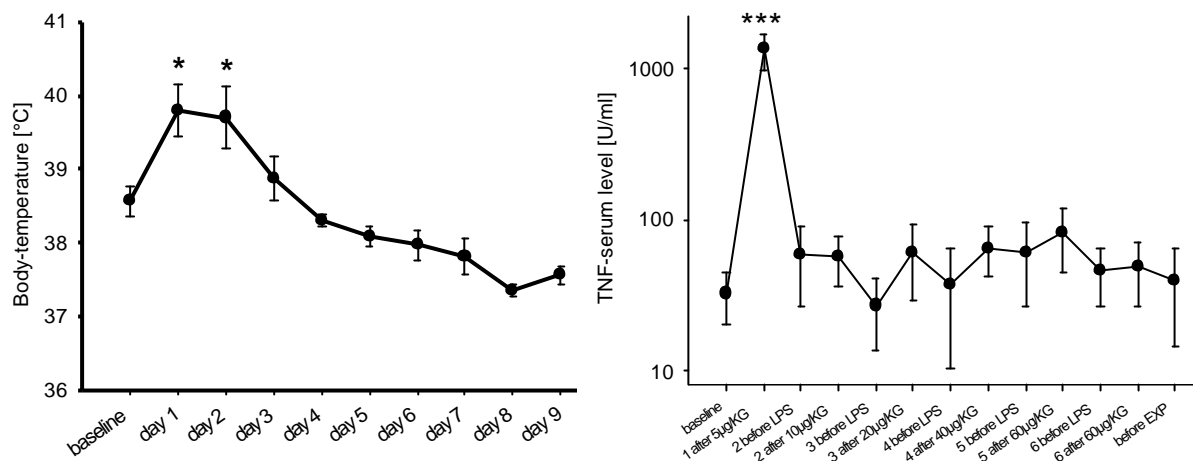


Abb. 17a und b: **Körpertemperatur** (17a, links) und **TNF-alpha Serumspiegel** (17b, rechts) bei den Versuchstieren (n=6), bei denen eine Endotoxin-Toleranz induziert wurde. Die Körpertemperatur wurde 2h nach Gabe des LPS gemessen. Die Blutentnahme erfolgte unmittelbar vor- und 2h nach Gabe des LPS.

Die Körpertemperatur 2h nach Injektion von LPS (*E. coli*, links), stieg nach der ersten Gabe bis auf 40°C an, fiel aber, trotz Dosissteigerung der LPS-Injektionen in den folgenden Tagen, im weiteren Verlauf ab und erreichte bereits am 4. Tag den Ausgangswert. Nach Erstinjektion von LPS kam es erwartungsgemäß zu einer massiven Freisetzung von TNF-alpha. Die TNF-alpha Bestimmung wurde mit Hilfe eines WEHI-BioAssays durchgeführt. Nach dieser Erstinjektion waren in den folgenden Tagen trotz Dosissteigerungen nur noch geringe Mengen an TNF-alpha im Serum messbar. Bei ausbleibender TNF-alpha Freisetzung nach LPS-Injektion besteht per definitionem eine Endotoxin Toleranz.

### 3.6.3 ERGEBNISSE ET-VERSUCHE

#### Gasaustausch

In der Kontrollgruppe kam es nach 3 Std. warmer Ischämie und nachfolgender Reperfusion zu einer deutlichen Verschlechterung des Gasaustausches auf der linken reperfundierten Seite (repLL) aber auch zu einem geringeren Ausmaß auf der rechten kontralateralen Lunge (conRL). Die conRL erholte sich innerhalb von 2h nach Reperfusion und der  $pO_2$  erreichte dann wieder den Ausgangswert von 175mmHg, während die repLL nur einen  $pO_2$  von 75 mmHg erreichte. In der ET-Gruppe war der Gasaustausch der repLL nur geringgradig eingeschränkt und lag mit einem  $pO_2$  von 150 mmHg nicht signifikant unter dem des Ausgangswertes.

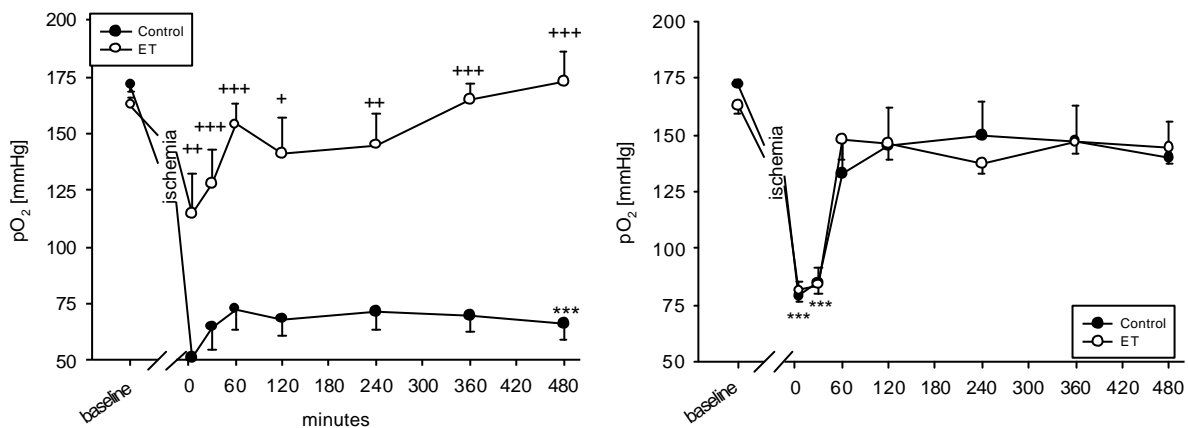


Abb. 18a und b: **pO<sub>2</sub>-Werte** der reperfundierten linken Lunge (Abb. 18a, repLL, links) und der kontralateralen rechten Lunge (Abb. 18b, conRL, rechts) vor und nach warmer Ischämie, beatmet mit einem FiO<sub>2</sub> von 0,5. Der Ausgangswert wurde nach Thorakotomie ermittelt. Die Daten werden als MW ± SEM von jeweils 6 Versuchen dargestellt. Signifikanz wird wie folgt bezeichnet: + (p < 0.05), ++ (p < 0.01) or +++ (p < 0.001) im Vergleich zwischen ET und Kontrollgruppe sowie \* (p < 0.05), \*\* (p < 0.01) und \*\*\* (p < 0.001) bei Vergleichen zwischen Baseline und 8 Std.-Reperfusionen.

## Lungenmechanik

Die dynamische Compliance wurde bei seitengetrennter Beatmung gemessen. Der Ausgangswert für die Einzellungenbeatmung liegt etwa bei 35ml/mbar. Nach Ischämie und Reperfusion gab es einen deutlichen Abfall in der pulmonalen Compliance sowohl in der repLL als auch in der conRL. Während bei der conRL ein Einfluss der ET nicht nachweisbar war, fiel eine deutliche Verbesserung der Compliance der repLL in der ET-Gruppe auf. In dieser Gruppe waren die Compliance-Werte zu allen Messzeitpunkten höher als in der Kontrollgruppe.

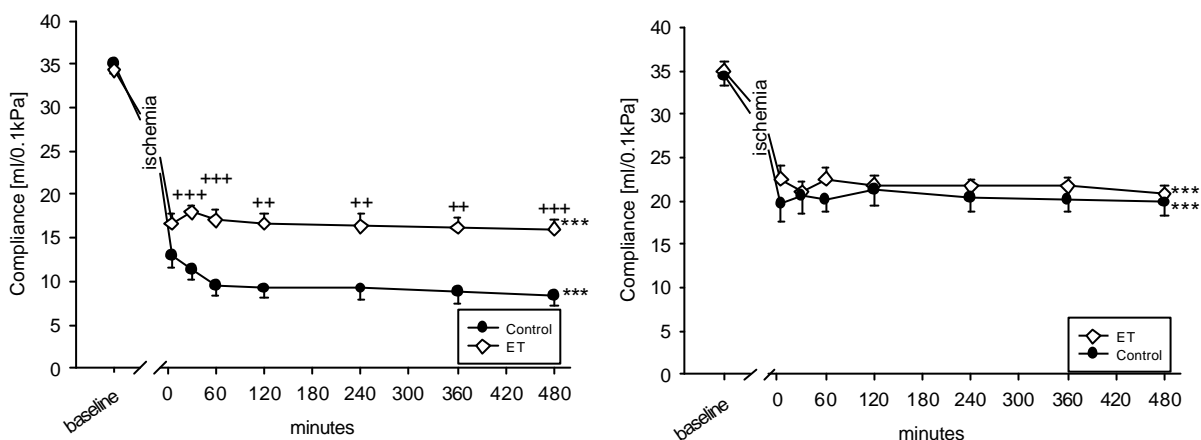


Abb. 19a und b: **Pulmonale Compliance** der reperfundierten linken Lunge (Abb. 19a, repLL, links) und der contralateralen rechten Lunge (Abb. 19b, conRL, rechts). Die Compliance-Daten wurden von dem Evita II-Monitor (Dräger, Lübeck) ermittelt. Baseline-Werte standen nur für die rechte Lunge zur Verfügung. Die Daten werden als MW  $\pm$  SEM von jeweils 6 Versuchen dargestellt. Signifikanz wird wie folgt bezeichnet: + ( $p < 0.05$ ), ++ ( $p < 0.01$ ) or +++ ( $p < 0.001$ ) im Vergleich zwischen ET- und Kontrollgruppe sowie \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ) und \*\*\* ( $p < 0.001$ ) bei Vergleichen zwischen Baseline und 8 Std.-Reperfusiondaten.

## Hämodynamische Parameter

Die Versuchstiere waren während des gesamten Versuchsverlaufes hämodynamisch stabil und benötigten keine Katecholaminunterstützung. Unmittelbar nach Reperfusion war in der Kontrollgruppe ein Anstieg des HZV mit einem konsekutiven Abfall des peripheren systemischen Gefäßwiderstandes zu beobachten. Nach 60 min Reperfusion bestand kein Unterschied bezüglich der systemischen Hämodynamik zwischen Kontrollgruppe und ET-Gruppe.

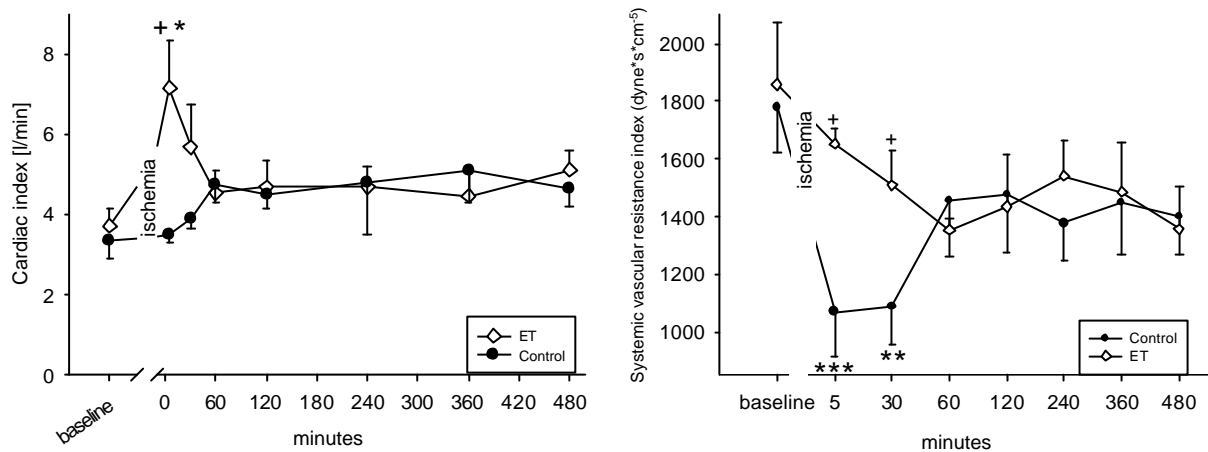


Abb. 20a und b: Links (20a): **Herzindex** vor Versuchsbeginn (Baseline) und nach Reperfusion. Rechts (20b): **systemischer Gefäßwiderstandsindex**. Die Daten werden als MW  $\pm$  SEM von jeweils 6 Versuchen dargestellt. Signifikanz wird wie folgt bezeichnet: +(p < 0.05), ++(p < 0.01) or +++(p < 0.001) im Vergleich zwischen ET- und Kontrollgruppe sowie \*(p < 0.05), \*\*(p < 0.01) und \*\*\* (p < 0.001) bei Vergleichen zwischen Baseline und 8 Std.-Reperusionsdaten.

		baseline	5 min rep	30 min rep	60 min rep	240 min rep	480 min rep
MAP	control	79,3 $\pm$ 2,3	81,9 $\pm$ 4,1	76,0 $\pm$ 4,8	86,7 $\pm$ 7,2	80,4 $\pm$ 4,7	77,9 $\pm$ 4,0
	ET	83,6 $\pm$ 6,3	75,4 $\pm$ 3,6	74,8 $\pm$ 3,4	81,4 $\pm$ 5,1	75,2 $\pm$ 3,4	72,2 $\pm$ 3,7
ZVD	control	3,3 $\pm$ 0,7	4,5 $\pm$ 0,8	4,5 $\pm$ 0,6	4,2 $\pm$ 0,9	3,3 $\pm$ 0,6	3,5 $\pm$ 0,6
	ET	3,0 $\pm$ 0,9	3,6 $\pm$ 1,1	3,6 $\pm$ 0,8	3,4 $\pm$ 1,0	2,8 $\pm$ 0,8	3,0 $\pm$ 0,8
PCWP	control	6,3 $\pm$ 0,7	7,2 $\pm$ 0,8	8,2 $\pm$ 1,1	7,8 $\pm$ 1,0	8,2 $\pm$ 1,0	8,3 $\pm$ 1,2
	ET	5,0 $\pm$ 0,3	6,0 $\pm$ 0,9	5,4 $\pm$ 0,7	5,0 $\pm$ 0,7	5,8 $\pm$ 1,2	7,8 $\pm$ 0,7
PVRI	control	131,1 $\pm$ 43,6	114,8 $\pm$ 28,6	151,3 $\pm$ 48,8	173,0 $\pm$ 26,0	145,3 $\pm$ 36,2	168,9 $\pm$ 21,8
	ET	130,9 $\pm$ 25,7	124,4 $\pm$ 20,2	107,8 $\pm$ 10,5	97,0 $\pm$ 19,0+	136,8 $\pm$ 22,5	87,6 $\pm$ 26,3+

Tab. 6: **Hämodynamische Parameter** vor Versuchsbeginn (Baseline) und nach Reperfusion. MAP=mittlerer arterieller Druck, ZVD=zentralvenöser Druck, PCWP=pulmonal-kapillärer Verschlussdruck, PVRI=pulmonalvaskulärer Gefäßwiderstandsindex. Die Daten werden als MW  $\pm$  SEM von jeweils 6 Versuchen dargestellt. Signifikanz wird wie folgt bezeichnet: +(p < 0.05), ++(p < 0.01) or +++(p < 0.001) im Vergleich zwischen ET- und Kontrollgruppe

### Pulmonalvaskuläre Hämodynamik

In der Kontrollgruppe stieg der pulmonalarterielle Druck unmittelbar nach Öffnen der Gefäßklemme signifikant im Vergleich zum Ausgangswert aber auch zur ET-Gruppe an. Während der gesamten Beobachtungszeit war in der Kontrollgruppe der PAP und der transpulmonale Gradient (PAP-PCWP=TPG) signifikant höher als in der ET-Gruppe. Ein signifikanter Unterschied bezüglich des pulmonalvaskulären Widerstandsindex (PVRI) zwischen Kontroll- und ET-Gruppe fand sich lediglich nach 8 Std. Reperfusion..

