

### 3. Schrifttum

#### 3.1. Extrakorporale Zirkulation (EKZ)

##### 3.1.1. Geschichte der EKZ

Am 6. Mai 1953 führte Gibbon eine Operation eines Vorhofseptumdefektes mittels EKZ an einem achtzehnjährigen Mädchen durch. 1955 folgten Kirklin als Verfechter der Gibbonschen Methode und Lillelei, der erstmals einen Bubble Oxygenator von De Wall einsetzte (SOURNIA et al. 1981). Die moderne Ära der Herzchirurgie mit Einsatz der extrakorporalen Zirkulation hatte begonnen (GIBBON Jr. 1968, KIRKLIN 1956). Es bestand nun die Möglichkeit, Operationen am offenen, zeitweise stillgelegten Herzen durchzuführen. Dabei wurde frühzeitig erkannt, dass postoperative Komplikationen auftraten, die vermutlich durch die EKZ induziert waren, wobei Schädigungen unterschiedlicher Organsysteme festgestellt wurden. Als Folge dieser Organschäden starben zahlreiche Patienten, die mit Hilfe der EKZ am offenen Herzen operiert worden waren.

Bereits in der Anfangszeit wurde beschrieben, dass bei einigen Patienten postoperativ Fieber, Schmerzen, Pleuritis, Lungenversagen, Nierenversagen und andere Krankheiten auftraten.

Obwohl die Arbeitsgruppe KLOFF 1958 bereits eine generalisierte Entzündungsreaktion als mögliche Ursache diskutierte, wurde das Hauptaugenmerk anfänglich wesentlich auf mechanische Faktoren als Auslöser für die Komplikationen gerichtet (DODRILL 1958).

Es wurden Fehler in der Diagnose, in Operationstechniken, Komplikationen des kardiopulmonalen Bypasses, kardiovaskuläre Komplikationen und Lungenkomplikationen, sowie mangelhaftes Säure-Basen-Management, hämatologische Probleme, cerebrale Komplikationen und Komplikationen durch künstliche Herzklappen für die hohe Sterblichkeitsrate verantwortlich gemacht (ROSKY 1966 in UTLEY, 1996). 1969 beschrieb LEE (1969) eine Eiweißdenaturierung während der EKZ als mögliche Ursache und SOLIS (1975) beschrieb 1975 Mikroembolien.

Seit Anfang der 80iger Jahre wird als Ursache eine generalisierte Entzündungsreaktion vermutet. KIRKLIN (1983) und CHENOWETH (1981) konnten die Aktivierung des Komplement-Systems während der EKZ durch Kontakt von Blut mit der Fremd-

oberfläche der Herz-Lungen-Maschine nachweisen. WACHTFOGEL (1987) konnte eine Entzündungszell-Aktivität beweisen und schließlich fanden BUTLER (1993) und MOAT (1993) einen erhöhten Plasmaspiegel verschiedener Entzündungsmediatoren. Diese Forschungsergebnisse führten zur der Hypothese, dass durch die EKZ die pathophysiologischen Reaktionen einer generalisierten Entzündungsantwort des Organismus ausgelöst werden.

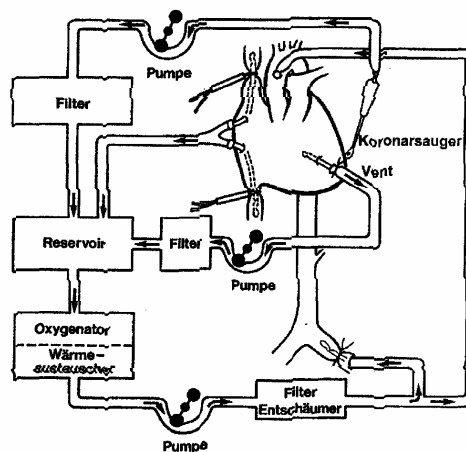
Heute ist die EKZ für die offene Herzchirurgie ein Standardverfahren mit geringem Risiko für den Durchschnittspatienten (KIRKLIN et al. 1987), dennoch gibt es eine kleine Patientengruppe, bei der es nach Einsatz der EKZ zu schwerwiegenden Organfunktionsstörungen bis hin zum Multiorganversagen kommen kann.

### 3.1.2. Die Herz-Lungen-Maschine (HLM)

Bei zahlreichen Herzoperationen, wie Herzklappenersatz, Rekonstruktion von Herzklappen, Korrektur kongenital bedingter Herzfehler, Eingriffen an der thorakalen Aorta und dem überwiegenden Anteil der Koronararterien-Bypasschirurgie, kommt die EKZ zum Einsatz, da diese Eingriffe nur am nicht schlagenden Herzen durchgeführt werden können. Die EKZ gewährleistet, dass Herz und Lunge vollständig aus dem Blutkreislauf genommen werden, ohne dass die Versorgung des Körpers mit Blut während der Operation unterbrochen ist (LARSEN 1987).

