

4 ERGEBNISSE

4.1 Kriterien für die Datenverwertung

Insgesamt wurden in dem Versuch vierundzwanzig Tiere untersucht:

Acht Tiere wurden mit dem Endothelinantagonisten LU-135252 behandelt, sechzehn Tiere blieben unbehandelt (*ALI+LU: n=8; ALI: n=16*).

Da speziell in der unbehandelten Kontrollgruppe viele Versuchstiere vor Ablauf des festgelegten Versuchszeitraumes starben, war die Frage zu klären, inwieweit Daten von vorzeitig verstorbenen Tieren in die Auswertung miteinbezogen werden konnten und welche Auswirkungen dies auf die Ergebnisse haben kann.

Ich werde in diesem Kapitel eine Zusammenschau geben, wieviele Tiere bei welchen Untersuchungen in die Auswertung miteinbezogen worden sind, ohne an dieser Stelle auf die möglichen Folgen für die Interpretation der Ergebnisse einzugehen.

Dies erfolgt dann ausführlich im Rahmen der Diskussion.

1. Untersuchung der hämodynamischen Situation:

Die hämodynamischen Messungen wurden 5 Stunden nach Induktion des ALI durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt waren 8 Tiere der Kontrollgruppe bereits gestorben, so dass diese Tiere nicht in die Auswertung miteinbezogen werden konnten.

Die Anzahl der Tiergruppen betrug bei den hämodynamischen Auswertungen also:

ALI: n=8 (ALI=unbehandelte Tiergruppe)

ALI+LU: n=8 (ALI+LU=behandelte Tiergruppe).

2. Untersuchung der histologischen sowie biochemischen Situation:

Da die Gewebeproben der überlebenden sowie der vorzeitig verstorbenen Tiere durchaus beide aussagekräftig sind und da bei Ausschluß aller vorzeitig verstorbenen Tiere ein erheblicher Selektionsfehler eingetreten wäre (ausführliche Erläuterung der Begründung siehe Kapitel "Diskussion"), so wurden für diese Auswertungen alle Tiere mit einbezogen, auch die frühzeitig verstorbenen Tiere.

Die Anzahl der Tiergruppen betrug bei der histologischen sowie biochemischen Auswertung also:

ALI: $n=16$

ALI+LU: $n=8$

4.2 Überleben der Tiere

Insgesamt wurden in diesem Versuch vierundzwanzig Tiere untersucht.

Von diesen vierundzwanzig Tieren sind acht Tiere nach experimenteller Induktion des akuten Lungenversagens mit dem Endothelinantagonisten LU-135252 behandelt worden.

Von diesen behandelten Tieren überlebten sieben den festgelegten Versuchszeitraum von fünf Stunden.

Eines starb jedoch eines natürlichen Todes (also eines nicht direkt vom Untersucher herbeigeführten Todes) einige Sekunden vor Ende der fünften Stunde. Die anderen Tiere wurden zur weiteren Untersuchung getötet.

Bei der Gruppe der unbehandelten Tiere überlebten fünf von sechzehn Tieren die Schwelle von fünf Stunden nach Induktion des akuten Lungenversagens, der Rest dieser Tiergruppe starb während des Versuches. Bei dieser Gruppe starben allerdings ebenfalls drei Tiere kurz vor Versuchsende.

Bei der Überlebenszeit zeigte sich eine signifikante Unterscheidung zwischen den Gruppen, welche ab der vierten Stunde nach Induktion des akuten Lungenversagens auftrat

(Überleben nach 4 Stunden in %: ALI=50%; ALI+LU=100%).

Die Werte und ihre Signifikanz werden in der folgenden Grafik dargestellt.

Man sieht in der Grafik deutlich den kontinuierlichen Abfall der Überlebenszeit bei den nicht behandelten Tieren im Gegensatz zu dem konstanten Werten der ALI – Versuchsgruppe (ALI = acute lung injury), die fast bis zum Ende des Versuchverlaufes auf 100% blieben.

Die signifikanten Werte wurden in der Grafik entsprechend markiert.