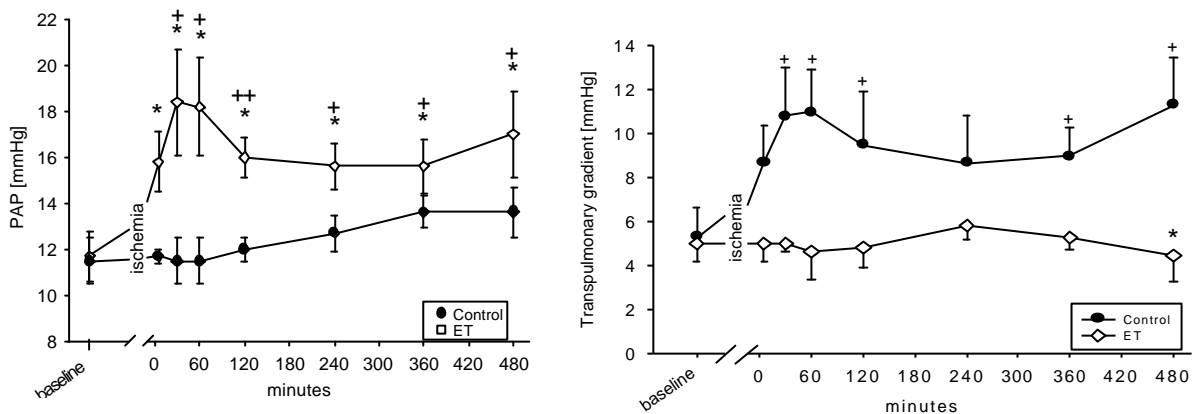


Abb. 21a und b: **Pulmonalarterieller Druck** (PAP) in der Art. pulm. comm (Abb. 21a, links). **TPG** der reperfundierten linken Lunge (Abb. 21b, repLL, links). Der TPG wurde mit der Standardformel errechnet (siehe Methodik). Die Daten werden als MW  $\pm$  SEM von jeweils 6 Versuchen dargestellt. Signifikante Unterschiede werden wie folgt bezeichnet: + ( $p < 0.05$ ), ++ ( $p < 0.01$ ) or +++ ( $p < 0.001$ ) im Vergleich zwischen ET- und Kontrollgruppe; \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ) und \*\*\* ( $p < 0.001$ ) bei Vergleichen zwischen Baseline und 8 Std.-Reperusionsdaten.

### Wet/dry-ratio, intraalveolärer Proteingehalt und Phospholipid/Proteinquotient

Ausgehend von einem physiologischen Anteil an Flüssigkeit im Lungengewebe (wet/dry-ratio =  $5.6 \pm 0.23$ ) kommt es nach 3h warmer Ischämie und 8h Reperfusion nicht nur im reperfundierten Organ sondern auch in der contralateralen Lunge zu einem ausgeprägten Lungenödem. Während in der Kontrollgruppe sich die Menge an extravasaler Flüssigkeit im contralateralen Lunge verdoppelt ( $9.9 \pm 0.6$ ) und im reperfundierten Organ verdreifacht ( $16.7 \pm 1.2$ ), fällt die Ödementwicklung in der ET-Gruppe in beiden Lungen signifikant geringer aus (repLL:  $9.4 \pm 0.8$ ; conRL:  $6.2 \pm 0.5$ ). Neben dem Anstieg der Permeabilität für Wasser kommt zudem zu einer Akkumulation von Proteinen im alveolären Kompartiment. Nach 8 Std. Reperfusion steigt der intraalveoläre Proteingehalt in der Kontrollgruppe sowohl im reperfundierten Organ (repLL  $2107.2 \pm 500.4 \mu\text{g/ml}$ ) als auch, wenngleich in geringerem Ausmaß, in der contralateralen Lunge signifikant (conRL  $586.0 \pm 213.1 \mu\text{g/ml}$ ) gegenüber dem Ausgangswert ( $66.7 \pm 7.0 \mu\text{g/ml}$ ) an. In der ET-Gruppe ist dieser Anstieg des intraalveolären Proteingehaltes im reperfundierten Organ signifikant geringer (repLL  $869.5 \pm 185.0 \mu\text{g/ml}$ ). Der Quotient von oberflächenaktiven Phospholipiden und dem surfactant-inhibierenden, intraalveolären Protein fällt von einem Ausgangswert von ( $0.47 \pm 0.01$ ) nach Reperfusion in der Kontrollgruppe im reperfundierten Organ ( $0.05 \pm 0.01$ ) signifikant ab. Durch den Einfluss der Endotoxintoleranz bleibt das Verhältnis zwischen intraalveolären Protein und Phospholipiden weitgehend erhalten (repLL  $0.14 \pm 0.03$  and con RL  $0.86 \pm 0.24$ ). Der Einfluss der Endotoxintoleranz ist somit hochsignifikant ( $p < 0,001$ ).

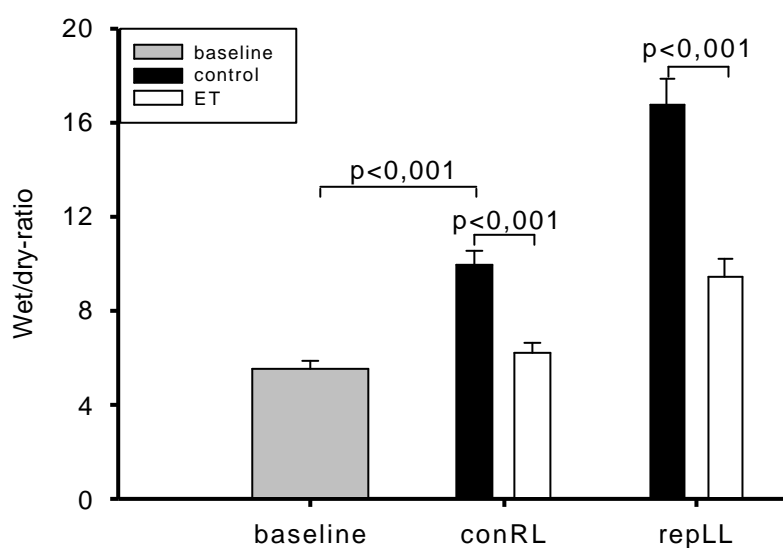


Abb. 22: **Wet/dry-ratio** Baseline (vor Versuchsbeginn) sowie nach 3 Std. Ischämie und 8 Std. Reperfusion in der reperfundierten linken Lunge (repLL) und der contralateralen rechten Lunge (conRL). Das Signifikanzniveau zwischen den Gruppen ist in der Graphik angegeben.

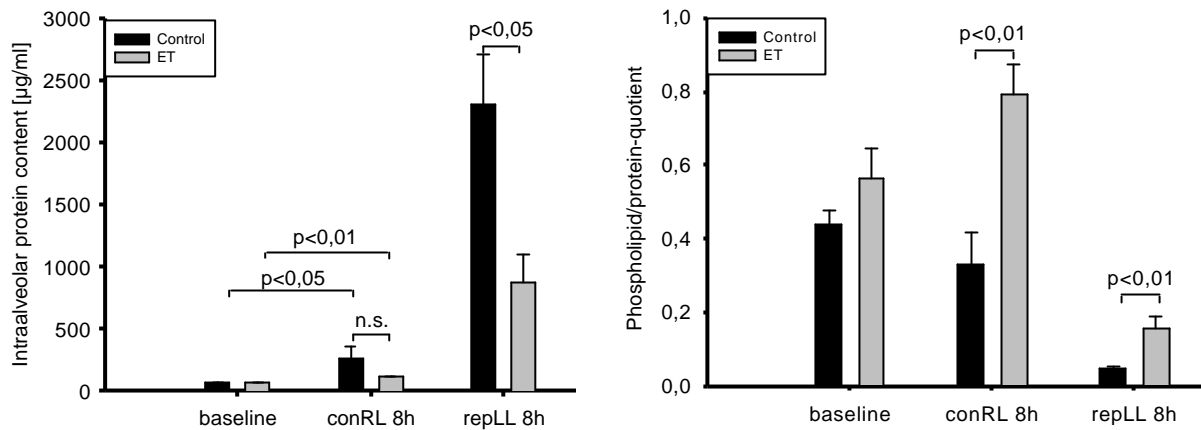


Abb. 23a und b: **Intraalveolärer Proteingehalt** (Abb. 23a, links) und **Phospholipid/Proteinquotient** (Abb. 23b, rechts) in der BAL vor (Baseline) und nach Reperfusion. von ischemic preconditioning unbeeinflusst. Nach Reperfusion kommt es im reperfundierten Organ zu einem signifikanten Anstieg des intraalveolären Proteingehaltes, der nach ET signifikant geringer ausfällt. Konsekutiv ist der Quotient von oberflächenaktiven Phospholipiden (= Surfactantfunktion) in der ET Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Die Daten sind als MW±SEM dargestellt

## **4 DISKUSSION**

### **4.1 EINLEITUNG**

Die Folgen von Ischämie und Reperfusion sind in der klinischen Medizin in vielen Bereichen Auslöser schwerer Krankheitszustände. Ischämische Schädigungen der Herzmuskulatur, des Darms, der Extremitäten oder des zentralen Nervengewebes sind für einen großen Teil der Gesamtmorbidität und Mortalität in den Industrienationen verantwortlich. Ischämie, definiert als eine Reduktion des Blutflusses und der Sauerstoffversorgung unter die Bedarfsgrenze, führt zu einer primären Schädigung von Gewebestrukturen. Dies resultiert in einer Organ-Minderfunktion oder in einem kompletten Organversagen. Nach eingetretener ischämischer Schädigung der zellulären Strukturen setzt dann eine verspätete Reperfusion ein inflammatorisches Geschehen in Gang, das die lokale Schädigung akzeleriert und in den Gesamtorganismus trägt. In der klinischen Praxis ist bei einem plötzlichen Gefäßverschluss der Zeitverlauf bis zur Reperfusion nur gering beeinflussbar. Verzögernde Faktoren wie Dauer bis zum Beginn der Beschwerdesymptomatik, der richtigen Diagnosestellung, dem Transport in eine entsprechende Therapieeinrichtung bis zum Beginn der Reperfusion bestimmen wesentlich die weitere Prognose der Patienten. Demgegenüber hat die Transplantationsmedizin einen besonderen Vorteil: Elektivität. Organe können konserviert, die Ischämiezeiten m.E. eingeplant und Voraussetzungen für einen optimalen Ablauf geschaffen werden. Angesichts einer immer noch erheblichen Morbidität und Mortalität aufgrund von Ischämie/Reperfusionsschäden, hat die Erforschung der Ischämietoleranz eine ganz besondere Bedeutung. Die Planbarkeit des Eingriffs würde einen außergewöhnlich effizienten Einsatz therapeutischer Regimen möglich machen. Durch die „Elektivität“ von Ischämie und Reperfusion ließen sich Organe oder auch der Gesamtorganismus konditionieren und dann die Ischämietoleranz bedarfsgerecht erhöhen.

Die Organschäden durch Ischämie/Reperfusion waren am hier vorgestellten Modell reproduzierbar und in verschiedenen Ansätzen war eine Einflussnahme auf die Schwere des Ischämie/Reperfusionsschadens möglich. Durch die Instillation von bovinem Surfactant konnte eine signifikante Verbesserung der wichtigsten pulmonalen Funktionsparameter wie Gasaustausch und Compliance erreicht werden. Ein Protokoll von 5-minütiger ischämischer Konditionierung erbrachte zusätzlich zu einer Verbesserung der pulmonalen Funktion noch eine Verminderung der Permeabilitätsstörung. Auch durch die Induktion einer Toleranz gegenüber Endotoxin in den Versuchstieren, waren sowohl die Einschränkung der Lungenfunktion als auch die Störung der Gefäßpermeabilität nach Ischämie und Reperfusion signifikant geringer.