Die Abbildung 1 (modifiziert nach LARSEN 1987) zeigt das Schema der extrakorporalen Zirkulation:

**Abb. 1: Schema der extrakorporalen Zirkulation (modifiziert nach LARSEN 1987)**



Die Blutzirkulation unter EKZ:

Vor dem Eingriff wird das Blut heparinisiert, um eine Gerinnung zu vermeiden. Während der EKZ fließt das venöse Blut mittels Kanülen aus beiden Vv. cavae oder direkt aus dem rechten Vorhof (Etagen-Kanüle) passiv in ein Reservoir der Herz-Lungen-Maschine. Nach Anreicherung mit Sauerstoff und Elimination des Kohlendioxids wird das Blut über die Aorta oder die A. femoralis wieder in den Körper zurückgepumpt. Ein zwischengeschalteter Wärmeaustauscher kann das Blut nach Bedarf abkühlen oder erwärmen.

Zum Schutz des Herzens vor Überdehnung durch die vermehrte Blutansammlung bzw. zur Vermeidung großer Blutverluste wird ein Sauger in den linken Ventrikel oder Vorhof eingebracht, der sog. Vent. Zusammen mit einem Koronarsauger erfolgt das Absaugen des Blutes aus dem Operationsfeld in das Reservoir. Das Blut kann durch Mikrothromben und Latexpartikel verunreinigt sein, so dass eine Säuberung mittels eines Filters erforderlich ist.

Eine Myokardprotektion des stillstehenden Herzens wird durch Hypothermie und kardioplegische Lösungen gewährleistet.

Nach Beendigung der EKZ wird das Heparin im Blut durch Protamin antagonisiert.

### 3.2. Die Lunge

Die wesentliche Aufgabe der Lunge ist die Versorgung des Organismus mit Sauerstoff ( $O_2$ ) und die Elimination von Kohlendioxid ( $CO_2$ ). Die Ventilation garantiert hierbei die Belüftung der Alveolen mit  $O_2$  und den Abtransport von  $CO_2$ . In den Alveolen findet an der Blut-Luft-Schranke der Gasaustausch durch Diffusion statt. Voraussetzung hierfür ist eine ausreichende Lungenperfusion (LARSEN und ZIEGEGEBFUSS, 1997, BENZER et al. 1995, LARSEN, 1987). Der Gasfluss beruht auf einem intrapulmonalen Druckgradienten. Weitere Aufgaben der Lunge sind die metabolische Regulation, die Temperaturregulation und die Aufrechterhaltung des Wasserhaushaltes. Schließlich ist die Lunge als unspezifisches und spezifisches Abwehrorgan zu verstehen, das eng mit dem Immunsystem des Körpers verknüpft ist (SCHULZ 1991).

Die Lungenfunktion kann durch verschiedene Parameter bestimmt werden. Hierzu

gehören der pulmonale Gasaustausch mit dem Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) und dem Kohlendioxidpartialdruck ( $pCO_2$ ), die Alveolo-arterielle Sauerstoffdruckdifferenz ( $AaDO_2$ ), der intrapulmonale Rechts-Links-Shunt ( $Q_S/Q_T$ ), und die Compliance. Die Alveolo-arterielle Sauerstoffdruckdifferenz ist ein semiquantitatives Maß für den physiologischen Rechts-Links-Shunt. Sie gibt die Differenz zwischen alveolarem und arteriellem Sauerstoffpartialdruck an. Der intrapulmonale Rechts-Links-Shunt ist ein Maß für das Blut, welches nichtoxygeniert vom rechten in das linke Herz fließt. Der Normalwert liegt bei 3-5 % des Herzzeitvolumens. Die Compliance stellt ein Maß für die passive Dehnbarkeit von Lunge und Thorax dar (LARSEN und ZIEGENFUSS 1997, BENZER et al. 1995, LARSEN 1987).

Voraussetzung für einen physiologischen und ausreichenden Gasaustausch sind intakte Alveolen, sowie eine unversehrte alveolo-endotheliale Barriere. Sie besteht aus dem Kapillarendothel und den Alveolarzellen sowie den miteinander verschmolzenen Basallaminae beider Anteile (LEONHARDT 1990). Die Undurchlässigkeit dieser Barriere wird zu 90 % vom alveolären Epithel gewährleistet (THEODORE et al. 1975). Dieses Epithel setzt sich aus zwei Zelltypen zusammen: Pneumozyt Typ I (Alveolarepithelzelle), der den Hauptanteil der Alveolardeckzellen bildet und Pneumozyt Typ II, der das Surfactant produziert.

Die Alveolarepithelzellen sind durch die Zonula occludens miteinander verbunden (LEONHARDT 1990). Die Permeabilität für Wasser, Ionen und Makromoleküle ist unterschiedlich.

Unter physiologischen Bedingungen ist diese Barriere für Proteine kaum passierbar, so dass nur Spuren von Eiweiß in der Lavage einer gesunden Lunge nachgewiesen werden können.

Ein dünner Alveolarfilm liegt auf dem alveolären Epithel. Er wird „epithelial lining fluid“ (ELF) genannt. Das Surfactant, welches aus Phospholipiden besteht, bedeckt diesen Film und gewährleistet die Reduzierung der Oberflächenspannung am Luftflüssigkeits-Übergang (WEIBEL 1986). In der ELF befinden sich Zellen und flüssige Bestandteile. Zu den letztgenannten gehören Proteasen wie Elastase und Kollagenasen, Antiproteasen wie  $\alpha_1$ -Protease-Inhibitor,  $\alpha_2$ -Makroglobuline und tissue inhibitors of metalloproteases (TIMP), Sauerstoffradikale, Antioxidantien, Immunglobuline wie sekretorisches IgA und IgG und Cytokine wie IL-1, IL-8 und

TNF- $\alpha$ .