Abb. 4.1 Überlebenszeit der Tiere in Prozent

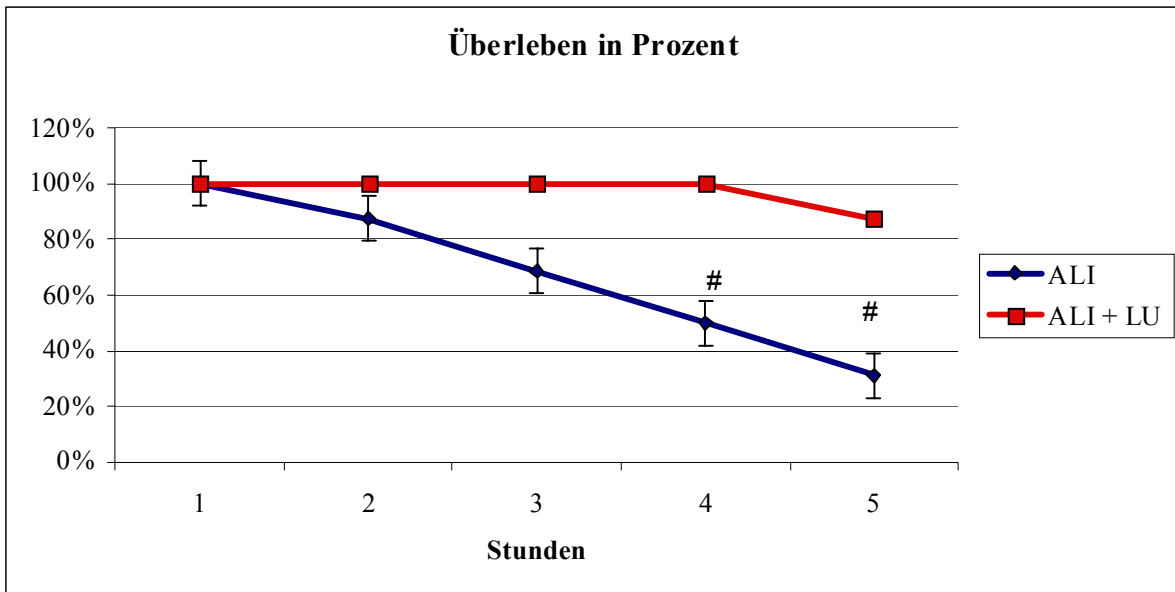


Abb. 4.1 Die Überlebenszeit der unbehandelten Tiere fiel prozentual vier Stunden nach Induktion des ALI signifikant ab, es überlebten nur 31,25%. Von den behandelten Tieren überlebten 87,5%.
ALI: acute lung injury; ALI+LU: acute Lung injury + LU-135252, #: $p < 0,05$

In der folgenden Tabelle sind die Prozentwerte der Überlebensdauer der beiden verschiedenen Gruppen (unbehandelte Tiere und mit LU-135252 behandelte Tiere) in stündlicher Entwicklung tabellarisch zu sehen.

Ebenso ist die Signifikanz, berechnet mit dem Log-Rank-Test, mit aufgeführt.

Hieran kann man sehen, dass die Werte ab der vierten Stunde nach Induktion des akuten Lungenversagens signifikant wurden.

Die Signifikanzschwelle war $p < 0,05$, die signifikanten Werte sind in der Tabelle rot markiert.

Tab. 4.1 Überleben der Tiere in Prozent pro Zeitintervall

Stunden	0	1	2	3	4	5
ALI in %	100	100	87,5	68,75	50	31,25
ALI + LU in %	100	100	100	100	100	87,5
Signifikanz im Log-Rank - Test	1	1	0,306	0,0868	0,002	0,011

Tab.4.1: tabellarischer Vergleich der prozentualen Werte der Überlebenszeit zwischen den unbehandelten Tieren und den mit LU-135252 behandelten Tieren. Die Werte wurden jede Stunde errechnet bis fünf Stunden nach Induktion des ALI. Die Signifikanz wurde im Log-Rank-Test errechnet, alle Werte sind normal verteilt. ALI = acute lung injury; ALI+LU = acute lung injury+ LU-135252

Man kann somit behaupten, dass die Behandlung mit dem Endothelinantagonisten LU-135252 die Überlebensdauer der Tiere signifikant verlängert hat.

Im weiteren Versuchsverlauf wurden verschiedene Werte der Hämodynamik und des Gasaustausches, der Histologie und der biochemischen Charakterisierung gemessen.

4.3 Hämodynamik und Gasaustausch

Es wurden bei den vierundzwanzig untersuchten Tieren verschiedene Parameter der Hämodynamik und des Gasaustausches gemessen, um einen Vergleich zwischen der Situation der unbehandelten Gruppe und der mit LU-135252 behandelten Gruppe der Tiere zu erlangen. Folgende Werte wurden erfasst:

- Herzfrequenz (HF), [bpm]
- mittlerer arterieller Blutdruck (MAP), [mmHg]
- mittlerer pulmonalarterieller Blutdruck (MPAP), [mmHg]
- zentralvenöser Druck (ZVD), [cmH₂O]
- Herzzeitvolumen (HZV), [l/min]
- Sauerstoffpartialdruck (paO_2), [mmHg]
- CO₂-Partialdruck ($paCO_2$), [mmHg]
- intrapulmonaler Rechts-Links-Shunt (Q_s/Q_t), [%]

In der folgenden Tabelle sieht man alle gemessenen Werte als Mittelwert aus den Einzelwerten der verschiedenen Tiere, jeweils fünf Stunden nach Induktion des akuten Lungenversagens (die Werte waren alle normalverteilt).