## **4.2 IM RAHMEN DES REPERFUSIONSSYNDROMS KOMMT ES ZU REGIONALEN VERTEILUNGSSTÖRUNGEN DES PULMONALEN BLUTFLUSSES**

Störungen des Gasaustausches und der pulmonalen Compliance sind ein häufiges Phänomen nach Lungentransplantation, aber auch nach Lungenembolie und nach Operationen mit Hilfe der Herz-Lungenmaschine, hier insbesondere nach hypothermem Kreislaufstillstand. Dieser Ischämie/Reperfusionsschaden der Lunge, der auch in den hier vorgelegten experimentellen Arbeiten dokumentiert werden konnte, ist zunächst durch Störungen der pulmonalen Durchblutung gekennzeichnet. Nach verlängerter Ischämie und nachfolgender Reperfusion entwickelt sich eine inhomogene Perfusionsverteilung mit hohen lokalen pulmonalvaskulären Widerständen. Der Mechanismus dieser pulmonalvaskulären Vasokonstriktion ist derzeit nicht vollständig geklärt. Es werden in diesem Zusammenhang verschiedene Auslöser diskutiert, die Wirkung auf den pulmonalen Vasotonus haben sollen. Auf der vasodilatatorischen Seite kommt es zu einer verminderten Freisetzung von Substanzen wie z.B. NO oder Prostazyklin. Durch einen gestörten Angiotensin-converting-enzyme Metabolismus, aber auch durch die Freisetzung von Thromboxan A<sub>2</sub> und Endothelin wirken aber auch direkt vasokonstringierende Substanzen auf das pulmonale Gefäßbett ein. In der vorliegenden Studie konnte die Verminderung des pulmonalen Blutflusses (PBF) in der transplantierten Lunge verifiziert werden und um den Befund einer erheblichen Umverteilung des lokalen Blutflusses, mit Ausbildung deutlicher regionaler Unterschiede, ergänzt werden: So fanden sich in den apikalen, den ventralen und den dorsalen Abschnitten die größten Veränderungen. Hakim et al. konnte zeigen, dass die räumliche Verteilung des PBF einem zentral-peripheren Gradienten unterliegt (143). In einem mathematischen Modell konnte unter Einbeziehung der Gefäßlänge und der dreidimensionalen Gefäßaufzweigung der PBF in der jeweiligen Region vorhergesagt werden. Dadurch kann der Unterschied zwischen den geringen Änderungen in der medialen Region (kurze Gefäßstrecke) und der deutlichen Reduktion des PBF in der apikalen Region (lange Gefäßstrecke) erklärt werden. Entsprechend der Reduktion im PBF fanden sich stark erhöhte pulmonal vaskuläre Widerstände (PVR) in der apikalen, der dorsalen und der ventralen Region, während die Veränderungen in der medialen und lateralen Region nur gering ausfielen. Die native Lunge war bezüglich des PBF und PVR nahezu unverändert. Dies spricht, bezogen auf den PBF und PVR, für ein regionales Phänomen und gegen einen Einfluss systemisch wirksamer vasokonstriktorischer Substanzen. Die unter Verwendung markierter „beads“ beschriebenen Prozesse entzogen sich einem Nachweis mittels Swan Ganz Katheter. Mit diesen Messungen

konnte weder eine Erhöhung des PAP noch des pulmonalen Gesamtwiderstandes gemessen werden. Dies mag als Hinweis für die notwendige Vorsicht bei der Interpretation von klinischen Daten gelten, die mit Methoden generiert werden, die nicht in der Lage sind, solche profunden Störungen der pulmonalen Perfusionsverteilung darzustellen.

### **4.3 IM GEFOLGE DES REPERFUSIONSSCHADENS TRETEN ERHEBLICHE PERMEABILITÄTSSTÖRUNGEN AUF**

Im Rahmen der Reperfusion von vorher okkludierten, pulmonalen Blutgefäße kommt es in der Regel zu einer ausgedehnten Permeabilitätsstörung nicht nur der nachgeschalteten pulmonalen Strombahn. Im Falle einer geringen Ausprägung ist der Übertritt von Blutplasma auf das Interstitium beschränkt. Die klinischen Parameter zeigen hier lediglich eine leichte Einschränkung der pulmonalen Compliance wegen der höheren Steifigkeit des flüssigkeitsgefüllten Lungengewebes sowie, aufgrund der Verlängerung der Diffusionsstrecke, eine moderate Absenkung des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes. Schwere Permeabilitätsstörungen sind schließlich durch den Flüssigkeitseinbruch in das alveoläre Kompartiment gekennzeichnet. In allen Kontrollgruppen der hier vorgestellten Arbeiten, und zwar unabhängig ob nach kalter oder nach warmer Ischämie, konnte im reperfundierten Organ eine schwerwiegende Permeabilitätsstörung nachgewiesen werden.

Bemerkenswert war die deutliche Zunahme an extravasaler Flüssigkeit nicht nur im transplantierten, sondern auch im nativen Organ. Dieses Phänomen tritt nicht nur bei der Ischämie und Reperfusion der contralateralen Lunge, sondern auch bei Reperfusionsschäden anderer Organe wie Leber oder Darm oder auch bei systemischen Erkrankungen wie Sepsis und Schock auf. Der Mechanismus wird als „*remote injury*“ beschrieben und kausal mit der Wirkung zirkulierender inflammatorischer Mediatoren erklärt. Dies reflektiert die besondere Sensibilität der Lunge (Schockorgan) gegenüber zirkulierenden, inflammatorischen Substanzen, die ja zwangsläufig alle die Lunge passieren müssen. Die Menge an extravasaler Flüssigkeit erreichte bei den hier vorgestellten Untersuchungen in der nativen Lunge sogar das Ausmaß der Veränderungen in der reperfundierten Lunge. Unter künstlicher Beatmung war jedoch weder der Gasaustausch noch die pulmonale Compliance auf der nativen Seite wesentlich beeinträchtigt. So stieg in der nativen Lunge der intraalveoläre Proteingehalt von 240µg/ml auf 500 µg/ml, der prozentuale Anteil an PMN von 2% auf 30% und die *wet/dry-ratio* von 5,5 auf 8,5. Der entscheidende Unterschied bestand jedoch in der alveolären Proteinakkumulation, die in der nativen Lunge nur gering (siehe oben), in der reperfundierten Lunge aber massiv (~ 10fache

Erhöhung) war. Ob die Diskrepanzen in den funktionellen Befunden zwischen „nur“ Ödementwicklung und Ödementwicklung mit gleichzeitiger Diffusion höhermolekularer Proteine einen Unterschied in der Qualität der Permeabilitätsstörung oder nur die Größe des Barrieredefekts repräsentieren, ist derzeit nicht gesichert. Während die reine Flüssigkeitsansammlung, wie bei einem kardialen Lungenödem, lediglich zu einer Erhöhung der Diffusionsstrecke und einer leichten Compliancestörung führt und somit therapeutisch gut zu beeinflussen ist, hat die alveoläre Proteinakkumulation weitreichende Folgen, nämlich die Inhibition des Surfactantsystems.

Für das transplantierte Organ ergaben sich dadurch schwerwiegende Funktionsstörungen. Im Transplantat wurden zu den Messzeitpunkten 6h und 12h in der BALF gravierende Schäden bezüglich der Permeabilität mit drastischem Anstieg der PMN auf 82% und des Proteingehaltes in der BALF auf 1900 $\mu$ /ml sowie einer interstitiellen und alveolären Flüssigkeitszunahme sichtbar.

Die Erhöhung der alveolären Oberflächenspannung ist verantwortlich für die Störung von Gasaustausch und Compliance beim Ischämie/Reperfusionsschadens. Die Bestimmung der Oberflächenspannung im Bubble-Surfactometer aus den BALF-Proben der hier vorgestellten Experimente zeigte in der transplantierten Lunge einen massiven Anstieg der intraalveolären Oberflächenspannung, die angesichts der Schwere der Veränderung den Alveolarkollaps und damit die Ausbildung von Atelektasen verursachen muss. Daraus resultiert ein funktioneller Rechts-Links-Shunt mit konsekutiver Hypoxämie, die auch durch hohe inspiratorische Sauerstoffkonzentrationen nicht zu beeinflussen ist. Weiterhin waren in der biochemischen Analyse der BAL-Proben die Phospholipid- und Fettsäureprofile hochgradig verändert. Es konnte ein Verlust an funktionell bedeutsamen Fraktionen wie dipalmitoyliertes Phosphatidylcholin (DPPC), Surfactant Protein B und C wie auch der *large surfactant aggregates* nachgewiesen werden. In Verbindung mit der oben bereits erwähnten und auch hier unter Beweis gestellten Inhibition durch Plasmaproteine ist der beobachtete, erhebliche Verlust der oberflächenspannungssenkenden Funktion hinreichend erklärt. Die enge Korrelation ( $r=-0,7$ ;  $p=0,0002$ ) zwischen minimaler Oberflächenspannung und respiratorischem Quotienten ( $paO_2/FiO_2$ ) bei den nicht mit Surfactant behandelten Tieren belegt bereits den engen Zusammenhang zwischen Oberflächenspannungsregulation und Gasaustausch. Die Kausalität dieser Beziehung konnte im Rahmen der hier durchgeführten Surfactanttherapie unter Beweis gestellt werden. Während wesentliche inflammatorische Veränderungen hierdurch unbeeinflusst blieben (Transmigration von PMN, alveolärer Proteingehalt, Schwere des Lungenödems), konnte durch die bronchoskopische Applikation großer Mengen eines bovinen Surfactantextraktes (250mg/kg KG) eine weitreichende und zumindest über den Beobachtungszeitraum von 12

Stunden anhaltende Verbesserung von Compliance und Gasaustausch beobachtet werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Daten vorhergehender Studien, die ebenfalls durch Applikation von Surfactant eine Verbesserung des Gasaustausches an Modellen des I/R-Schadens festgestellt haben (89, 90, 144, 145). In experimentellen wie in klinischen Studien des *Acute Respiratory Distress Syndrome* konnte ebenfalls durch Verabreichung von Surfactant ein ähnlicher Effekt auf die Compliance und die arterielle Oxygenierung erzielt werden. Dadurch konnte in der Regel eine deutliche Reduktion der der Beatmungsdrücke sowie des  $\text{FiO}_2$  vorgenommen werden. Die bei den hier vorgestellten Untersuchungen verwendete Dosis von 250mg/kg KG ist angelehnt an die beim ARDS verwendeten Dosierungen und scheint in dieser Höhe notwendig zu sein um die eingeströmten, inhibitorischen Plasmaproteine funktionell zu antagonisieren (146-149). Wie oben erwähnt überraschte die fehlende anti-inflammatorische Wirkung einer solchen Surfactanttherapie, waren doch solche Effekt in vitro auf Makrophagen und Monozyten (150) bereits publiziert. Auch die Makrophagen-Migration (151) und die Lymphozytenproliferation (152, 153) erwiesen sich in der Vergangenheit durch Ko-Inkubation mit Surfactant als beeinflussbar. Allerdings bleibt festzustellen, dass pulmonale Ischämie/Reperfusionsschäden, die sich von der vaskulären Seite zur alveolären Seite hin entwickeln, durch die sicherlich vorhandene Begrenzung der Surfactantwirkung auf das alveoläre Kompartiment wahrscheinlich nur unbedeutend beeinflussen lassen.

Nach Reperfusion kam es zum Anstieg des transpulmonalen Gradienten (TPG) im pulmonalen Kreislaufsystem (siehe oben). Ein solcher Anstieg des TPG nach I/R ist ein bekanntes Phänomen und hängt wahrscheinlich mit der Freisetzung von vasokonstringierenden Substanzen wie z.B. Thromboxan  $\text{A}_2$  und Endothelin zusammen (154). Die Surfactantapplikation hatte erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die Freisetzung dieser Mediatoren und damit auch keine Auswirkung auf den pulmonal-vaskulären Widerstand. Veränderungen der hämodynamischen Parameter wie arterieller Mitteldruck, zentralvenöser Druck und Herzzeitvolumen durch die Surfactantgabe waren nicht signifikant. Auffällig war jedoch ein signifikanter Abfall des systemvaskulären Widerstandindex in der Kontrollgruppe, während der SVRI nach Surfactantgabe konstant blieb. Eine Abnahme des peripheren Widerstandes nach Ischämie und Reperfusion ist ein bekanntes Phänomen und mit der Ausschüttung inflammatorischer Mediatoren erklärbar. Es kann nur spekuliert werden, dass durch die Instillation von Surfactant und damit durch die Verminderung der beatmungsbedingten Scherkräfte weniger pro-inflammatorische Mediatoren (Bakterien, LPS, Zytokine) in die Zirkulation freigesetzt wurden. In einer ARDS-Studie bei Patienten mit ARDS und septischem Schock konnte allerdings keine Veränderung des systemischen Widerstandes nach Surfactantapplikation beobachtet werden (155).

### 4.3.1 VILI UND UNILATERALE TRANSPLANTATIONSMODELLE

Durch massives Anheben der Beatmungsdrucke und die hiermit verbundene Erhöhung der Tidalvolumina kann eine Wiedereröffnung von kollabierten Alveolarbezirken erzielt werden. Hieraus resultiert allerdings auch eine Schädigung der Lunge vor allem in den noch gesunden, also noch gut dehnbaren und nicht kollaptischen, Arealen der Lunge. Diese Schädigung wird auch als ventilator induced lung injury (VILI) bezeichnet und kann eine Aktivierung und vermehrte Freisetzung inflammatorischer Mediatoren und eine bakterielle Translokation eine Bakteriämie und damit die pneumogene Sepsis induzieren. (156-158). Bezogen auf die hier vorgestellten Experimente müssen aber auch folgende Überlegungen Berücksichtigung finden. Die Grenzziehung zwischen atelektatischen und nicht-atelektatischen Lungenarealen verläuft nicht nur innerhalb eines (z.B. transplantierten) Organs, sondern im Falle der heterologen LTX in ein ansonsten gesundes Empfängertier in besonderen Maße auch zwischen der nativen Lunge (weitgehend normale Compliance) und der reperfundierten Lunge. Bei gemeinsamer Beatmung beider Lungen ist die Überblähung der nativen (hohe Tidalvolumina und Beatmungsdrucke) bzw. die Ausbildung von Atelektasen in der reperfundierten Lunge (Minderbeatmung bei geringen Tidalvolumina und niedrigen Beatmungsdrücken infolge erhöhter Oberflächenspannung) unausweichlich. In einem solchen Modell wird also die gemeinsame Beatmung zu einem VILI nicht nur im transplantierten sondern vor allem auch im nativen Organ führen können. Diese Problematik wurde in unserem Modell durch die bei dieser Fragestellung erstmals angewendete, getrenntseitig-synchronisierte Beatmung der nativen und reperfundierten Lunge vermieden. Obwohl die experimentelle Überprüfung dieser pathophysiologischen Überlegungen nicht im Vordergrund der hier präsentierten Untersuchungen stand, ist aus dem Vergleich der hier gewonnenen mit den bislang von anderen Gruppen publizierten Daten ersichtlich, dass diesem Zusammenhang bei Modellen einer heterologen LTX ein möglicherweise großer Stellenwert zukommt. So wurde bislang in allen anderen Untersuchungen ein weitreichender Verlust der Gasaustauschfunktion und der Compliance auch in der nativen Lunge und teilweise in fast identischer Art und Weise wie im Transplantat beobachtet (93, 144). Die vorliegenden Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Strategie der seitengetrenten Beatmung am hier verwendeten Modell einen positiven Effekt auf die native aber auch auf die transplantierte Lunge ausübt.