Der Alveolarfilm kann durch eine bronchoalveoläre Lavage aus der Lunge herausgespült werden, so dass eine Untersuchung des alveolären Kompartiments ermöglicht wird, in dem sich auch die zu untersuchenden MMP-2 und MMP-9 befinden.

Die zelluläre Immunabwehr der Lunge besteht aus den Alveolarmakrophagen in den Alveolen und aus Makrophagen, Mastzellen, Lymphozyten und Plasmazellen im Lungenbindegewebe. Die Alveolarmakrophagen treten aus dem Kapillarbett in die Alveolen ein. Ihre Aufgabe ist der Schutz der Alveolen vor eingeatmeten Fremdpartikeln. Des Weiteren phagozytieren sie das überalterte Surfactant. Zum größten Teil werden die Alveolarmakrophagen über den bronchoalveolären Weg eliminiert. Die Zellen des Lungenbindegewebes gehören teilweise der spezifischen Immunabwehr an und reagieren mit spezifischen Antigenen, die im Blut zirkulieren. Ferner können sie Fremdpartikel phagozytieren, und sie werden meist über das Lymphgefäßsystem abtransportiert (LEONHARDT 1990).

### 3.3. Die Generalisierte Entzündungsreaktion

#### 3.3.1. Allgemeines

Die Entzündung ist ein komplexer Abwehrvorgang des Organismus. Ausgelöst durch unterschiedliche Noxen kommt es im Rahmen der Entzündungsreaktion zur Aktivierung des Hämostase- und Immunsystems. Das primäre Ziel des Organismus ist es, den eingetretenen Schaden so gering wie möglich zu halten. Die Noxe soll ausgeschaltet und zusammen mit betroffenem Gewebe eliminiert werden, um eine Grundvoraussetzung für die Regeneration oder Reparatur zu schaffen. Je nach allgemeiner Reaktionslage des Organismus, der Art der auslösenden Noxe und der strukturellen und biochemischen Eigenschaften des betroffenen Gewebes kann es zur allgemeinen Entzündungsreaktion kommen, die bei einer Überreaktion dem Gesamtorganismus schaden kann (STÜNZI und WEISS 1990). So können scheinbar harmlose Noxen verheerende Auswirkungen auf den Körper haben (NIEMAN et al. 1999, PICORNE et al. 1999). Veränderungen des Gefäßkalibers und der Durchblutung, die Erhöhung der Gefäßpermeabilität und die Adhäsion, Emigration und Chemotaxis von Leukozy-

ten sind physiologische Reaktionen des Körpers (STÜNZI und WEISS 1990). Die allgemeine Entzündungsreaktion ist ein aus verschiedenen Komponenten bestehendes komplexes Geschehen. Es herrscht ein enges Zusammenspiel zwischen unspezifischer und spezifischer Immunabwehr mit ihren zellulären und humoralen Bestandteilen. Dazu gehören die Entzündungszellen (neutrophile Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten, Thrombozyten, Endothelzellen), die Gerinnung (Intrinsic/Extrinsic-System, fibrinolytisches System) und das Komplementsystem (EDMUNDS 1998) sowie die Cytokine (HATTLER et al. 1995).

### 3.3.2. Entzündungsreaktion und EKZ

In einer Vielzahl von experimentellen und klinischen Studien wurde beschrieben, dass im Rahmen der offenen Herzchirurgie eine generalisierte Entzündungsreaktion durch die EKZ induziert wird (BOYLE et al. 1999, ILTON et al. 1999, SABLITZKI et al. 1997/1 und 1999/2, TARNOK et al. 1999, WAN et al. 1997/1999, EDMUNDS 1998, HILL 1998 HALL et al. 1997, KHABAR et al. 1997, MILLER und LEVY 1997, SIMINELAKIS et al. 1996, TÖNZ et al. 1995, KIRKLIN et al. 1983/1987/1991). Diese inflammatorische Reaktion des Organismus wird wahrscheinlich durch die vier folgenden Ursachen ausgelöst: 1. Der Kontakt zwischen körpereigenem Blut mit seinen Zellbestandteilen und der künstlichen Oberfläche der Herz-Lungen-Maschine (KIRKLIN 1983), 2. Die zeitweilige Ischämie der ausgeschalteten Organe bzw. die anschließende Reperfusion (BUTLER et al. 1993), 3. Endotoxine, welche wahrscheinlich durch Bakterien des Magen-Darm-Traktes freigesetzt werden (KHARAZMI et al. 1989) und 4. Das gesetzte Trauma im Operationsfeld (OHRI 1996).

Als Folge dieser entzündlichen Reaktionen können Komplikationen in Form von nicht infektiösem Fieber, Gerinnungsstörungen, pulmonalen und/oder renalen Dysfunktionen, Veränderungen der Leberfunktionen, sowie in Form neurologischer Ausfälle auftreten. In besonders schweren Fällen resultiert ein Multiorganversagen (WAN et al. 1997). WESTARBY (1987) beschrieb diese pathologischen Veränderungen als sog. „Postperfusionssyndrom“.