Von besonderer Relevanz sind die Werte des Sauerstoffpartialdruckes sowie des intrapulmonalen Rechts-Links-Shunts, da sie etwas über die pathophysiologische Situation der Lunge aussagen. Je stärker die Bildung hyaliner Membranen und Mikroatelektasen in der Lunge fortgeschritten ist, desto stärker sind die Shuntblutungen. Außerdem sinkt die Sauerstoffaufnahme der Lunge in Relation zu dem bei ALI entstehenden Lungenödem und der Schädigung des pulmonalen Kapillarendothels.

In der Tabelle kann man sehen, dass die Werte des Sauerstoffpartialdruckes, des pulmonalarteriellen Blutdruckes sowie die Werte des intrapulmonalen Rechts-Links-Shunts durch die Behandlung mit dem Medikament LU-135252 signifikant besser waren als bei den unbehandelten Tieren. Der paO_2 stieg an, Q_s/Q_t fiel ab und der MPAP blieb konstanter bei den behandelten Tieren (paO_2 nach 5h: ALI: $52 \pm 3,3$ mmHg; ALI+LU: $323,3 \pm 52,1$ mmHg; Q_s/Q_t nach 5h: ALI: $52,1 \pm 3,5$ %; ALI+LU: $21,7 \pm 2,8$ %; MPAP nach 5h: ALI: $39,9 \pm 1,3$ mmHg; ALI+LU: $31,5 \pm 2,7$ mmHg).

Der Unterschied der Werte des Sauerstoffpartialdruckes zwischen den beiden Gruppen zeigt eine sehr hohe Signifikanz ($p < 0,001$), wodurch die verbesserte Sauerstoffaufnahme durch die Behandlung mit dem Endothelinantagonisten LU-135252 sehr deutlich wird. Die signifikanten Werte wurden in der folgenden Tabelle rot markiert.

Bei den Werten ist zu beachten, daß die Tiere mit 100% Sauerstoff beatmet wurden.

Tab. 4.2: Werte der Hämodynamik und des Gasaustausches

	ALI-Gruppe 5h nach Induktion des ALI	ALI+LU-Gruppe 5h nach Induktion des ALI	Signifikanz im Student's T-Test
HF [bpm]	83,1± 5,2	81,0± 3,5	0,789
MAP [mmHg]	89,8± 8,1	104,9± 4,1	0,116
MPAP [mmHg]	39,9± 1,3	31,5± 2,7	0,013
ZVD [cmH₂O]	13,6± 0,7	12,3 ± 0,6	0,157
HZV [l/min]	3,8± 0,4	3,7 ± 0,3	0,873
PAO₂ [mmHg]	52,0± 3,3	323,3 ± 52,1	0,000
paCO₂ [mmHg]	46,4± 3,4	42,9 ± 1,7	0,370
Qs/Qt [%]	52,1± 3,5	21,7 ± 1,7	0,000

Tab.4.2: Die Werte der behandelten und unbehandelten Tiere sind fünf Stunden nach Induktion des akuten Lungenversagens gemessen und im Mittelwert aufgeführt. Die Signifikanz wurde im Student's T-Test errechnet, die Werte waren alle normal verteilt.

ALI = acute lung injury; ALI+LU = acute lung injury + LU-135252, significant: $p < 0,05$

Direkt nach der Induktion des akuten Lungenversagens setzte wie erwartet zunächst bei allen 24 Versuchstieren eine Reduktion der arteriellen Sauerstoffsättigung ein.

Der Sauerstoffpartialdruck fiel im Mittelwert von 590 ± 19 mmHg, eine Stunde vor Induktion des akuten Lungenversagens gemessen, auf 54 ± 3 mmHg bei den nicht behandelten Tieren, gemessen zum Zeitpunkt der ALI-Induktion.

Bei den mit LU-135252 behandelten Tieren fiel der Mittelwert von 545 ± 20 mmHg auf 60 ± 5 mmHg. Eine Stunde nach der Induktion des ALI begannen sich die Werte zwischen den beiden Gruppen deutlich zu unterscheiden.