#### **4.4 VERMINDERUNG DES AUSMASSES EINES I/R-SCHADENS DURCH ISCHÄMISCHE PRÄKONDITIONIERUNG**

Die zu dieser Thematik durchgeführten Versuchsreihen zielten weniger auf die Therapie des bereits eingetretenen I/R-Schadens als auf eine Protektion der Lunge durch eine Erhöhung der Ischämietoleranz. Es wurden 2 Verfahren gewählt, die potentiell in der Lage sind, die Reaktion der Lunge auf den Ischämieschaden zu begrenzen: erstens das Prinzip der ischämischen Präkonditionierung (IPC), das durch zelluläre Mechanismen die Ischämietoleranz anhebt und zweitens die Induktion einer Endotoxintoleranz, deren Prinzip auf der Hemmung der pro-inflammatorischen Reaktion nach Ischämie und Reperfusion beruht.

Die Wirkung der ischämischen Präkonditionierung wurde in 2 Protokollen untersucht. Ein erstes Protokoll mit 5-minütiger Ischämie und nachfolgender 15-minütiger Reperfusion (IPC-5) und ein zweites mit insgesamt 2 Zyklen von 10-minütiger Ischämie und 10-minütiger Reperfusion wurden bezüglich der protektiven Wirksamkeit bei 3-stündiger warmer Ischämie der Lunge untersucht. Während die Wirksamkeit des IPC an Herzen, Nieren, Lebern und Nervengewebe bereits nachgewiesen wurde, fehlten bisher Daten für die Lunge. Die gemessenen Lungenfunktionsparameter entsprechen weitgehend denen der Surfactant-Versuchsreihe. Während der 8-stündigen Nachbeobachtungszeit wurden pulmonale ( $pO_2$ , Compliance, PVRI, wet/dry-ratio) und hämodynamische Parameter (MAP, CI, SVRI) untersucht. Dazu kam eine detaillierte Untersuchung der BAL-Flüssigkeit (Phospholipide, intraalveolärer Proteingehalt), sowie der Expression pro- und anti-inflammatorischer Zytokine aus der BALF und aus dem Lungengewebe. In der IPC-5 Gruppe fanden sich signifikante Verbesserungen verschiedener funktioneller und biochemischer Parameter. Während das Ausmaß der Ödementwicklung in der Kontroll- und der IPC-Gruppe nicht wesentlich unterschiedlich war ergab sich eine signifikante Verbesserung des Gasaustausches und der pulmonalen Compliance nach IPC-5. Insofern ergibt sich eine gute Übereinstimmung mit der hohen protektiven Potenz der ischämischen Präkonditionierung mit den Untersuchungen in anderen Organsystemen. Entsprechend den verminderten funktionellen Störungen war die Menge an intraalveolärem Protein nach IPC-5 signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Dies stand in guter Übereinstimmung mit einer verminderten Expression von TNF-alpha in BAL-Zellen. Überraschenderweise waren die Ergebnisse nach IPC-10 völlig gegensätzlich, die Lungenfunktion war bezüglich einzelner Parameter sogar schlechter als in der Kontrollgruppe. Insgesamt erwies sich das Protokoll von 2 Zyklen à 10 min transientser Ischämie und 10 min Reperfusion als ungeeignet, die Lungenfunktion positiv zu beeinflussen. Auch in der detaillierten Untersuchung der Permeabilitätsstörung, die ihren Ausdruck in einer erhöhten wet/dry-ratio und einem erhöhten

intraalveolären Proteingehalt finden, wie auch der Surfactantfunktion deuten die Parameter wie verminderte *large surfactant aggregates*, erhöhte Oberflächenspannung in der BAL-Flüssigkeit und ein verminderter Phospholipid-Protein Quotient auf eine fehlende Protektion durch das IPC-10 Protokoll (Friedrich et al., Manuskript eingereicht). Während in anderen Organen wie Herz und Leber eine gewisse Variabilität der ischämischen Präkonditionierung möglich ist (137), scheint die Lunge repetitive Phasen von Ischämie und Reperfusion nicht zu tolerieren. Eine hinreichende Erklärung für dieses Phänomen muss noch offen bleiben. Durch IPC-5 war es möglich die Funktion der nativen Lunge zu verbessern, was die These der verminderten systemischen Inflammation nach IPC unterstützt. Ein protektiver Effekt auf andere Organe ist mehrfach beschrieben. So schützt ein IPC Protokoll an der Leber nicht nur das Organ selbst, sondern auch die Lunge vor Reperfusionsschäden(99).

## **4.5 VERMINDERUNG DES AUSMASSES EINES I/R-SCHADENS DURCH ENDOTOXINTOLERANZ**

Die Induktion einer Endotoxintoleranz (ET) erstreckt sich nicht nur auf LPS-induzierte Vorgänge, sondern auch auf klinische Zustände wie hämorrhagischer Schock, Myokardinfarkt und Ischämie/Reperfusionsschaden (103, 124, 128, 159). Diesen klinischen Zuständen gemeinsam ist die Entwicklung einer inflammatorischen Reaktion im Sinne eines SIRS, wobei die weitere Prognose nicht nur von der Schwere der Grunderkrankung sondern auch vom Ausmaß der inflammatorischen Reaktion bzw. der immunologischen Dysregulation abzuhängen scheint. Bei der Entstehung inflammatorischer Reaktionen geht man derzeit davon aus, dass der Freisetzung von TNF-alpha aus Makrophagen eine zentrale Rolle zukommt (160). Nach Induktion einer Endotoxintoleranz kommt es zur Inhibition der Synthese und der Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie z.B. TNF-alpha und IL-1 aus Makrophagen und somit zu einer verminderten inflammatorischen Antwort. Der Mechanismus scheint in einer Herunterregulation von NF $\kappa$ B, einem wichtigen Faktor bei der intrazellulären Signaltransduktion zur Zytokinsynthese, zu liegen (117). In der vorliegenden Studie wurde an einem Tiermodell am Hund eine protektive Wirkung der Endotoxintoleranz in einem Ischämie/Reperfusionsmodell der Lunge untersucht. Die Induktion der Endotoxintoleranz erfolgte durch i.v. Applikation von LPS in ansteigenden Dosierungen (5 $\mu$ g/kg am Tag 1 bis 60 $\mu$ g/kg an Tag 6). Durch die Toleranzentwicklung wurden auch hohe Dosen von LPS gut vertragen. Während es unmittelbar nach Erstinfusion von 5 $\mu$ g/kg zu einem Fieberanstieg auf 40°C kam, lösten die Injektionen der Folgetage keine weitere Fieberreaktion mehr aus. Auch der Abfall der Leukozyten im Blut nach LPS-Injektion und der konsekutive Anstieg von Leukozyten am nächsten Tag vor der erneuten Injektion fiel trotz der Dosissteigerung in den weiteren Tagen geringer aus. Am Tag 6 nach Injektion von 60 $\mu$ g/kg war schließlich keine Änderung der Anzahl an peripheren Leukozyten im Blut mehr erkennbar. Das Differentialblutbild zeigte, dass die Schwankungen der Leukozytenzahl im wesentlichen auf die Änderung der Anzahl von PMN zurückzuführen war, während die Anzahl an Monozyten weitgehend konstant blieb. Unmittelbar nach LPS-Injektion kam es zu einem Abfall an PMN, die wahrscheinlich durch die LPS-Stimulation in der peripheren Strombahn vermehrt adhären waren. Als wichtigster Parameter für die Toleranzentwicklung wurde die TNF-Freisetzung im peripheren Blut mit Hilfe eines WEHI-Bioassays bestimmt. Hier zeigte sich, dass die Erstinjektion von LPS eine massive Freisetzung von TNF-alpha zur Folge hatte. Weitere LPS-Injektionen lösten nur noch geringe TNF-Freisetzungen aus. In der



Zusammenschau der klinischen Reaktion der Versuchstiere und der TNF-Messung kann davon ausgegangen werden, dass mit diesem Modell eine Endotoxin-Toleranz erreicht wurde.

Der chirurgische Eingriff erfolgte am Tag 9, nachdem die Tiere sich von den LPS-Injektionen erholt hatten in Analogie zu den oben gemachten Angaben (3h warme Ischämie, 8h Reperfusion). Auch in dieser Studie wurde neben der reperfundierten Lunge auch das contralaterale Organ untersucht. Wie bereits in den vorhergehenden Arbeiten fand sich in der Kontrollgruppe eine ausgeprägte, wenngleich klinisch nicht apparente, Permeabilitätsstörung des contralateralen Organs. Auslöser dafür waren offensichtlich pro-inflammatorische Mediatoren, die in die systemische Blutbahn ausgeschüttet wurden und damit eine systemische Entzündungsreaktion auslösen konnte. Bezüglich der Lungenfunktion wurden signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der ET-Gruppe in allen untersuchten Parametern gefunden. So bestanden hochsignifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und ET-Gruppe bzgl. der Oxygenierung der reperfundierten Lunge. Auch die Compliance des reperfundierten Organs war in der ET-Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Ein wesentlicher Erklärungsansatz besteht auch hier in einer möglicherweise verminderten Schädigung des pulmonalen Surfactantsystems, entweder durch die Reduktion von Störungen der Zusammensetzung oder durch Reduktion der Inhibition der Surfactantfunktion durch Plasmaproteine. In der Tat war nach Endotoxin-Vorbehandlung das Ausmaß des Lungenödems signifikant geringer und der intraalveoläre Proteingehalt signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Detaillierte Untersuchungen der Surfactantfunktion aus BAL-Material zeigten eine weitgehend erhaltene Funktion in der ET-Gruppe, während die oberflächenaktive Wirkung von Surfactant in der Kontrollgruppe inhibiert war (Friedrich et al., Manuskript eingereicht). In der contralateralen Lunge fanden sich bezüglich der klinisch-funktionellen Untersuchungen keine Unterschiede zwischen ET- und Kontrollgruppe. Dies wäre auch nicht zu erwarten gewesen, denn die funktionelle Einschränkung der contralateralen Lunge war auch in der Kontrollgruppe sehr gering ausgeprägt. Wenngleich noch nicht klinisch apparent, fanden sich jedoch deutliche Effekte der Ischämie und Reperfusion in der contralateralen Lunge in der Kontrollgruppe bezüglich der Ödementwicklung und der Permeabilität für Proteine. Hier offenbart sich dann ebenfalls der protektive Effekt der Endotoxintoleranz. Nach ET ist die Wasseransammlung in der Lunge und der intraalveoläre Proteingehalt geringer und folglich der Phospholipid/Proteinquotient höher als in der Kontrollgruppe.

Ein weiterer Effekt der Endotoxintoleranz ist die Verhinderung der pulmonalvaskulären Vasokonstriktion nach Reperfusion. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass der Anstieg des pulmonalvaskulären Widerstandes von der Ödementwicklung unabhängig ist. Über den Hintergrund dieser Beobachtung kann nur spekuliert werden, weil vasokonstriktorische

Substanzen im Blut, die den Anstieg des pulmonalvaskulären Gefäßbettes verursachen könnten, nicht gemessen wurden. Bekannte Vasokonstriktoren des pulmonalvaskulären Gefäßbettes sind Thromboxan A<sub>2</sub> und Endothelin, während eine Dilatation der Gefäße im wesentlichen durch die Freisetzung von NO und Prostazyklin reguliert wird. Weitere Studien sind notwendig um die Regulation des pulmonalen Gefäßbettes nach Ischämie und Reperfusion und den Einfluss der Endotoxintoleranz auf die Gefäßregulation zu untersuchen. Hämodynamisch waren die Tiere während des gesamten Versuches ohne Katecholamingabe stabil. In der Kontrollgruppe, aber nicht in der ET-Gruppe, zeigte sich jedoch nach Öffnen der Abklemmung ein Widerstandsverlust der Gefäßperipherie, der als Abfall des SVRI dokumentiert wurde. Dieser Widerstandsverlust ist bei inflammatorischen Erkrankungen wie z.B. bei der Sepsis bekannt und wird als Folge der Ausschüttung vasoaktiver Mediatoren interpretiert. Das Ausbleiben dieser Reaktion spricht für den protektiven Effekt der Endotoxintoleranz und der verminderten Freisetzung inflammatorischer Mediatoren.

Die vorliegende Studie ist die erste, die den Einfluss der Endotoxintoleranz auf Ischämie und Reperfusion der Lunge untersucht hat, wodurch ein Vergleich mit anderen Studien nicht möglich ist. In anderen Organsystemen wie der Niere fanden Heemann et al. durch Anwendung der ET eine Reduktion der Letalität nach Ischämie und Reperfusion im Mausmodell von 100% auf 25% (124). Histologisch fand sich eine verminderte Leukozytenzahl in den reperfundierten Nieren und eine geringere Zahl apoptotischer Nierenzellen nach ET. Weiterhin war der Kreatininwert im Blut und die Häufigkeit von Nierenversagen in der ET-Gruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Auch nach Ischämie und Reperfusion des Gehirns konnten protektive Effekte der ET gefunden werden. In einem Ischämiemodell an Ratten, fanden Toyoda et al. nach Vorbehandlung mit DPL, einem nichttoxischen Derivat von Lipid A, kleinere zerebrale Infarkte (161). In der ET-Gruppe war die SOD-Aktivität im Infarktbereich erhöht und die Myeloperoxidase-Aktivität verringert. In einem myocardialen Infarktmodell am Kaninchen konnte eine Verringerung der Infarktgröße gezeigt werden. Ischämie und Reperfusion führten zu einer Zunahme der TNF Serumspiegel in der Kontrollgruppe, nicht aber in der Behandlungsgruppe. Belosjorow et al. erklärten dieses Phänomen mit erhöhter TNF-hemmender Aktivität nach LPS-Vorbehandlung (103). Flohe et al. fanden in einem Rattenmodell, dass eine LPS-Vorbehandlung bei nachfolgendem Endotoxinschock verringerte TNF-alpha mRNA Spiegel in Lungen- und Lebergewebe zur Folge hatte (127). In einer ausführlichen Studie zeigte Salkowski et al. in einem Sepsis-Modell eine Verminderung der Genexpression proinflammatorischer Zytokine wie TNF-alpha, Il-6 und G-CSF in der ET-Gruppe (125). Allerdings

waren bei dieser Untersuchung nicht nur die Expression pro-inflammatorischer, sondern auch die anti-inflammatorischer Zytokine vermindert.