Trotz intensiver Forschung und zahlreicher Befunde über die genauen Mechanismen der generalisierten Entzündungsreaktion, die durch die EKZ induziert werden, gelang es bisher nicht, den klinischen Verlauf wesentlich zu beeinflussen.

### 3.3.3. Akute Lungenschädigung nach EKZ

Die generalisierten Entzündungsreaktionen während der EKZ im Rahmen der offenen Herzchirurgie können zu pathophysiologischen Veränderungen in der Lunge führen, die mit einem verschlechterten Gasaustausch einhergehen. Eine pulmonale Dysfunktion nach herzchirurgischen Eingriffen mittels EKZ wurden bereits frühzeitig in der Literatur beschrieben (KLOFF et al. 1958). Noch heute ist sie Gegenstand

intensiver Forschung. In einigen Fällen kann es kurz nach dem operativen Eingriff zur Lungenschädigung kommen, in Form eines beginnenden Lungenödems, welches wahrscheinlich entzündungsbedingt ist. Allerdings muss ein mögliches kardiogenes Lungenödem oder eine vorliegende Lungenentzündung vorher ausgeschlossen werden (ASIMAKOPOULOS 1999). In der Regel bleibt dieses für den Patienten ohne klinische Konsequenzen, da der Organismus in der Lage ist, diese Funktionsstörung zu kompensieren. Patienten mit pulmonaler Vorschädigung haben ein höheres Risiko für schwerwiegende Lungenkomplikationen als lungengesunde Patienten.

Die alveolo-endotheliale Barriere ist bei den Lungendysfunktionen geschädigt. Es kommt zur Überflutung der Alveolen mit Flüssigkeit, die Durchlässigkeit steigt und die Größenselektivität wird gestört, worauf ein Einwandern von Makromolekülen folgt (FLICK et al. 1981).

Ursachen für diese Prozesse scheinen die Kontraktion der Endothelzellen bzw. eine Zerstörung des Endothels zu sein. Außerdem wird vermutet, dass körpereigene, degradierende Enzyme nicht ausreichend inhibiert werden und das Gewebe zerstören (TETLEY 1993). Ist die alveolo-endotheliale Barriere gestört, liegt ein kapilläres Leck in der Lunge vor. Proteine gelangen aus den Blutgefäßen in die Alveolen. Aus diesem Grunde stellt der Proteinnachweis in der Lavage einen nützlichen Parameter für den Nachweis einer entzündlichen Reaktion in der Lunge dar.

### 3.4. Spezielle Komponenten der generalisierten Entzündungsreaktion

#### 3.4.1. Die Cytokine

Cytokine gehören entweder in die heterogene Gruppe der Polypeptide oder in die der Glycopeptide. Sie stellen das Kommunikationssystem am Immungeschehen einschließlich der Entzündungsreaktion dar. So entfalten Cytokine ihre Wirkung an spezifischen Rezeptoren ihrer Zielzellen. Cytokine können die Funktion und die Genexpression ihrer Zielzellen beeinflussen. So können sie als Immunmediatoren sowohl die spezifische Immunantwort als auch die unspezifische Entzündungsantwort modulieren. Ihr Molekulargewicht liegt zwischen 5 und 70 kDa (TONNESEN et al. 1996). Gebildet und sezerniert werden die Cytokine in Form inaktiver Vorstufen von Zellen des spezifischen Immunsystems und ebenso von Epithel- und Endothelzellen.



Unter physiologischen Umständen sind sie im Plasma gar nicht oder nur in geringen Mengen messbar. Bei pathologischen Veränderungen, wie Entzündungsreaktionen können ihre Konzentrationen im Plasma im picomolaren bzw. femtomolaren Bereich liegen. Cytokine können sowohl schützende als auch zerstörende Aufgaben besitzen. Des Weiteren sind sie essentiell für ein optimales Gleichgewicht im Immun- und Reparatursystem. Die Mediatoren stehen in Wechselwirkung sowohl untereinander als auch mit den Zellen des Blutes. Einige klinisch wichtige Cytokine wirken hormonähnlich an von ihrem Entstehungsort entfernten Orten. Sie zirkulieren im Blut und Lymphsystem.

Potentiell schädlich scheinen sie bei großen Wunden, Sepsis und Schock zu wirken. Folgende Cytokine wurden im Rahmen der EKZ untersucht: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8 und IL-6 (CAMERON 1996, HATTLER et al. 1995). Diese proinflammatorischen Mediatoren besitzen alle potent pyrogene Wirkung und können klinische Symptome wie Fieber, Leukozytose und Lymphopenie verursachen.