Die schrittweise einsetzende Verbesserung der Situation für die ALI+LU-Gruppe wird in der folgenden Tabelle gezeigt. Man sieht, daß die Werte des Sauerstoffpartialdruckes schon zwei Stunden nach Induktion des ALI signifikant besser wurden. Die Signifikanz wurde im Student's T-Test errechnet, die signifikanten Werte sind rot hervorgehoben. Der Zeitpunkt "null" bezeichnet die Induktion des ALI, zwanzig Minuten nach Induktion des ALI begann die Behandlung mit dem Endothelinantagonisten. Die Stundenwerte bezeichnen die Stunden nach Induktion des ALI. Die signifikanten Werte sind in der Tabelle rot markiert.

Auch in der nachfolgenden graphischen Darstellung der Sauerstoffpartialdrücke bezeichnet der Zeitpunkt "null" die Induktion des ALI.

Tab. 4.3: Werte des Sauerstoffpartialdruckes

Zeitpunkt	ALI paO ₂ (mmHg)	ALI+LU paO ₂ (mmHg)	Signifikanz im Student's T-Test
-1 h	590,5±18,6	544,5± 20,1	0,115
0 h	54,3±4,0	60,5± 4,8	0,336
1 h	60,1±3,6	150,0± 41,2	0,066
2 h	63,3±5,6	297,4± 41,9	0,011
3 h	64,8± 2,4	324,2± 51,7	0,02
4 h	55,8± 2,8	366,1± 48,3	0,00
5 h	52,0± 3,3	323,3± 52,1	0,001

Tab. 4.3: Werte des paO₂, jede Stunde gemessen, unbehandelte und behandelte Tiere im Vergleich
ALI = acute lung injury; ALI+LU = acute lung injury + LU-135252.

Abb. 4.2: Sauerstoffsättigung in mmHg während des gesamten Versuchszeitraumes

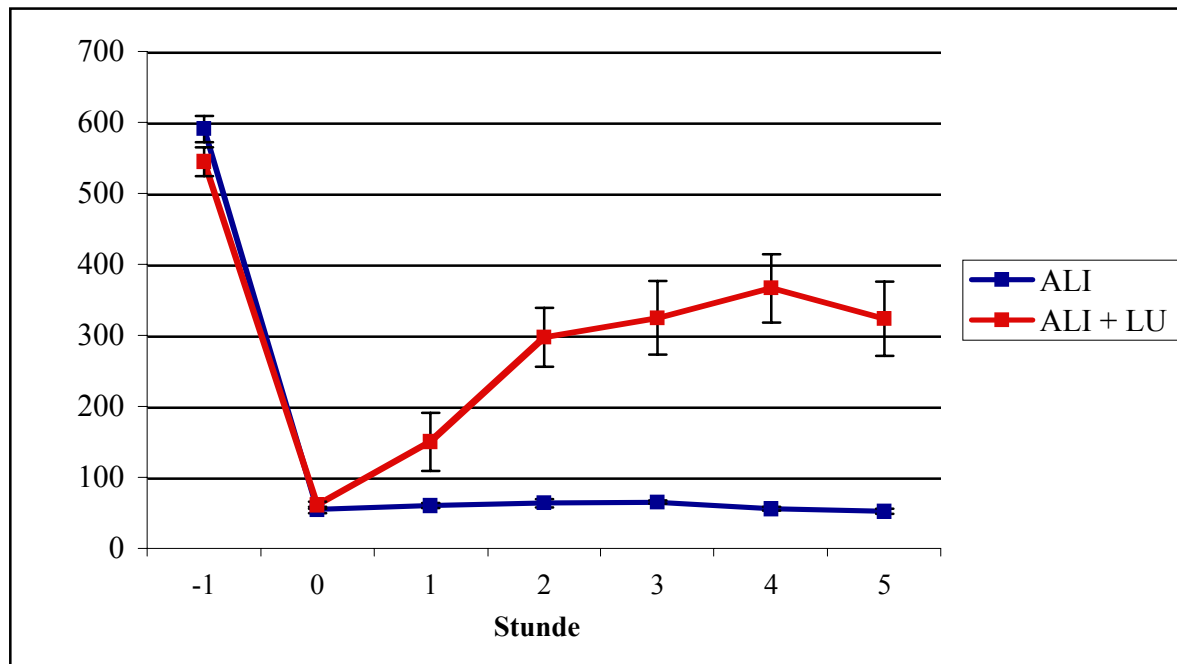


Abb. 4.2: Vergleich der Sauerstoffversorgung der Lunge bei mit LU-135252 behandelten Tieren nach und den unbehandelten Tieren nach Induktion des akuten Lungenversagens.
ALI = acute lung injury; ALI+LU = acute lung injury + LU-135252

Neben dem Sauerstoffpartialdruck waren durch die Behandlung mit LU-135252 ebenfalls die Werte des mittleren pulmonalarteriellen Blutdrucks sowie der intrapulmonale Rechts-Links-Shunt signifikant verbessert worden.