Endotoxintoleranz ist ein potentes Regimen um Ischämie und Reperfusionsschäden an der Lunge zu reduzieren. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt. Eine weitere Aufklärung dieser Mechanismen könnte zu Substanzen führen, die eine neue Möglichkeit zur Therapie von Ischämie/Reperfusionsschäden eröffnen.

## **4.6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK**

Das primäre Transplantatversagen nach Lungentransplantation ist wesentlich auf den sich entwickelnden Ischämie/Reperfusionsschaden zurückzuführen und stellt die Haupttodesursache im frühpostoperativen Verlauf dar. Ischämie und Reperfusion führt zu einer Zellaktivierung mit Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine. Diese pro-inflammatorische Antwort akzeleriert die Zell- und Gewebeschädigung. Neben einer Vasokonstriktion kommt es zu einer ausgeprägten Permeabilitätsstörung im reperfundierten Organ, die sich entwickelnde Permeabilitätsstörung bewirkt neben der interstitiellen Flüssigkeitsansammlung einen Einstrom von Plasmaproteinen in den alveolären Raum. Dies führt zur Inaktivierung des Surfactantsystems und dadurch zur Atelektasenbildung. Klinische Folgen sind: Hypoxämie, Notwendigkeit aggressiver Beatmung und Rechtsherzbelastung. In einem Lungentransplantationsmodell und einem Ischämiemodell am Hund wurden Parameter wie Gasaustausch, pulmonale Compliance, wet/dry-ratio, intraalveolärer Proteingehalt, TNF-alpha Expression in der Lunge und den BAL-Zellen sowie funktionelle und biochemische Surfactantuntersuchungen durchgeführt. In mehreren Versuchsreihen wurde der Einfluss von Surfactantinstillation, ischämischer Präkonditionierung und Induktion von Endotoxintoleranz auf diese Parameter im Vergleich zur Kontrollgruppe untersucht. Durch die intratracheale Gabe von Surfactant war es möglich eine annähernde Normalisierung von Gasaustausch und Compliance zu erzielen. Die inflammatorischen Reaktionen blieben hiervon allerdings unberührt. Eine ischämische Präkonditionierung von 5 Minuten, mit 15 minütiger Reperfusion, war im Gegensatz zu einem Protokoll von 2 konsekutiven, 10-minütigen ischämischen Präkonditionierungsphasen in der Lage die Lungenfunktion signifikant zu verbessern. Auch die Induktion von Endotoxintoleranz vor Ischämie und Reperfusion konnte die Lungenfunktion weitgehend erhalten. Die molekularen Hintergründe beider Prinzipien sind derzeit weitgehend unverstanden. Bisher konnten keine sicheren Risikofaktoren für die Entwicklung eines Reperfusionsschadens nach Lungentransplantation gefunden werden. Zukünftige Strategien sollten in folgende Richtungen abzielen: 1. Verbesserung der Lungenkonservierung: Studien konnte zeigen, dass nach

Verwendung von low potassium dextrane (LPD)-Lösungen das Auftreten von Ischämie und Reperfusionsschäden vermindert werden konnte. Auch die Konservierungstemperatur von 10°C ist - experimentellen Studien zufolge - der Konservierungstemperatur von 4°C überlegen. 2. Bei eingetretenem Reperfusionsschaden sollte eine symptomatische Therapie mit Instillation von Surfactant und NO bzw. Prostazyklin per inhalationem erfolgen. Die Gabe von C1-Esterase-Inhibitor scheint in der Frühphase ein erfolgversprechender Therapieansatz zu sein das inflammatorische Geschehen zu begrenzen. 3. Die Einflussnahme auf die komplexen, der Entwicklung eines Ischämie/Reperfusionsschadens zu Grunde liegenden, immunologischen Vorgänge könnten für die Zukunft erfolgversprechende Ansätze darstellen. Sowohl die Gentransfektion der Transplantatlunge mit IL-10 als anti-inflammatorisch wirksamen Zytokin, als auch die Induktion von HSP-70 waren in experimentellen Ansätzen in der Lage die Permeabilitätsstörung in der reperfundierten Lunge zu vermindern. Auch die molekularen Mechanismen, auf denen die Wirksamkeit einer ischämischen Präkonditionierung oder einer Induktion von Endotoxintoleranz beruht, könnten durch eine gezieltes Eingreifen zur Organprotektion beitragen. Dies setzt allerdings ein Verständnis der zellulären Regulation von pro- und anti-inflammatorischen Prozessen voraus, von dem wir zur Zeit noch weit entfernt sind.

## **5 LITERATURVERZEICHNIS**

1. Grover, F. L., D. A. Fullerton, M. R. Zamora, C. Mills, B. Ackerman, D. Badesch, J. M. Brown, D. N. Campbell, P. Chetham, A. Dhaliwal, M. Diercks, T. Kinnard, K. Niejadlik, and M. Ochs. 1997.  
The past, present, and future of lung transplantation.  
Am J Surg 173(6):523-33.
2. Hardy, J. D. 1999.  
The first lung transplant in man (1963) and the first heart transplant in man (1964).  
Transplant Proc 31(1-2):25-9.
3. Konstantinov, I. E. 1998.  
A mystery of Vladimir P. Demikhov: the 50th anniversary of the first intrathoracic transplantation.  
Ann Thorac Surg 65(4):1171-7.
4. Shumacker, H. B., Jr. 1994.  
A surgeon to remember: notes about Vladimir Demikhov.  
Ann Thorac Surg 58(4):1196-8.
5. Herrera, J. M., K. McNeil, F. Wells, and J. Wallwork. 1999.  
[Lung transplantation at the Papworth Hospital: 9-year experience].  
Arch Bronconeumol 35(2):64-70.
6. Peters, S. G., J. C. McDougall, J. P. Scott, D. E. Midthun, and S. G. Jowsey. 1997.  
Lung transplantation: selection of patients and analysis of outcome.  
Mayo Clin Proc 72(1):85-8.
7. ASTP. 1998.  
International guidelines for the selection of lung transplant candidates. The American Society for Transplant Physicians (ASTP)/American Thoracic Society(ATS)/European Respiratory Society(ERS)/International Society for Heart and Lung Transplantation(ISHLT).  
Am J Respir Crit Care Med 158(1):335-9.
8. Wood, D. E., and G. Raghu. 1996.  
Lung transplantation. Part I. Indications and operative management.  
West J Med 165(6):355-63.
9. Wood, D. E., and G. Raghu. 1997.  
Lung transplantation. Part II. Postoperative management and results.  
West J Med 166(1):45-55.
10. Haverich, A. 1999.  
Experience with lung transplantation.  
Ann Thorac Surg 67(2):305-12.
11. Fisher, A. B., L. Furia, and B. Chance. 1976.  
Evaluation of redox state of isolated perfused rat lung.  
Am J Physiol 230(5):1198-1204.
12. Pearse, D. B., and E. M. Wagner. 1994.  
Role of the bronchial circulation in ischemia-reperfusion lung injury.  
J Appl Physiol 76(1):259-65.

13. Kloner, R. A., R. E. Rude, N. Carlson, P. R. Maroko, L. W. DeBoer, and E. Braunwald. 1980. Ultrastructural evidence of microvascular damage and myocardial cell injury after coronary artery occlusion: which comes first? *Circulation* 62(5):945-52.
14. Robin, E. D., and J. Theodore. 1982. Are there ischemic lung diseases? *Arch Intern Med* 142(10):1791-3.
15. Hooper, T. L., T. J. Locke, G. Fetherston, P. A. Flecknell, and C. G. McGregor. 1990. Comparison of cold flush perfusion with modified blood versus modified Euro-Collins solution for lung preservation. *J Heart Transplant* 9(4):429-34.
16. Locke, T. J., T. L. Hooper, P. A. Flecknell, and C. G. McGregor. 1991. Preservation of the lung: comparison of flush perfusion with cold modified blood and core cooling by cardiopulmonary bypass. *J Heart Lung Transplant* 10(1 Pt 1):1-8.
17. Xiong, L., M. Mazmanian, A. R. Chapelier, J. Reigner, M. Weiss, P. G. Darteville, and P. Herve. 1994. Lung preservation with Euro-Collins, University of Wisconsin, Wallwork, and low-potassium-dextran solution. Universite++ Paris-Sud Lung Transplant Group. *Ann Thorac Surg* 58(3):845-50.
18. Khimenko, P. L., T. M. Moore, L. W. Hill, P. S. Wilson, S. Coleman, A. Rizzo, and A. E. Taylor. 1995. Adenosine A2 receptors reverse ischemia-reperfusion lung injury independent of beta-receptors. *J Appl Physiol* 78(3):990-6.
19. Wysolmerski, R. B., and D. Lagunoff. 1990. Involvement of myosin light-chain kinase in endothelial cell retraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(1):16-20.
20. Grisham, M. B., L. A. Hernandez, and D. N. Granger. 1989. Adenosine inhibits ischemia-reperfusion-induced leukocyte adherence and extravasation. *Am J Physiol* 257(5 Pt 2):H1334-9.
21. Unruh, H., M. Hoppensack, and L. Oppenheimer. 1990. Vascular properties of canine lungs perfused with Eurocollins solution and prostacyclin. *Ann Thorac Surg* 49(2):292-8.
22. Date, H., A. Matsumura, J. K. Manchester, H. Obo, O. Lima, J. M. Cooper, S. Sundaresan, O. H. Lowry, and J. D. Cooper. 1993. Evaluation of lung metabolism during successful twenty-four-hour canine lung preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 105(3):480-91.
23. Steen, S., P. O. Kimblad, T. Sjoberg, L. Lindberg, R. Ingemansson, and G. Massa. 1994. Safe lung preservation for twenty-four hours with Perfadex. *Ann Thorac Surg* 57(2):450-7.
24. Wagner, F. M., S. W. Jamieson, J. Fung, P. Wolf, H. Reichenspurner, and M. P. Kaye. 1995. A new concept for successful long-term pulmonary preservation in a dog model. *Transplantation* 59(11):1530-6.

25. Muller, C., H. Furst, H. Reichenspurner, J. Briegel, J. Groh, and B. Reichart. 1999. Lung procurement by low-potassium dextran and the effect on preservation injury. Munich Lung Transplant Group. *Transplantation* 68(8):1139-43.
26. Wittwer, T., T. Wahlers, A. Fehrenbach, S. Elki, and A. Haverich. 1999. Improvement of pulmonary preservation with Celsior and Perfadex: impact of storage time on early post-ischemic lung function. *J Heart Lung Transplant* 18(12):1198-201.
27. Wang, L. S., K. Yoshikawa, S. Miyoshi, K. Nakamoto, C. M. Hsieh, F. Yamazaki, P. F. Guerreiro Cardoso, H. J. Schaeffers, J. Brito, S. H. Keshavjee, and et al. 1989. The effect of ischemic time and temperature on lung preservation in a simple ex vivo rabbit model used for functional assessment. *J Thorac Cardiovasc Surg* 98(3):333-42.
28. Date, H., O. Lima, A. Matsumura, H. Tsuji, D. A. d'Avignon, and J. D. Cooper. 1992. In a canine model, lung preservation at 10 degrees C is superior to that at 4 degrees C. A comparison of two preservation temperatures on lung function and on adenosine triphosphate level measured by phosphorus 31-nuclear magnetic resonance. *J Thorac Cardiovasc Surg* 103(4):773-80.
29. Bando, T., S. Kosaka, C. Liu, T. Hirai, T. Hirata, H. Yokomise, K. Yagi, K. Inui, S. Hitomi, and H. Wada. 1994. Effects of newly developed solutions containing trehalose on twenty- hour canine lung preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 108(1):92-8.
30. Nezu, K., K. Kushibe, T. Tojo, N. Sawabata, K. Kawachi, Y. Mizumoto, D. Nakae, Y. Konishi, and S. Kitamura. 1994. Protection against lipid peroxidation induced during preservation of lungs for transplantation. *J Heart Lung Transplant* 13(6):998-1002.
31. Egan, T. M., K. S. Ulicny, Jr., C. J. Lambert, Jr., and B. R. Wilcox. 1993. Effect of a free radical scavenger on cadaver lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 55(6):1453-9.
32. Roberts, C. S., M. H. Hennington, A. M. D'Armini, P. K. Griffith, J. J. Lemasters, and T. M. Egan. 1996. Donor lungs from ventilated cadavers: impact of a free radical scavenger. *J Heart Lung Transplant* 15(3):275-82.
33. Hachida, M., and D. L. Morton. 1988. The protection of ischemic lung with verapamil and hydralazine. *J Thorac Cardiovasc Surg* 95(2):178-83.
34. Corcoran, P. C., Y. Wang, N. M. Katz, S. S. Rajan, A. R. Analouei, M. L. Foegh, and R. B. Wallace. 1992. Platelet activating factor antagonist enhances lung preservation in a canine model of single lung allotransplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 104(1):66-72.
35. Reimer, K. A., M. Tanaka, C. E. Murry, V. J. Richard, and R. B. Jennings. 1990. Evaluation of free radical injury in myocardium. *Toxicol Pathol* 18(4):470-80.