#### IL-1

Das IL-1 wird von aktivierten Makrophagen, Monozyten sowie Endothelzellen sezerniert. IL-1 ist ein heterogen gebautes Peptid mit einem Molekulargewicht um 15.000 Dalton. Es ist schon bei geringen Konzentrationen aktiv. Es stimuliert nach Aktivierung wiederum Zielzellen, wie Monozyten und Makrophagen, den TNF- $\alpha$ , Komplement 3 und Komplement 5. IL-1 ist bei Entzündungsreaktionen und Destruktionsvorgängen beteiligt und ist ferner für die Adhäsion der neutrophilen Granulozyten zuständig. Dieser Entzündungsmediator stimuliert weiterhin die Antikörperproduktion. 24 h nach EKZ erreicht IL-1 seinen Spitzenwert im Plasma (MILLER und LEVY 1997).

#### TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$  wird hauptsächlich von Monozyten, aber auch von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen synthetisiert. Während und nach der EKZ steigt die Konzentration von TNF- $\alpha$  im Blut an (WAN et al. 1997, BRASIL et al. 1998, DEWANJEE et al. 1998). Den ersten Maximalwert erreicht TNF- $\alpha$  2 h nach Beginn der EKZ und einen zweiten Maximalwert 18-24 h später (MILLER und LEVY

1997). Laut WAN et al. (1999) wird TNF- $\alpha$  sehr wahrscheinlich von Endotoxinen aktiviert.

TNF- $\alpha$  selbst induziert die Bildung von IL-1, IL-6, Leukotrienen, PAF, die akute Phasenproteine der Leber, die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an die Endothelzellen sowie ihre Degranulation.

#### IL-8

Das IL-8 gehört zu der Gruppe der Chemokine, auf welche Leukozyten reagieren. Es ist ein kleines Cytokin mit einem geringen Molekulargewicht. IL-8 aktiviert neutrophile Granulozyten und T-Lymphozyten. Einige Arbeitsgruppen haben nachgewiesen, dass IL-8 vom Myokard selbst nach längerer Ischämie und darauffolgender Reperfusion gebildet werden kann (KUKIELKA et al. 1995, IVEY et al. 1995). Die Gen-Expression von IL-8 wird durch Komplement, aber auch durch die EKZ aktiviert. Die Konzentrationen an IL-8 in der bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit steigen im Verlauf der EKZ, wie die Arbeitsgruppen FINN (1993) und JORENS (1993) ermittelten.

#### IL-6

Das IL-6 wird von Monozyten und Endothelzellen gebildet. Seinen maximalen Plasmaspiegel erreicht es 4 h nach Beginn der EKZ. Die Arbeitsgruppe WAN (1999) beobachtete, daß IL-6 vom ischämischen und wiederdurchbluteten Herzmuskel gebildet wird. Allerdings ist die wirkliche Funktion dieses Cytokins noch nicht ausreichend erforscht. IL-6 scheint eher ein Marker für eine Entzündungsreaktion zu sein, als ein Aktivator für klinisch verursachte Schäden. Aus diesem Grund wurde die Konzentration von IL-6 in dieser Arbeit nicht gemessen.

#### 3.4.2. Die neutrophilen Granulozyten

Neutrophile Granulozyten gehören zu den Leukozyten und stellen beim Menschen mit 40-70 % den größten Anteil im zirkulierenden Blut dar. Im Gegensatz dazu bilden die neutrophilen Granulozyten beim Schwein nur einen Prozentsatz von 17-46 %. Bei dieser Spezies liegt ein lymphozytäres Blutbild vor. Die mittlere Zirkulationszeit der neutrophilen Granulozyten beträgt 6-8 Stunden. Die Granulozyten

haften an die Endothelzellen, emigrieren durch die Membran in das umgebende Gewebe und leben dort für 1-2 Tage weiter (ABRAMSON et al. 1991). Wie alle Blutzellen stammt der neutrophile Granulozyt von einer pluripotenten Stammzelle ab. Er proliferiert und reift im Knochenmark zur jugendlichen Zelle heran, um dann ins Blut abgegeben werden zu können. Täglich verlassen ca. 100 Millionen neutrophile Granulozyten das menschliche Knochenmark. Bei Entzündungsreaktionen oder Infektionen kann diese Zahl um das 10-fache ansteigen. Die Proliferation der Stammzelle wird durch verschiedene Wachstumsfaktoren beeinflusst. Die Differenzierung der Vorläuferzelle wird durch eine Gruppe von Cytokinen, zu der IL-1, IL-4 und IL-6 gehören, beeinflusst. Andere Mediatoren induzieren Wachstum und Proliferation sowohl der pluripotenten Stammzelle als auch der Vorläuferzellen der Myelozyten-, Erythrozyten- und Megakaryozytenzelllinie. Hierzu gehören IL-3 und granulocyte/macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF). Der granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) ist der wichtigste Vertreter einer dritten Gruppe, die für die Regulierung der Differenzierung von Granulozytenvorläuferzellen zu reifen Granulozyten benötigt wird (SIBILLE und MARCHANDISE 1993).

### 3.4.3. Funktionen der neutrophilen Granulozyten

Der neutrophile Granulozyt wirkt als Bestandteil des unspezifischen Immunsystems durch Degranulation, sein Oxidatives System und Phagozytose.

Die neutrophilen Granulozyten speichern sekretorische Granula, welche in drei Gruppen eingeteilt werden. 1. Primärgranula (auch Azurophile Granula), 2. Sekundärgranula (auch Spezifische Granula) und 3. Tertiärgranula (auch Gelatinase-Granula) (BORREGAARD et al. 1993).