Zu diesen Werten finden sich unten angefügt zwei Diagramme.

Mit der Signifikanz dieser Werte wird deutlich, dass nicht nur die Sauerstoffversorgung durch den Endothelinantagonisten LU-135252 verbessert wurde, er verringerte auch die Ausprägung der intrapulmonalen Shunts (was auf eine verminderte Zerstörung des Kapillarendothels schließen lässt) und verbesserte die Blutdrucksituation der Lunge.

Abb. 4.3: mittlerer pulmonaler arterieller Blutdruck fünf Stunden nach Induktion des ALI

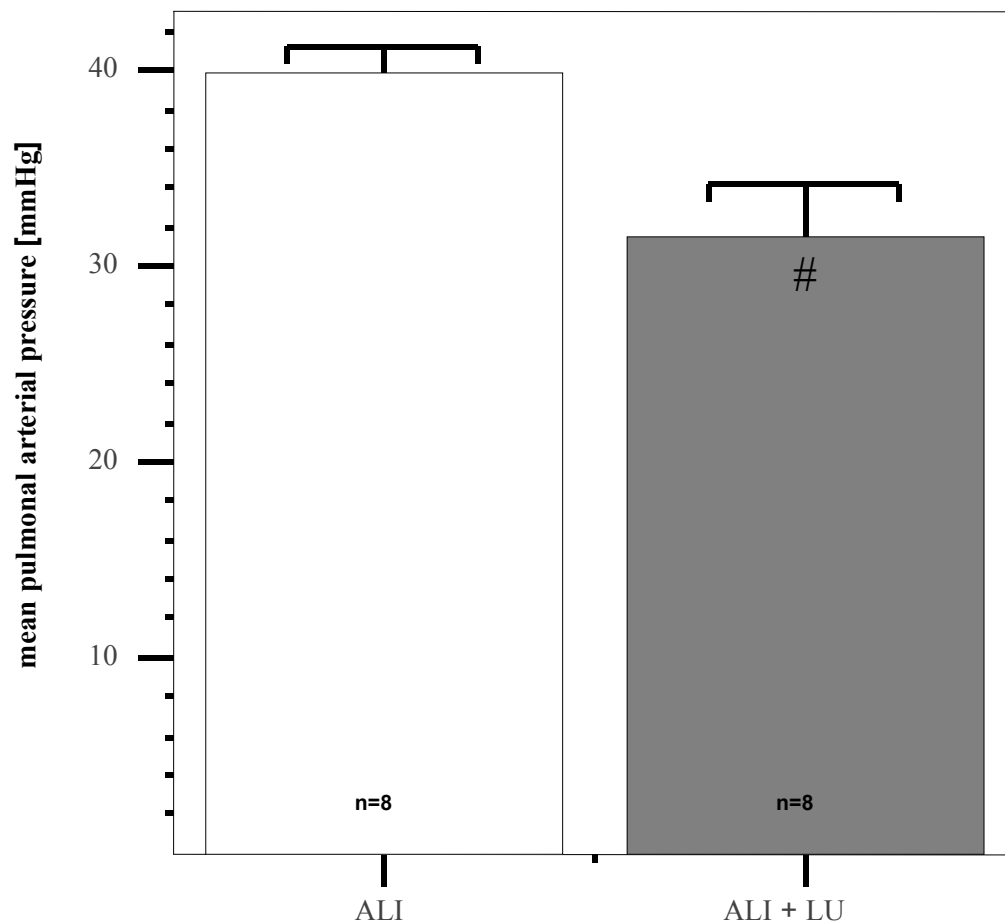


Abb.4.3: Werte für MPAP 5 Stunden nach Induktion des ALI bei behandelten und unbehandelten Tieren im Vergleich. Bei der Gruppe der nicht behandelten Tiere wurden nur die Werte der überlebenden Tiere miteinbezogen.