36. Welbourn, C. R., G. Goldman, I. S. Paterson, C. R. Valeri, D. Shepro, and H. B. Hechtman. 1991. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg* 78(6):651-5.
37. King, R. C., O. A. Binns, F. Rodriguez, R. C. Kanithanon, T. M. Daniel, W. D. Spotnitz, C. G. Tribble, and I. L. Kron. 2000. Reperfusion injury significantly impacts clinical outcome after pulmonary transplantation. *Ann Thorac Surg* 69(6):1681-5.
38. Christie, J. D., J. E. Bavaria, H. I. Palevsky, L. Litzky, N. P. Blumenthal, L. R. Kaiser, and R. M. Kotloff. 1998. Primary graft failure following lung transplantation. *Chest* 114(1):51-60.
39. Khan, S. U., J. Salloum, P. B. O'Donovan, E. J. Mascha, A. C. Mehta, M. A. Matthay, and A. C. Arroliga. 1999. Acute pulmonary edema after lung transplantation: the pulmonary reimplantation response. *Chest* 116(1):187-94.
40. Sleiman, C., H. Mal, M. Fournier, J. P. Duchatelle, P. Icard, O. Groussard, G. Jebrak, J. L. Mollo, O. Raffy, C. Roue, and et al. 1995. Pulmonary reimplantation response in single-lung transplantation. *Eur Respir J* 8(1):5-9.
41. Kaplan, J. D., E. P. Trulock, J. D. Cooper, and D. P. Schuster. 1992. Pulmonary vascular permeability after lung transplantation. A positron emission tomographic study. *Am Rev Respir Dis* 145(4 Pt 1):954-7.
42. Gammie, J. S., D. R. Stukus, S. M. Pham, B. G. Hattler, M. F. McGrath, K. R. McCurry, B. P. Griffith, and R. J. Keenan. 1999. Effect of ischemic time on survival in clinical lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 68(6):2015-9; discussion 2019-20.
43. Shackleton, C. R., S. L. Ettinger, M. G. McLoughlin, C. H. Scudamore, R. R. Miller, and P. A. Keown. 1990. Effect of recovery from ischemic injury on class I and class II MHC antigen expression. *Transplantation* 49(3):641-4.
44. Adoumie, R., C. Serrick, A. Giaid, and H. Shennib. 1992. Early cellular events in the lung allograft. *Ann Thorac Surg* 54(6):1071-6; discussion 1076-7.
45. Fiser, S. M., C. G. Tribble, S. M. Long, A. K. Kaza, J. A. Kern, D. R. Jones, M. K. Robbins, and I. L. Kron. 2002. Ischemia-reperfusion injury after lung transplantation increases risk of late bronchiolitis obliterans syndrome. *Ann Thorac Surg* 73(4):1041-7; discussion 1047-8.
46. King-Biggs, M. B. 1997. Acute pulmonary allograft rejection. Mechanisms, diagnosis, and management. *Clin Chest Med* 18(2):301-10.
47. Wahlers, T., A. Haverich, H. J. Schafers, S. W. Hirt, H. G. Fieguth, M. Jurmann, C. Zink, and H. G. Borst. 1993. Chronic rejection following lung transplantation. Incidence, time pattern and consequences. *Eur J Cardiothorac Surg* 7(6):319-23.



48. Brock, R. W., D. K. Lawlor, K. A. Harris, and R. F. Potter. 1999. Initiation of remote hepatic injury in the rat: interactions between Kupffer cells, tumor necrosis factor-alpha, and microvascular perfusion. *Hepatology* 30(1):137-42.
49. Horgan, M. J., H. Lum, and A. B. Malik. 1989. Pulmonary edema after pulmonary artery occlusion and reperfusion. *Am Rev Respir Dis* 140(5):1421-8.
50. Obertacke, U., F. Neudeck, M. Majetschak, A. Hellinger, C. Kleinschmidt, F. U. Schade, K. Hogasen, M. Jochum, W. Strohmeier, M. Thurnher, H. Redl, and G. Schlag. 1998. Local and systemic reactions after lung contusion: an experimental study in the pig. *Shock* 10(1):7-12.
51. Palazzo, R., A. Hamvas, T. Shuman, L. Kaiser, J. Cooper, and D. P. Schuster. 1992. Injury in nonischemic lung after unilateral pulmonary ischemia with reperfusion. *J Appl Physiol* 72(2):612-20.
52. Watanabe, A., N. Kawaharada, K. Kusajima, S. Komatsu, and H. Takahashi. 1996. Contralateral lung injury associated with single-lung ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 62(6):1644-9.
53. Al-Mehdi, A. B., and A. B. Fisher. 1998. Invited editorial on "tumor necrosis factor-alpha in ischemia and reperfusion injury in rat lungs". *J Appl Physiol* 85(6):2003-4.
54. Pham, S. M., Y. Yoshida, R. Aeba, B. G. Hattler, Y. Iwaki, A. Zeevi, R. L. Hardesty, and B. P. Griffith. 1992. Interleukin-6, a marker of preservation injury in clinical lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 11(6):1017-24.
55. Strieter, R. M., A. E. Koch, V. B. Antony, R. B. Fick, Jr., T. J. Standiford, and S. L. Kunkel. 1994. The immunopathology of chemotactic cytokines: the role of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1. *J Lab Clin Med* 123(2):183-97.
56. Smart, S. J., and T. B. Casale. 1994. TNF-alpha-induced transendothelial neutrophil migration is IL-8 dependent. *Am J Physiol* 266(3 Pt 1):L238-45.
57. De Perrot, M., Y. Sekine, S. Fischer, T. K. Waddell, K. McRae, M. Liu, D. A. Wigle, and S. Keshavjee. 2002. Interleukin-8 release during early reperfusion predicts graft function in human lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 165(2):211-5.
58. Geng, J. G., M. P. Bevilacqua, K. L. Moore, T. M. McIntyre, S. M. Prescott, J. M. Kim, G. A. Bliss, G. A. Zimmerman, and R. P. McEver. 1990. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* 343(6260):757-60.
59. Issekutz, A. C., and N. Lopes. 1993. Endotoxin activation of endothelium for polymorphonuclear leucocyte transendothelial migration and modulation by interferon-gamma. *Immunology* 79(4):600-7.

60. Springer, T. A. 1995.  
Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration.  
*Annu Rev Physiol* 57:827-72.
61. Albelda, S. M., W. A. Muller, C. A. Buck, and P. J. Newman. 1991.  
Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule.  
*J Cell Biol* 114(5):1059-68.
62. Granger, D. N., J. N. Benoit, M. Suzuki, and M. B. Grisham. 1989.  
Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia-reperfusion.  
*Am J Physiol* 257(5 Pt 1):G683-8.
63. Suzuki, M., W. Inauen, P. R. Kvietys, M. B. Grisham, C. Meininger, M. E. Schelling, H. J. Granger, and D. N. Granger. 1989.  
Superoxide mediates reperfusion-induced leukocyte-endothelial cell interactions.  
*Am J Physiol* 257(5 Pt 2):H1740-5.
64. Petrone, W. F., D. K. English, K. Wong, and J. M. McCord. 1980.  
Free radicals and inflammation: superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma.  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 77(2):1159-63.
65. Kubes, P., M. Suzuki, and D. N. Granger. 1991.  
Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion.  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 88(11):4651-5.
66. Dittmer, H., M. Jochum, and H. Fritz. 1986.  
[Release of granulocytic elastase and plasma protein changes in traumatic hemorrhagic shock].  
*Unfallchirurg* 89(4):160-9.
67. McDonald, J. A., B. J. Baum, D. M. Rosenberg, J. A. Kelman, S. C. Brin, and R. G. Crystal. 1979.  
Destruction of a major extracellular adhesive glycoprotein (fibronectin) of human fibroblasts by neutral proteases from polymorphonuclear leukocyte granules.  
*Lab Invest* 40(3):350-7.
68. Havemann, K., and M. Gramse. 1984.  
Physiology and pathophysiology of neutral proteinases of human granulocytes.  
*Adv Exp Med Biol* 167:1-20.
69. Zaslów, M. C., R. A. Clark, P. J. Stone, J. D. Calore, G. L. Snider, and C. Franzblau. 1983.  
Human neutrophil elastase does not bind to alpha 1-protease inhibitor that has been exposed to activated human neutrophils.  
*Am Rev Respir Dis* 128(3):434-9.
70. Klebanoff, S. J. 1980.  
Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes.  
*Ann Intern Med* 93(3):480-9.
71. Thomas, E. L., M. B. Grisham, and M. M. Jefferson. 1986.  
Cytotoxicity of chloramines.  
*Methods Enzymol* 132:585-93.
72. Morris, S. M., Jr., and T. R. Billiar. 1994.  
New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis.  
*Am J Physiol* 266(6 Pt 1):E829-39.

73. Anggard, E. 1994.  
Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine.  
*Lancet* 343(8907):1199-206.
74. Peng, H. B., P. Libby, and J. K. Liao. 1995.  
Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B.  
*J Biol Chem* 270(23):14214-9.
75. Bonfoco, E., D. Krainc, M. Ankarcrona, P. Nicotera, and S. A. Lipton. 1995.  
Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures.  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 92(16):7162-6.
76. Sarih, M., V. Souvannavong, and A. Adam. 1993.  
Nitric oxide synthase induces macrophage death by apoptosis.  
*Biochem Biophys Res Commun* 191(2):503-8.
77. Kourembanas, S., P. A. Marsden, L. P. McQuillan, and D. V. Faller. 1991.  
Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium.  
*J Clin Invest* 88(3):1054-7.
78. Gunther, A., C. Siebert, R. Schmidt, S. Ziegler, F. Grimminger, M. Yabut, B. Temmesfeld, D. Walmrath, H. Morr, and W. Seeger. 1996.  
Surfactant alterations in severe pneumonia, acute respiratory distress syndrome, and cardiogenic lung edema.  
*Am J Respir Crit Care Med* 153(1):176-84.
79. Gregory, T. J., W. J. Longmore, M. A. Moxley, J. A. Whitsett, C. R. Reed, A. A. Fowler, 3rd, L. D. Hudson, R. J. Maunder, C. Crim, and T. M. Hyers. 1991.  
Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome.  
*J Clin Invest* 88(6):1976-81.
80. Jobe, A. H., and M. Ikegami. 1998.  
Surfactant and acute lung injury.  
*Proc Assoc Am Physicians* 110(6):489-95.
81. Gregory, T. J., K. P. Steinberg, R. Spragg, J. E. Gadek, T. M. Hyers, W. J. Longmore, M. A. Moxley, G. Z. Cai, R. D. Hite, R. M. Smith, L. D. Hudson, C. Crim, P. Newton, B. R. Mitchell, and A. J. Gold. 1997.  
Bovine surfactant therapy for patients with acute respiratory distress syndrome.  
*Am J Respir Crit Care Med* 155(4):1309-15.
82. Walmrath, D., A. Gunther, H. A. Ghofrani, R. Schermuly, T. Schneider, F. Grimminger, and W. Seeger. 1996.  
Bronchoscopic surfactant administration in patients with severe adult respiratory distress syndrome and sepsis.  
*Am J Respir Crit Care Med* 154(1):57-62.
83. Nieman, G. F., L. A. Gatto, A. M. Paskanik, B. Yang, R. Fluck, and A. Picone. 1996.  
Surfactant replacement in the treatment of sepsis-induced adult respiratory distress syndrome in pigs.  
*Crit Care Med* 24(6):1025-33.
84. Fracica, P. J., S. P. Caminiti, C. A. Piantadosi, F. G. Duhaylongsod, J. D. Crapo, and S. L. Young. 1994.  
Natural surfactant and hyperoxic lung injury in primates. II. Morphometric analyses.  
*J Appl Physiol* 76(3):1002-10.

85. Bachurski, C. J., G. S. Pryhuber, S. W. Glasser, S. E. Kelly, and J. A. Whitsett. 1995. Tumor necrosis factor-alpha inhibits surfactant protein C gene transcription. *J Biol Chem* 270(33):19402-7.
86. Hertzog, J. H., M. H. Godinez, and R. I. Godinez. 1994. Tumor necrosis factor-alpha alters phospholipid content in the bronchoalveolar lavage-accessible space of isolated perfused rat lungs. *Crit Care Med* 22(12):1969-75.
87. Wispe, J. R., J. C. Clark, B. B. Warner, D. Fajardo, W. E. Hull, R. B. Holtzman, and J. A. Whitsett. 1990. Tumor necrosis factor-alpha inhibits expression of pulmonary surfactant protein. *J Clin Invest* 86(6):1954-60.
88. Erasmus, M. E., A. H. Petersen, S. B. Oetomo, and J. Prop. 1994. The function of surfactant is impaired during the reimplantation response in rat lung transplants. *J Heart Lung Transplant* 13(5):791-802.
89. Erasmus, M. E., A. H. Petersen, G. Hofstede, H. P. Haagsman, S. Bambang Oetomo, and J. Prop. 1996. Surfactant treatment before reperfusion improves the immediate function of lung transplants in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 153(2):665-70.
90. Hohlfeld, J. M., M. Struber, K. Ahlf, M. M. Hoepfer, S. Fraund, N. Krug, G. Warnecke, W. Harringer, A. Haverich, and H. Fabel. 1999. Exogenous surfactant improves survival and surfactant function in ischaemia-reperfusion injury in minipigs. *Eur Respir J* 13(5):1037-43.
91. Novick, R. J., R. A. Veldhuizen, F. Possmayer, J. Lee, D. Sandler, and J. F. Lewis. 1994. Exogenous surfactant therapy in thirty-eight hour lung graft preservation for transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 108(2):259-68.
92. Ochs, M., H. Fehrenbach, I. Nenadic, T. Bando, A. Fehrenbach, D. Schepelmann, J. M. Albes, T. Wahlers, and J. Richter. 2000. Preservation of intraalveolar surfactant in a rat lung ischaemia/reperfusion injury model. *Eur Respir J* 15(3):526-31.
93. Veldhuizen, R. A., J. Lee, D. Sandler, W. Hull, J. A. Whitsett, J. Lewis, F. Possmayer, and R. J. Novick. 1993. Alterations in pulmonary surfactant composition and activity after experimental lung transplantation. *Am Rev Respir Dis* 148(1):208-15.
94. Murry, C. E., R. B. Jennings, and K. A. Reimer. 1986. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74(5):1124-36.
95. Walker, D. M., J. M. Walker, and D. M. Yellon. 1993. Global myocardial ischemia protects the myocardium from subsequent regional ischemia. *Cardioscience* 4(4):263-6.
96. Shiki, K., and D. J. Hearse. 1987. Preconditioning of ischemic myocardium: reperfusion-induced arrhythmias. *Am J Physiol* 253(6 Pt 2):H1470-6.