Durch induzierende Noxen werden die neutrophilen Granulozyten aktiviert und ihre Granula wandern zur Zellmembran, um mit dieser zu verschmelzen. Es kommt zur Exozytose und Freisetzung der Inhaltsstoffe in das extrazelluläre Medium (SIBILLE et al. 1993). Primär- und Sekundärgranula können von den neutrophilen Granulozyten unabhängig voneinander mobilisiert werden. Eine Rolle bei der Freisetzung der Granula spielt wohl das intrazelluläre Calcium. Ein Calziumeinstrom bewirkt wahrscheinlich die Exozytose. Durch in-vitro-Experimente wurde eine strikte Hierarchie der Mobilisation erkannt: die Tertiärgranula reagieren am empfindlichsten, gefolgt

von Sekundär- und Primärgranula (SENGELOV et al. 1993, WRIGHT et al. 1977). Dies ermöglicht der Blutzelle ihre Enzyme, wie z B. Elastase, Cathepsin G, Lysozyme, Myeloperoxidase, MMP-9 und MMP-8, nach Bedarf an ihren Zielorten freizusetzen (EDMUNDS 1998). Die Tabelle auf Seite 16 zeigt die Inhaltsstoffe der drei Granula.

Das Oxidative System der neutrophilen Granulozyten befindet sich in der Plasmamembran und gewährleistet die Bildung von Wasserstoffperoxid, Superoxid Anionen und Hydroxylradikale. Das Wasserstoffperoxid kann mit Chlorid durch eine Interaktion mit der Degranulation von Myeloperoxidase zur hochpotenten bakteriotoxischen hypochlorischen Säure katalysiert werden. Diese Mechanismen sind wahrscheinlich für die Zerstörung der Gewebe in den Zielgebieten verantwortlich.

Der neutrophile Granulozyt übernimmt die Aufgabe der Killerzelle. Mittels Phagozytose folgt eine Inkorporation von Fremdpartikeln und zerstörtem Gewebe.

Tab.1: Granula-Inhaltsstoffe der neutrophilen Granulozyten

(nach Abramson 1991)

Komponente	Primärgranula	Sekundärgranula	Tertiärgranula <sup>1</sup>
Bakteriotoxische Enzyme	Myeloperoxidase Lysozym	Lysozym	
Proteinasen	Elastase Cathepsin G Proteinase 3		
Metalloproteinasen	Kollagenase (MMP-8)	Kollagenase <sup>3</sup> Gelatinase	Gelatinase (MMP-9)
Saure Hydrolasen	Cathepsin B Cathepsin D $\beta$ -Glucuronidase $\beta$ -Glycero- phosphatase $\alpha$ -Mannosidase		Cathepsin B Cathepsin D $\beta$ -Glucuronidase <sup>4</sup> $\beta$ -Glycero- phosphatase $\alpha$ -Mannosidase <sup>4</sup>
Andere	BPI <sup>2</sup> Defensin	Laktoferrin Vitamin B <sub>12</sub> - bin- dendes Protein Histaminase Cytochrom B fMCP-Rezeptoren Laminin- Rezeptoren C3 Re- zeptoren Plasminogen- Aktivator Komplement- Aktivator	

<sup>1</sup> Heterogene Gruppe<sup>2</sup> BPI: bactericidal/permeability increasing protein<sup>3</sup> Freisetzung als Proenzym<sup>4</sup> Lokalisation nicht sicher bekannt

#### 3.4.4. Die Reaktion der neutrophile Granulozyten auf die Lunge bei EKZ

In einer gesunden Lunge zirkulieren die neutrophilen Granulozyten nahezu ausschließlich im vaskulären Kompartiment. In den Alveolen befinden sich bis auf Alveolarmakrophagen (100-200 Zellen pro Alveole) keine Blutzellen. Die Aufgabe der Makrophagen besteht darin, körperfremde Materialien zu entfernen.

Während der EKZ wirkt die systemische Entzündungsreaktion als Stimulus in der Lunge und führt zur Erhöhung der Gefäßpermeabilität. Zum einen kommt es zur stärkeren Einflutung von Flüssigkeit und Einwanderung von kleinen Molekülen, zum anderen ermöglichen die entstehenden Endothelzwischenräume das Durchdringen von größeren Molekülen, welche normalerweise das Endothel nicht passieren können. Es entsteht das entzündliche Ödem. Weiterhin erfolgt ein massiver Einstrom von neutrophilen Granulozyten, durch Chemotaxis in die Lungenalveolen ausgelöst durch C5a und IL-8. Die Passage der neutrophilen Granulozyten durch das Kapillarbett der Lunge dauert aufgrund der Zellgröße länger als bei Erythrozyten. Die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten durch eine Entzündungsreaktion geht mit verminderter Verformbarkeit und daher mit vermehrter Sequestration (Ansammlung von Blutzellen) in den Alveolen einher. Zuerst kommt es zur Adhäsion der Granulozyten an das Gefäßendothel induziert durch ICAM-1, ICAM-2 und  $\alpha_4$ -Rezeptoren. Nun folgt die Migration in das Zielgewebe. Den chemotaktischen Reiz hierfür geben Mediatoren wie IL-8, Leukotrien-B<sub>4</sub>, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und platelet-activating-factor, die unter anderen durch Alveolarmakrophagen freigesetzt werden (ILTON et al.1999). Diese Mediatoren stimulieren auch die Abwehrmechanismen, die Phagozytose, die Degranulation und das Oxidative-System der Granulozyten (BRAUN et al. 1992). Das Verhältnis der neutrophilen Granulozyten zu den roten Blutkörperchen im peripheren Blut und im Lungengewebe wird ermittelt, um den Grad der Sequestration in der Lunge ermitteln zu können (BROWN et al. 1995). Als weitere Methode kann die Differenz der Leukozyten vom linken Vorhof zum rechten Vorhof des Herzens berechnet werden. Die Leukozyten spielen bei allen Entzündungen der Lunge zusammen mit ihren Produkten eine zentrale Rolle (BRAUN et al. 1997).