ALI = acute lung injury; ALI+LU = acute lung injury + LU-135252; n = Anzahl

Abb. 4.4: intrapulmonaler Rechts-Links-Shunt fünf Stunden nach Induktion des ALI

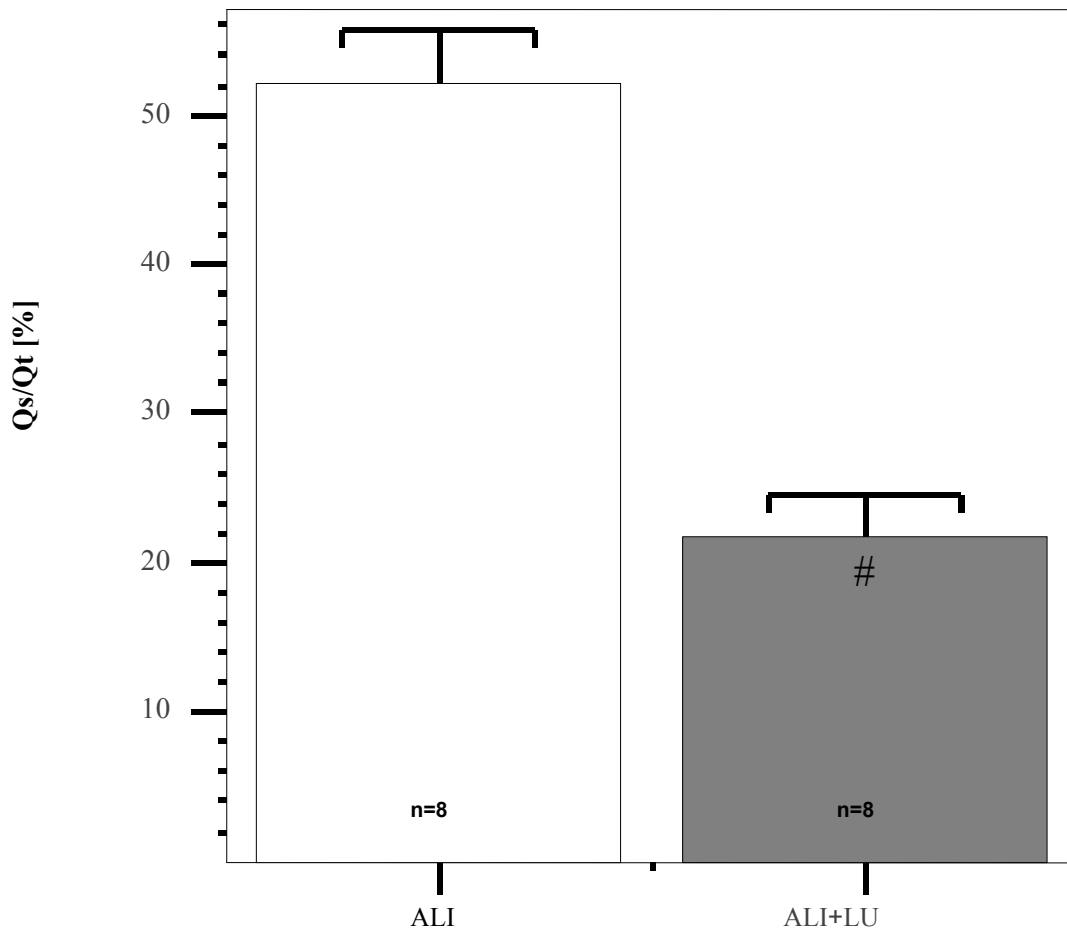


Abb. 4.4: Werte von Qs/Qt 5 Stunden nach Induktion des ALI bei behandelten und unbehandelten Tieren im Vergleich. Bei der Gruppe der nicht behandelten Tiere wurden nur die Werte der überlebenden Tiere miteinbezogen.

ALI = acute lung injury; ALI + LU = acute lung injury + LU-135252; n = Anzahl

4.4 histologische Auswertungen

4.4.1 Makrophagen - und CD3 - Zellzahlen

Folgende Zellen wurden im Lungengewebe der Versuchstiere durch immunhistochemische Methoden 6 Stunden nach Induktion des akuten Lungenversagens sichtbar gemacht:

- Leukozytenantigen - L1 – positive Zellen (Makrophagen)
- CD3 – positive Zellen

Wir konnten in den Lungengeweben der Versuchstiere eine signifikant verminderte Zahl der Leukozytenantigen – L1 – positiven Zellen bei den behandelten Tieren feststellen

(Makrophagen: ALI: 12 ± 2 %; ALI+LU: 8 ± 1 %).

Es wird im Weiteren nur von Makrophagen gesprochen, da sie die häufigsten Leukozytenantigen - L1 - positiven Zellen sind.

Die Anzahl der CD3-positiven Zellen war hingegen nicht signifikant verringert bei den behandelten Tieren, fünf Stunden nach Induktion des ALI

(CD3-Zellen: ALI: $3,5 \pm 0,3$ %; ALI+LU: $4,1 \pm 0,4$ %).

In der folgenden Abbildung sind die histologischen Bilder zu sehen, anhand welcher die Leukozytenantigen L1 – positiven Zellen, also die Makrophagen, und die CD3-Zellen ausgezählt wurden. Man erkennt auch im rein optischen Vergleich das relativ häufigere Auftreten von angefärbten Zellen im Gewebe der nicht behandelten Tiere.