97. Jennings, R. B., C. E. Murry, and K. A. Reimer. 1991.  
Energy metabolism in preconditioned and control myocardium: effect of total ischemia.  
*J Mol Cell Cardiol* 23(12):1449-58.
98. Wolfe, C. L., R. E. Sievers, F. L. Visseren, and T. J. Donnelly. 1993.  
Loss of myocardial protection after preconditioning correlates with the time course of glycogen recovery within the preconditioned segment.  
*Circulation* 87(3):881-92.
99. Peralta, C., N. Prats, C. Xaus, E. Gelpi, and J. Rosello-Catafau. 1999.  
Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in the rat.  
*Hepatology* 30(6):1481-9.
100. Hiratsuka, M., M. Yano, B. N. Mora, I. Nagahiro, J. D. Cooper, and G. A. Patterson. 1998.  
Heat shock pretreatment protects pulmonary isografts from subsequent ischemia-reperfusion injury.  
*J Heart Lung Transplant* 17(12):1238-46.
101. Hiratsuka, M., B. N. Mora, M. Yano, T. Mohanakumar, and G. A. Patterson. 1999.  
Gene transfer of heat shock protein 70 protects lung grafts from ischemia-reperfusion injury.  
*Ann Thorac Surg* 67(5):1421-7.
102. Cochrane, J., B. T. Williams, A. Banerjee, A. H. Harken, T. J. Burke, C. B. Cairns, and J. I. Shapiro. 1999.  
Ischemic preconditioning attenuates functional, metabolic, and morphologic injury from ischemic acute renal failure in the rat.  
*Ren Fail* 21(2):135-45.
103. Belosjorow, S., R. Schulz, H. Dorge, F. U. Schade, and G. Heusch. 1999.  
Endotoxin and ischemic preconditioning: TNF-alpha concentration and myocardial infarct development in rabbits.  
*Am J Physiol* 277(6 Pt 2):H2470-5.
104. Du, Z. Y., M. Hicks, D. Winlaw, P. Spratt, and P. Macdonald. 1996.  
Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in the rat.  
*J Heart Lung Transplant* 15(12):1258-67.
105. Heyman, A. 1945.  
The treatment of neurosyphilis by continous infusion of typhoid vaccine.  
*Vener Dis Inform* 26:51-57.
106. Shear, M. J., and A. Perrault. 1944.  
Chemical treatment of tumors. Reactions of mice with primary tumors to injections of hemorrhage-producing bacterial polysaccharide.  
*J.Natl.CancerInst.* 4:461-476.
107. Beeson, P. B. 1946.  
Development of tolerance to typhoid bacterial pyrogen and its abolition by reticulo-endothelial bockade.  
*Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 61:248-250.
108. Greisman, S. E., E. J. Young, and F. A. Carozza, Jr. 1969.  
Mechanisms of endotoxin tolerance. V. Specificity of the early and late phases of pyrogenic tolerance.  
*J Immunol* 103(6):1223-36.
109. Roth, J., J. L. McClellan, M. J. Kluger, and E. Zeisberger. 1994.  
Attenuation of fever and release of cytokines after repeated injections of lipopolysaccharide in guinea-pigs.  
*J Physiol* 477(Pt 1):177-85.

110. Freedman, H. H. 1960.  
Passive transfer of tolerance to pyrogenicity of bacterial endotoxin.  
*J.Exp.Med* 111:453-463.
111. Berg, D. J., R. Kuhn, K. Rajewsky, W. Muller, S. Menon, N. Davidson, G. Grunig, and D. Rennick. 1995.  
Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance.  
*J Clin Invest* 96(5):2339-47.
112. Lazar, G., Jr., G. Lazar, and M. K. Agarwal. 1992.  
Modification of septic shock in mice by the antigluco-corticoid RU 38486.  
*Circ Shock* 36(3):180-4.
113. Mathison, J., E. Wolfson, S. Steinemann, P. Tobias, and R. Ulevitch. 1993.  
Lipopolysaccharide (LPS) recognition in macrophages. Participation of LPS-binding protein and CD14 in LPS-induced adaptation in rabbit peritoneal exudate macrophages.  
*J Clin Invest* 92(4):2053-9.
114. Schade, F. U., J. Schlegel, K. Hofmann, H. Brade, and R. Flach. 1996.  
Endotoxin-tolerant mice produce an inhibitor of tumor necrosis factor synthesis.  
*Journal of Endotoxin Research* 3:455-465.
115. Szabo, C., C. Thiemermann, C. C. Wu, M. Perretti, and J. R. Vane. 1994.  
Attenuation of the induction of nitric oxide synthase by endogenous glucocorticoids accounts for endotoxin tolerance in vivo.  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 91(1):271-5.
116. Blackwell, T. S., T. R. Blackwell, and J. W. Christman. 1997.  
Impaired activation of nuclear factor-kappaB in endotoxin-tolerant rats is associated with down-regulation of chemokine gene expression and inhibition of neutrophilic lung inflammation.  
*J Immunol* 158(12):5934-40.
117. Ziegler-Heitbrock, H. W., A. Wedel, W. Schraut, M. Strobel, P. Wendelgass, T. Sternsdorf, P. A. Bauerle, J. G. Haas, and G. Riethmuller. 1994.  
Tolerance to lipopolysaccharide involves mobilization of nuclear factor kappa B with predominance of p50 homodimers.  
*J Biol Chem* 269(25):17001-4.
118. Calabrese, V., A. Copani, D. Testa, A. Ravagna, F. Spadaro, E. Tendi, V. G. Nicoletti, and A. M. Giuffrida Stella. 2000.  
Nitric oxide synthase induction in astroglial cell cultures: effect on heat shock protein 70 synthesis and oxidant/antioxidant balance.  
*J Neurosci Res* 60(5):613-22.
119. Lau, S. S., T. M. Griffin, and R. Mestrl. 2000.  
Protection against endotoxemia by HSP70 in rodent cardiomyocytes.  
*Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278(5):H1439-45.
120. Lush, C. W., G. Cepinskas, and P. R. Kvietys. 2000.  
LPS tolerance in human endothelial cells: reduced PMN adhesion, E-selectin expression, and NF-kappaB mobilization.  
*Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278(3):H853-61.

121. Tominaga, K., S. Saito, M. Matsuura, K. Funatogawa, H. Matsumura, and M. Nakano. 1999. Role of IFN-gamma on dissociation between nitric oxide and TNF/IL-6 production by murine peritoneal cells after restimulation with bacterial lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol* 66(6):974-80.
122. Astiz, M. E., D. C. Saha, C. M. Carpati, and E. C. Rackow. 1994. Induction of endotoxin tolerance with monophosphoryl lipid A in peritonitis: importance of localized therapy. *J Lab Clin Med* 123(1):89-93.
123. Carpati, C. M., M. E. Astiz, E. C. Rackow, J. W. Kim, Y. B. Kim, and M. H. Weil. 1992. Monophosphoryl lipid A attenuates the effects of endotoxic shock in pigs. *J Lab Clin Med* 119(4):346-53.
124. Heemann, U., A. Szabo, P. Hamar, V. Muller, O. Witzke, J. Lutz, and T. Philipp. 2000. Lipopolysaccharide pretreatment protects from renal ischemia/reperfusion injury : possible connection to an interleukin-6- dependent pathway. *Am J Pathol* 156(1):287-93.
125. Salkowski, C. A., G. Detore, A. Franks, M. C. Falk, and S. N. Vogel. 1998. Pulmonary and hepatic gene expression following cecal ligation and puncture: monophosphoryl lipid A prophylaxis attenuates sepsis-induced cytokine and chemokine expression and neutrophil infiltration. *Infect Immun* 66(8):3569-78.
126. Bahrami, S., Y. M. Yao, G. Leichtfried, H. Redl, G. Schlag, and F. E. Di Padova. 1997. Monoclonal antibody to endotoxin attenuates hemorrhage-induced lung injury and mortality in rats. *Crit Care Med* 25(6):1030-6.
127. Flohe, S., E. Dominguez Fernandez, M. Ackermann, T. Hirsch, J. Borgermann, and F. U. Schade. 1999. Endotoxin tolerance in rats: expression of TNF-alpha, IL-6, IL-10, VCAM- 1 AND HSP 70 in lung and liver during endotoxin shock. *Cytokine* 11(10):796-804.
128. Colletti, L. M., D. G. Remick, and D. A. Campbell, Jr. 1994. LPS pretreatment protects from hepatic ischemia/reperfusion. *J Surg Res* 57(3):337-43.
129. McDonough, K. H., M. E. Giaimo, and H. I. Miller. 1995. Effects of endotoxin on the guinea pig heart response to ischemia reperfusion injury. *Shock* 4(2):139-42.
130. Nelson, D. W., J. M. Brown, A. Banerjee, D. D. Bensard, K. B. Rogers, C. R. Locke-Winter, B. O. Anderson, and A. H. Harken. 1991. Pretreatment with a nontoxic derivative of endotoxin induces functional protection against cardiac ischemia/reperfusion injury. *Surgery* 110(2):365-9.
131. Yao, Z., J. L. Rasmussen, J. L. Hirt, D. A. Mei, G. M. Pieper, and G. J. Gross. 1993. Effects of monophosphoryl lipid A on myocardial ischemia/reperfusion injury in dogs. *J Cardiovasc Pharmacol* 22(4):653-63.
132. ARDS-network. 2000. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. *N Engl J Med* 342(18):1301-8.

133. Brinkmann, M., J. Borgermann, F. H. Splittgerber, J. Spillner, J. C. Reidemeister, O. Kuss, and I. Friedrich. 2002.  
Pulmonary blood flow is inhomogeneously reduced after Euro Collins- preservation and lung transplantation.  
*Ann Thorac Surg* 73(1):226-32.
134. Günther, A., R. Schmidt, F. H. Splittgerber, J. Börgermann, M. Brinkmann, M. Yabut, J. C. Reidemeister, W. Seeger, and I. Friedrich. in press.  
Surfactant abnormalities after single lung transplantation in dogs- impact of bronchoscopic surfactant administration.  
*J Thorac Cardiovasc Surg*.
135. Li, G., S. Chen, W. Lou, and E. Lu. 1998.  
Protective effects of ischemic preconditioning on donor lung in canine lung transplantation.  
*Chest* 113(5):1356-9.
136. Li, G., S. Chen, E. Lu, and T. Hu. 1999.  
Protective effects of ischemic preconditioning on lung ischemia reperfusion injury: an in-vivo rabbit study.  
*Thorac Cardiovasc Surg* 47(1):38-41.
137. Sandhu, R., R. J. Diaz, G. D. Mao, and G. J. Wilson. 1997.  
Ischemic preconditioning: differences in protection and susceptibility to blockade with single-cycle versus multicycle transient ischemia.  
*Circulation* 96(3):984-95.
138. Cohen, M. V., X. M. Yang, and J. M. Downey. 1994.  
Conscious rabbits become tolerant to multiple episodes of ischemic preconditioning.  
*Circ Res* 74(5):998-1004.
139. Featherstone, R. L., D. J. Chambers, and F. J. Kelly. 2000.  
Ischemic preconditioning enhances recovery of isolated rat lungs after hypothermic preservation.  
*Ann Thorac Surg* 69(1):237-42.
140. Gasparri, R. I., N. C. Jannis, W. J. Flameng, T. E. Lerut, and D. E. Van Raemdonck. 1999.  
Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in the rabbit.  
*Eur J Cardiothorac Surg* 16(6):639-46.
141. Soncul, H., E. Oz, and S. Kalaycioglu. 1999.  
Role of ischemic preconditioning on ischemia-reperfusion injury of the lung.  
*Chest* 115(6):1672-7.
142. Friedrich, I., J. Spillner, E. X. Lu, M. Barnscheidt, O. Kuss, A. Sablotzki, F. U. Schade, and J. Borgermann. 2003.  
Induction of Endotoxin Tolerance Improves Lung Function after Warm Ischemia in Dogs.  
*Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284:224-231.
143. Hakim, T. S., R. Lisbona, R. P. Michel, and G. W. Dean. 1993.  
Role of vasoconstriction in gravity-nondependent central-peripheral gradient in pulmonary blood flow.  
*J Appl Physiol* 74(2):897-904.
144. Novick, R. J., J. MacDonald, R. A. Veldhuizen, F. Wan, J. Duplan, L. Denning, F. Possmayer, A. A. Gilpin, L. J. Yao, D. Bjarneson, and J. F. Lewis. 1996.  
Evaluation of surfactant treatment strategies after prolonged graft storage in lung transplantation.  
*Am J Respir Crit Care Med* 154(1):98-104.