### 3.5. Matrix-Metalloproteasen

#### 3.5.1. Allgemeine Funktionen der MMP im Organismus und ihre biochemische Struktur

Im biologischen System verschiedener Organkompartimente herrscht unter physiologischen Bedingungen ein dynamisches Gleichgewicht zwischen gewebesaufbauender und gewebssabbauender Aktivität. Auf zellulärer Basis halten spezifische Proteasen und Proteasen-Inhibitoren diese Homeostase aufrecht. Die proteolytischen Enzyme MMP spielen bei physiologischen Vorgängen wie Blutgerinnung, Angiogenese, Ovulation oder Wundheilung eine wesentliche Rolle (O'CONNOR und FITZGERALD 1994). Die Balance zwischen Auf- und Abbau der Gewebe kann durch pathophysiologische Veränderungen empfindlich gestört sein. Es kommt zu einer Verschiebung des physiologischen Gleichgewichtes zwischen Proteolyse und Inaktivierung proteolytischer Aktivität. Beispiele hierfür sind Entzündungen, Fibrose, Metastasierungen, die rheumatoide Arthritis und Nieren- oder schwere Lungenerkrankungen (O'CONNOR und FITZGERALD 1994).

Die Matrix-Metalloproteasen (MMP) gehören zur matrixdegradierenden Enzymfamilie. An die 20 MMP sind bis heute identifiziert worden. Zu ihnen gehören Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Matrilysine, Makrophagen-Elastasen und der Zellwandtyp MMP (SHAPRIO und SENIOR 1999).

Jedes Ferment richtet sich mit einer hohen Substratspezifität gegen individuelle Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM) und der Basalmembran (CAMPBELL et al. 1987). Bindegewebe, Basalmembrankollagen sowie Laminin, Proteoglykane, Fibronectin und Elastin werden von den verschiedenen Enzymen degradiert (O'CONNOR und FITZGERALD 1994). MMP werden als inaktive Proenzyme, sogenannte Zymogene, sezerniert und erst extrazellulär durch Abspaltung bestimmter Enzymsequenzen aktiviert. Biochemisch sind drei Domänen gefunden worden. Die katalytische-, die C-terminale- und die Propeptid- Domäne. Im aktiven Zentrum besitzen alle entweder ein  $Zn^{2+}$ - oder ein  $Ca^{2+}$ -Ion, um katalytisch wirken zu können (GIBBS et al. 1999, MATRISIAN 1992, MURPHY et al. 1989). Die Propeptiddomäne besteht aus einer bestimmten Aminosäuresequenz, die eine gewisse Stabilität für das latente Proenzym gewährleistet (SANCHEZ-LOPEZ et al. 1988). In der katalytischen Domäne befinden sich zwei Histidin-Aminosäuren, Liganden für das  $Zn^{2+}$

Ion. Bis auf das Matrilysin, das kleinste Enzym aus der Familie der MMP besitzen alle anderen ein C-terminales Ende. Diese Domäne ist trotz einer familiären homologen biochemischen Struktur der MMP-Isoformen für die hohe Substratspezifität verantwortlich. Weiterhin spielt sie eine wichtige Rolle für die Interaktion zwischen MMP und ihren natürlichen Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 (MURPHY et al. 1992).

Durch die hohe Substratspezifität werden die MMP in drei funktionelle Gruppen eingeteilt:

Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9), welche am effektivsten Kollagen Typ IV degradieren,

Interstitielle Kollagenasen (MMP-1 und MMP-8), welche in erster Linie Kollagen vom Typ I, II und III lysieren,

Stromyelysine (MMP-3, MMP-10 und MMP-11), welche höchste Spezifität für Laminin zeigen.

### 3.5.2. Syntheseorte und Regulation von MMP

Die MMP werden von verschiedenen Zellen synthetisiert und freigesetzt. Dazu gehören Stromazellen wie Fibroblasten, Endothelzellen, Osteoblasten, Chondrozyten, Hepatozyten und Keratinozyten (BIRKEDAL-HANSEN 1993) sowie Blutzellen wie Monozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten (HASTY et al. 1990, O'CONNOR und FITZGERALD 1994)

MMP-9 (Gelatinase B) wird von den neutrophilen Granulozyten während der Zellreifung im Knochenmark gebildet und in den Tertiärgranula gespeichert (HIBBS et al. 1984, HIBBS et al. 1985). Ein weiterer Bildungsort für MMP-9 sind die Makrophagen (MAINARDI et al. 1984).