Anschließend folgt die Tabelle mit den Werten, die signifikanten Bereiche sind rot markiert und im Folgenden auch als Balkendiagramm dargestellt.

Abb. 4.5: Leukozytenantigen – L1 – positive Zellen bei Tieren der ALI-Gruppe

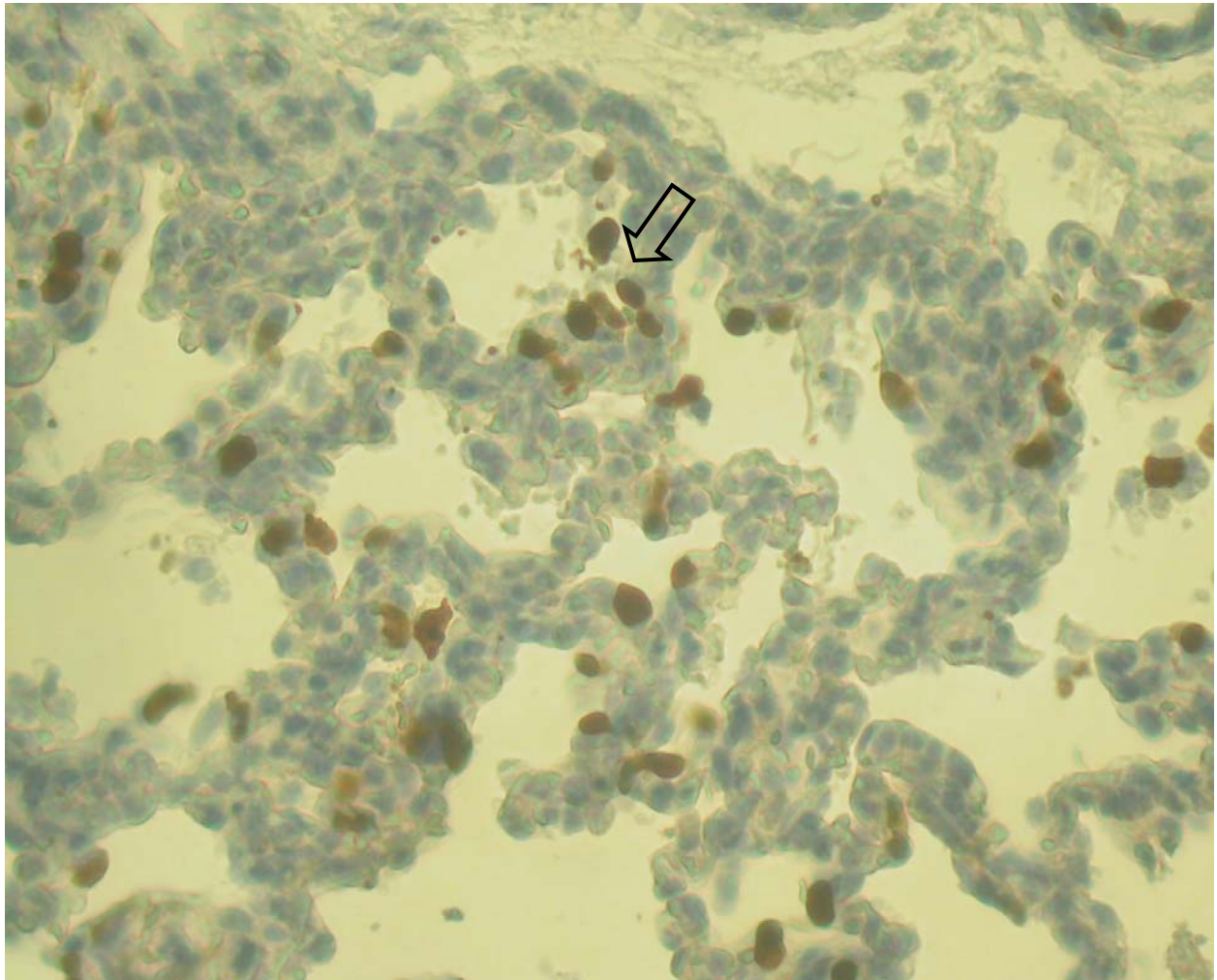


Abb. 4.5: Typische Lungenschnitte der Schweine 7 Stunden nach Induktion des akuten Lungenversagens. Zu sehen sind immunhistochemische Färbungen der Leukozytenantigen - L1 - positiven Zellen bei Tieren der ALI-Gruppe. Diese Zellen sind braun angefärbt (Pfeil).
ALI = acute lung injury; ALI + LU = acute lung injury + LU-135252