145. Struber, M., J. M. Hohlfeld, T. Kofidis, G. Warnecke, J. Niedermeyer, S. P. Sommer, and A. Haverich. 2002.  
Surfactant function in lung transplantation after 24 hours of ischemia: advantage of retrograde flush perfusion for preservation.  
*J Thorac Cardiovasc Surg* 123(1):98-103.
146. Gunther, A., M. Kalinowski, A. Elssner, and W. Seeger. 1994.  
Clot-embedded natural surfactant: kinetics of fibrinolysis and surface activity.  
*Am J Physiol* 267(5 Pt 1):L618-24.
147. Seeger, W., U. Pison, R. Buchhorn, U. Obertacke, and T. Joka. 1990.  
Surfactant abnormalities and adult respiratory failure.  
*Lung* 168(Suppl):891-902.
148. Seeger, W., A. Günther, and C. Thede. 1992.  
Differential sensitivity to fibrinogen inhibition of SP-C- vs. SP-B- based surfactants.  
*Am J Physiol* 262(3 Pt 1):L286-91.
149. Seeger, W., C. Grube, A. Günther, and R. Schmidt. 1993.  
Surfactant inhibition by plasma proteins: differential sensitivity of various surfactant preparations.  
*Eur Respir J* 6(7):971-7.
150. Hayakawa, H., Q. N. Myrvik, and R. W. St Clair. 1989.  
Pulmonary surfactant inhibits priming of rabbit alveolar macrophage. Evidence that surfactant suppresses the oxidative burst of alveolar macrophage in infant rabbits.  
*Am Rev Respir Dis* 140(5):1390-7.
151. Zeligs, B. J., L. S. Nerurkar, and J. A. Bellanti. 1984.  
Chemotactic and candidacidal responses of rabbit alveolar macrophages during postnatal development and the modulating roles of surfactant in these responses.  
*Infect Immun* 44(2):379-85.
152. Catanzaro, A., P. Richman, S. Batchner, and M. Hallman. 1988.  
Immunomodulation by pulmonary surfactant.  
*J Lab Clin Med* 112(6):727-34.
153. Kremlev, S. G., T. M. Umstead, and D. S. Phelps. 1994.  
Effects of surfactant protein A and surfactant lipids on lymphocyte proliferation in vitro.  
*Am J Physiol* 267(4 Pt 1):L357-64.
154. Kimblad, P. O., K. Green, T. Sjöberg, and S. Steen. 1996.  
Prostanoid release after lung transplantation.  
*J Heart Lung Transplant* 15(10):999-1004.
155. Walmrath, D., F. Grimminger, D. Pappert, C. Knothe, U. Obertacke, A. Benzing, A. Gunther, T. Schmehl, H. Leuchte, and W. Seeger. 2002.  
Bronchoscopic administration of bovine natural surfactant in ARDS and septic shock: impact on gas exchange and haemodynamics.  
*Eur Respir J* 19(5):805-10.
156. Margolin, G., and J. S. Groeger. 2002.  
Ventilator-induced lung injury and its relationship to recruitment maneuvers.  
*Crit Care Med* 30(9):2161-2.
157. Dreyfuss, D., and G. Saumon. 1998.  
Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies.  
*Am J Respir Crit Care Med* 157(1):294-323.

158. Ricard, J. D., and D. Dreyfuss. 2001.  
Cytokines during ventilator-induced lung injury: a word of caution.  
*Anesth Analg* 93(2):251-2.
159. Ackermann, M., M. Reuter, S. Flohe, S. Bahrami, H. Redl, and F. U. Schade. 2001.  
Cytokine synthesis in the liver of endotoxin-tolerant and normal rats during hemorrhagic shock.  
*J Endotoxin Res* 7(2):105-12.
160. Suzuki, S., and L. H. Toledo-Pereyra. 1994.  
Interleukin 1 and tumor necrosis factor production as the initial stimulants of liver ischemia and reperfusion injury.  
*J Surg Res* 57(2):253-8.
161. Toyoda, T., N. F. Kassell, and K. S. Lee. 2000.  
Induction of tolerance against ischemia/reperfusion injury in the rat brain by preconditioning with the endotoxin analog diphosphoryl lipid A.  
*J Neurosurg* 92(3):435-41.

## **6 THESEN**

Bis zu 40% der Patienten entwickeln in der Frühphase nach Lungentransplantation eine Transplantatdysfunktion. Ursächlich wird ein Ischämie/Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) angenommen, zu keinen Risikofaktoren zugeordnet werden kann. Das klinische Bild ähnelt dem eines ARDS: Störung des Gasaustausches, Erniedrigung der pulmonalen Compliance, Erhöhung des pulmonalvaskulären Widerstandes sowie ein systemisch inflammatorisches Krankheitsbild. Das Vollbild des Reperfusionsschadens ist mit einer hohen Letalität verbunden und auch nach überstandener Akuterkrankung ergeben sich Hinweise auf ein vermehrtes Auftreten von potentiell letalen Spätschäden (Bronchiolitis obliterans) an der transplantierten Lunge.

In der vorliegenden Studie wurden verschiedene Aspekte des Transplantatversagens wie der gestörte Gasaustausch, die verminderte pulmonale Compliance, die vasomotorische Reaktion auf Ischämie und Reperfusion sowie eine dezidierte Analyse von Veränderungen der Komposition von Surfactantsubfraktionen und der biophysikalischen Surfactantfunktion untersucht.

### **A. Nach Ischämie und Reperfusion der Lunge besteht im pulmonalen Gefäßbett eine ausgeprägte Vasokonstriktion**

- ☞ Anstiege im pulmonalvaskulären Widerstand sind in den hilusfernen Regionen (apikal, dorsal und lateral) besonders ausgeprägt
- ☞ Das Ausmaß des pulmonalarteriellen Widerstandes ist von der Ödementwicklung unabhängig
- ☞ Die Veränderungen der pulmonalen Perfusion sind mit den klinischen Methoden der Intensivmedizin (Bestimmung des pulmonalarteriellen Widerstandes mit der Thermodilutionsmethode) nicht zu erfassen

### **B. Nach Ischämie und Reperfusion einer Lungenseite besteht in beiden Lungen eine Permeabilitätsstörung aber nur das reperfundierte Organ ist funktionell beeinträchtigt.**

- ☞ In der reperfundierten Lunge aber nicht im nativen Organ findet sich ein massiver Anstieg an polymorph neutrophilen Zellen und an Plasmaproteinen
- ☞ Die Störung des Gasaustausches ist in erster Linie auf den Einstrom von Plasmaproteinen zurückzuführen, die die Surfactantfunktion hemmen.

☞☞ Folglich findet sich nur in der reperfundierten Lunge eine Funktionsstörung während die native Lunge, trotz gleicher Ödementwicklung, kaum beeinträchtigt ist.

### **B. Die Permeabilitätsstörung nach I/R-Schaden mit dem Einstrom von Proteinen in das alveoläre Kompartiment inhibiert Surfactantfunktion und -metabolismus**

☞☞ Die biophysikalische Funktion des Surfactant ist im reperfundierten Organ fast vollständig aufgehoben

☞☞ Dies resultiert in einer verminderten pulmonalen Compliance, in Atelektasenbildung und schließlich einer ausgeprägten Störung des Gasaustausches

☞☞ Durch Surfactantapplikation lässt sich eine signifikante Verbesserung der Gasaustausches und der pulmonalen Compliance erreichen.

☞☞ Grundlage hierfür ist eine Normalisierung der Oberflächenspannung in der BAL aufgrund eines Überschusses an Phospholipiden im Vergleich zu eingeströmtem Protein (Erhöhung des PPQ)

☞☞ Das alveoläre leakage (intraalveolärer Proteingehalt, wet/dry-ratio) sowie der Influx von PMN in das alveoläre Kompartiment ist von der Instillation von Surfactant unbeeinflusst.

### **C. Die Verbesserung der Lungenfunktion nach I/R-Schaden durch ischämische Präkonditionierung (IPC) ist abhängig von Dauer und Anzahl der Zyklen der IPC**

☞☞ Ein IPC-Protokoll von 5 min. Ischämie und 15 min Reperfusion (IPC-5) verbessert signifikant Gasaustausch und Compliance der reperfundierten Lunge im Vergleich zur Kontrollgruppe aber auch im Vergleich zu 2 Zyklen 10 min Ischämie und 10 min. Reperfusion (IPC-10)

☞☞ IPC hat keinen Einfluß auf den Anstieg des pulmonal vaskulären Widerstand der reperfundierten Lunge

☞☞ Nach IPC-5 aber nicht nach IPC-10 ist der intraalveoläre Proteingehalt vermindert.

☞☞ Die Ödementwicklung in der Lunge ist von IPC unbeeinflusst

☞☞ Nach IPC-5 ist die TNF-alpha Freisetzung aus BAL-Zellen signifikant geringer als in der Kontrollgruppe.

#### **D. Die Induktion einer Endotoxintoleranz ist bei Hunden durch repetitive Gaben von Lipopolysaccharid möglich**

☞☞ Eine aufsteigende Dosis von LPS führt anfänglich zu einem Fieberanstieg, der trotz steigender Dosierung allmählich sinkt

☞☞ Nach anfänglich massivem Anstieg der TNF-alpha Freisetzung im peripheren Blut kommt es trotz weiterer LPS-Injektionen zu einem Rückgang der TNF-alpha Spiegel auf Normalwerte.

☞☞ Die zelluläre Antwort der Leukozyten bezüglich Anzahl und Differentialblutbild normalisiert sich ebenfalls.

#### **E. Endotoxintolerante Tiere sind ebenfalls toleranter gegenüber Ischämie und Reperfusion der Lunge als Kontrolltiere**

☞☞ In der ET-Gruppe sind Gasaustausch und pulmonale Compliance nach Ischämie/Reperfusion nur gering beeinträchtigt.

☞☞ Bei Endotoxintoleranten Tieren kommt es, anders als in der Kontrollgruppe, weder zum Abfall des system-vaskulären noch zum Anstieg des pulmonal-vaskulären Widerstandes.

☞☞ Die Permeabilität für Wasser und für Plasmaproteine sind in der Endotoxingruppe signifikant geringer als in der Kontrollgruppe.

☞☞ Der Phospholipid/Protein Quotient und die Surfactantfunktion sind in der ET-Gruppe nur gering beeinträchtigt.

## 7 ANHANG

### 7.1 LEBENS LAUF

Dr. med. Ivar Friedrich,  
geboren am 22.3.1961 in Würzburg

Familienstand: verheiratet mit Dr. med. Andrea Cseke-Friedrich,  
2 Kinder (Sarah 2.7.96 und Malte 20.7.98)

Schulbildung: 1967-1971 Grundschule in Dierdorf  
1971-1973 Martin Butzer Gymnasium Dierdorf  
1973-1978 Bodelschwingh Gymnasium Herchen  
1978-1981 Gymnasium Asterstein Koblenz

Zivildienst: 1982-1983 Rettungsdienst Arbeiter-Samariter-Bund  
Bonn

Studium: 1983-1985 Physik, Chemie  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
1985-1990 Medizinstudium an der  
Justus Liebig Universität Giessen  
3. Staatsexamen am 22.10.1990 (Note: gut)

Aulandaufenthalte: Sept. 1988 Famulatur am Ottawa Heart Institute, Canada  
Feb. 1990- Chirurgischer Abschnitt des prakt. Jahres  
Mai 1990 University of Texas Medical Branch Galverston, USA

Promotion: Experimentelle Untersuchungen zum Einfluß des alpha1-  
Proteaseninhibitors auf die durch aktivierte Granulozyten  
induzierte Permeabilitätsstörung am Modell der  
Kaninchenlunge. Giessen 1996  
Doktorvater: Prof. Dr. med. H. Neuhof

Berufsausbildung: 1990-1992 Arzt im Praktikum  
Klinik für Herz und Gefäßchirurgie  
Justus-Liebig-Universität Giessen  
Direktor: Prof. Dr. F.W. Hehrlein

Assistenzarzt/ ab 10/97 Funktionsoberarzt  
Klinik für Herz-Thorax- und Gefäßchirurgie  
Universität Essen  
Direktor: Prof. Dr. J.C. Reidemeister

Seit Oktober 1997 Facharzt für Herzchirurgie, seit 1996 Funktionsoberarzt und seit dem 1.3.1999  
Oberarzt in der Klinik für Herz- Thoraxchirurgie der Martin-Luther-Universität Halle

Weitere Qualifikationen: Fachkundenachweis Rettungsdienst  
Teilnahme am Kurs „Mastery of Mitral valve Repair“  
Teilnahme am Walter Brendel Kolleg für Transplantationsmedizin

## 7.2 ERKLÄRUNGEN

### **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Habilitationsschrift selbstständig angefertigt habe und versichere, daß ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Halle den 1.3.2003

gez. Ivar Friedrich

---

### **Erklärung über frühere Habilitationsversuche**

Hiermit erkläre ich, daß ich keine früheren Habilitationsversuche unternommen habe.

Halle, den 1.3.2003

gez. Ivar Friedrich

### 7.3 DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. J Christoph Reidemeister, der es mir möglich machte ein aufwändiges experimentelles Projekt zu etablieren und allen Beteiligten die Freiräume zur wissenschaftlichen Arbeit einräumte. Er hat sich stets mit hohem persönlichen Einsatz für unser Projekt stark gemacht und uns dadurch die Grundlage geschaffen, dies erfolgreich durchzuführen.

Ich danke Herrn Professor Silber, der meinen klinischen und wissenschaftlichen Werdegang ermöglichte und mir insbesondere während der ersten durchaus stürmischen Jahre in Halle immer eine sichere Orientierung gab. Er hat den Fortgang der Arbeit immer und in jeder Hinsicht unterstützt.

Meinem Freund Jochen Börgermann danke ich für die inzwischen seit vielen Jahren bestehende sehr enge Zusammenarbeit. Gemeinsam haben wir das gesamte Spektrum von Glück und Leid in der Herzchirurgie erlebt und dadurch wurde vieles erst erträglich oder möglich oder erfolgreich.

Meinem Freund Andreas Günther danke ich für sein physisches und psychisches Engagement insbesondere in der Anfangsphase des Projektes, seine Geduld und die Kraft mit der er mir all die Zeit zur Seite stand.

Herr Fred Splittgerber hat mich nicht nur angeleitet die operativen Techniken durchzuführen, er hat die gesamte experimentelle Phase meiner Arbeit begleitet und meine Publikationen redigiert. Er stand mir besonders während meiner schwierigen Anfängerzeiten als Operateur in der Klinik mit der Geduld und dem Verständnis eines ausgezeichneten Lehrers zur Seite und ist heute noch mein Vorbild.

Herrn Professor Ulrich Schade danke ich für seine großzügige Unterstützung in der Gestaltung und Durchführung zentraler Themen meiner Arbeit.

Weiterhin danke ich meinen Doktoranden Thomas Ley, Alexander Olk und Markus Barnscheid für ihren unermüdlichen Einsatz bei der Durchführung der Experimente.

Ich danke Herrn Professor Militzer und seinem Team des zentralen Tierlabors der Universität Essen für Ihren engagierten Einsatz und Ihre Hilfe bei der praktischen Durchführung der tierexperimentellen Studien.

Herrn Michael Buerke, Herrn Gerd Horneff und Herrn Andreas Simm danke ich für ihre kritischen Anmerkungen und die wertvolle Korrekturarbeit an dem vorliegenden Manuskript.

Meiner Frau, die sich in all den Jahren, zwar mit der notwendigen kritischen Distanz, aber immer in unerschütterlicher Treue jeweils vor, hinter oder neben mich gestellt hat, verdanke ich alle Kraft und Motivation für die vergangenen, gegenwärtigen und hoffentlich zukünftigen Projekte.