MMP-8 (neutrophile Kollagenase) wird ebenfalls in neutrophilen Granulozyten gebildet. Der Speicherort für diese Enzyme befindet sich allerdings in den Primärgranula (KJELDSEN et al. 1994). Bei Bedarf werden die Fermente durch die Degranulation der neutrophilen Granulozyten in das jeweilige Zielgebiet freigesetzt. MMP-2 wird hauptsächlich von Gewebezellen und Fibroblasten sezerniert (O'CONNOR und FITZGERALD 1994). Zellen neoplastischen Ursprungs und Stromazellen um Tumorgewebe sind in der Lage MMP-2 und MMP-9 zu produzieren und zu sezernieren



(TRYGGVASON et al. 1993, BUSIEK et al. 1992, WILHELM et al. 1989).

Die Bildung und die Aktivität der Enzyme werden von verschiedenen Komponenten reguliert. So beeinflussen Faktoren wie Cytokine, Wachstumsfaktoren und Kompartimente der EZM die Transkription der MMP in den Stromazellen. Beispielsweise wird die Transkription von MMP-1, MMP-3 und MMP-9 von EGF, PDGF, NGF, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  gefördert und durch TGF- $\beta$  IFN- $\beta$  und IFN- $\gamma$  sowie durch Progesteron und Glukokortikoide gehemmt (WRIGHT et al. 1977).

Die MMP-Isoformen werden durch ihre endogenen Antagonisten in ihrer Aktivität beeinflusst. Die sogenannten Tissue Inhibitors of Matrix-Metalloproteases (TIMP) hemmen mit unterschiedlichen Affinitäten die MMP im aktiven Zentrum im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1. Unter physiologischen Bedingungen besteht eine Balance zwischen MMP und TIMP. Ein Ungleichgewicht dieser MMP/TIMP-Balance kann zu Störungen der Gewebhomeostase führen. Ein Überschuss an MMP führt wahrscheinlich zu einer vermehrten EZM-Zerstörung mit anschließender Gewebszerstörung.

Bis heute wurden drei TIMP-Isoformen identifiziert und benannt. TIMP-1 (28,5 kDa), TIMP-2 (21 kDa) und TIMP-3 (21 kDa). Diese Inhibitoren werden von zahlreichen Zellen gebildet und befinden sich im Bindegewebe. Hier besitzen sie die kontrollierende Rolle über die aktivierten MMP, welche die Matrix degradieren (DENHARDT et al. 1993).

Neben den spezifischen Inhibitoren können die Proteasen durch  $\alpha_2$ -Makroglobuline und synthetische Antagonisten, wie GM6001, inhibiert werden (BROWN 1999). Seit Mitte der 80er Jahre wurden verschiedene künstliche Inhibitoren entwickelt und hergestellt. Es existieren 3 Arten: auf Peptidbasis (z.B. Marimastat BB-2516), auf Nichtpeptidbasis (z.B. AG-3340) und aus natürlich modifizierten Tetrazyklinderivaten (z.B. CMT-3). Zur Zeit sind solche Präparate in der Tumorforschung in den Anfängen der klinischen Erprobungsphase (BROWN 1999).

### 3.5.3. MMP in der Lunge

Die gesunde Lunge ist einem ständigen Ab- und Umbau ihrer extrazellulären Matrix unterzogen, der täglich bis zu 10 % betragen kann. Die Erhaltung der alveolären Struktur ist essentiell, um die physiologische Lungenfunktion zu gewährleisten. Am physiologischen Gewebsabbau sind drei große Gruppen von Proteasen beteiligt: Serin-, Zystin- und Metalloproteasen. Das Substrat für die in dieser Studie untersuchten MMP-2 und MMP-9 sind verschmolzene Basallaminae von Kapillaren und Alveolarsepten und das Kollagen Typ IV. Die Isoformen der MMP werden von allen Zellen der Lunge, wie Fibroblasten, Alveolarzellen, Makrophagen, Epithel- und Endothelzellen gebildet.

Da vermutet wird, dass den MMP bei Entstehung und Verlauf verschiedener Lungenerkrankungen eine besondere Rolle zukommt, könnten die Syntheseorte der Enzyme von Interesse sein. MMP-9 wird sowohl von den neutrophilen Granulozyten als auch von Alveolarmakrophagen sezerniert. Bindegewebszellen wie z. B. Fibroblasten synthetisieren vor allem MMP-2 (Gelatinase A).

Als mögliche Wirkungen der MMP werden charakteristischen Veränderungen der Alveolarstruktur, unphysiologische Wundheilungsstörungen inklusive Lungenemphysem, ARDS, Lungenfibrosen, granulomatöse Veränderungen, Lungentumoren und Pleuraveränderungen gesehen. Mit dieser Problematik haben sich verschiedene Arbeitsgruppen beschäftigt (LEMJABBAR et al. 1999, SEPPER et al. 1999, FINLAY 1996, HAYASHI et al. 1996, RICOU et al. 1996, D'ORTHO et al. 1994).