Abb. 4.6: Leukozytenantigen - L1 - positive Zellen bei Tieren der ALI+LU-Gruppe

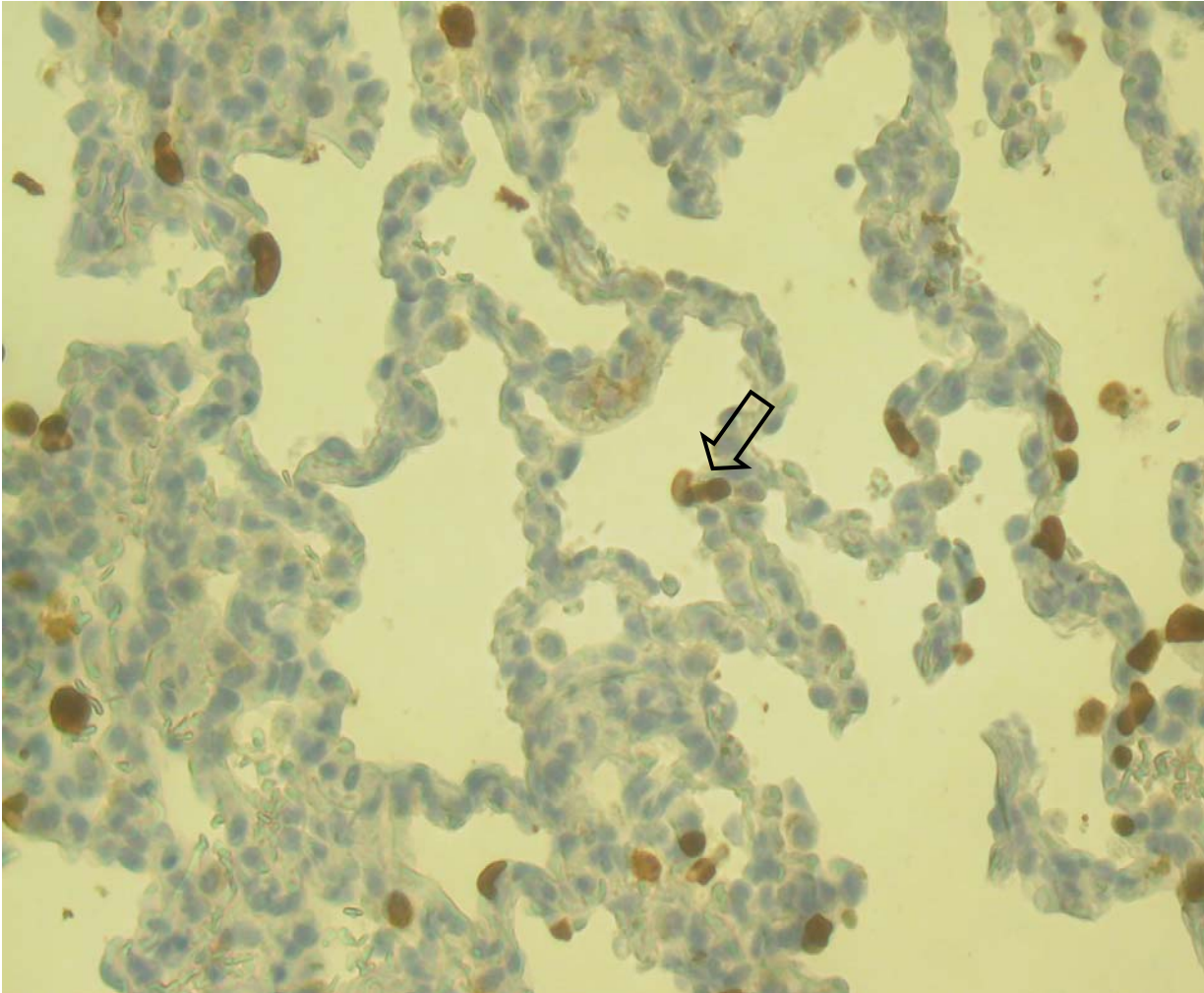


Abb. 4.6: Typische Lungenschnitte der Schweine 7 Stunden nach Induktion des akuten Lungenversagens. Zu sehen sind immunhistochemische Färbungen der Leukozytenantigen - L1 - positiven Zellen bei Tieren der ALI+LU-Gruppe.
Diese Zellen sind braun angefärbt (Pfeil).
ALI = acute lung injury; ALI + LU = acute lung injury + LU-135252

Abb. 4.7: CD3 - positive Zellen bei Tieren der ALI-Gruppe

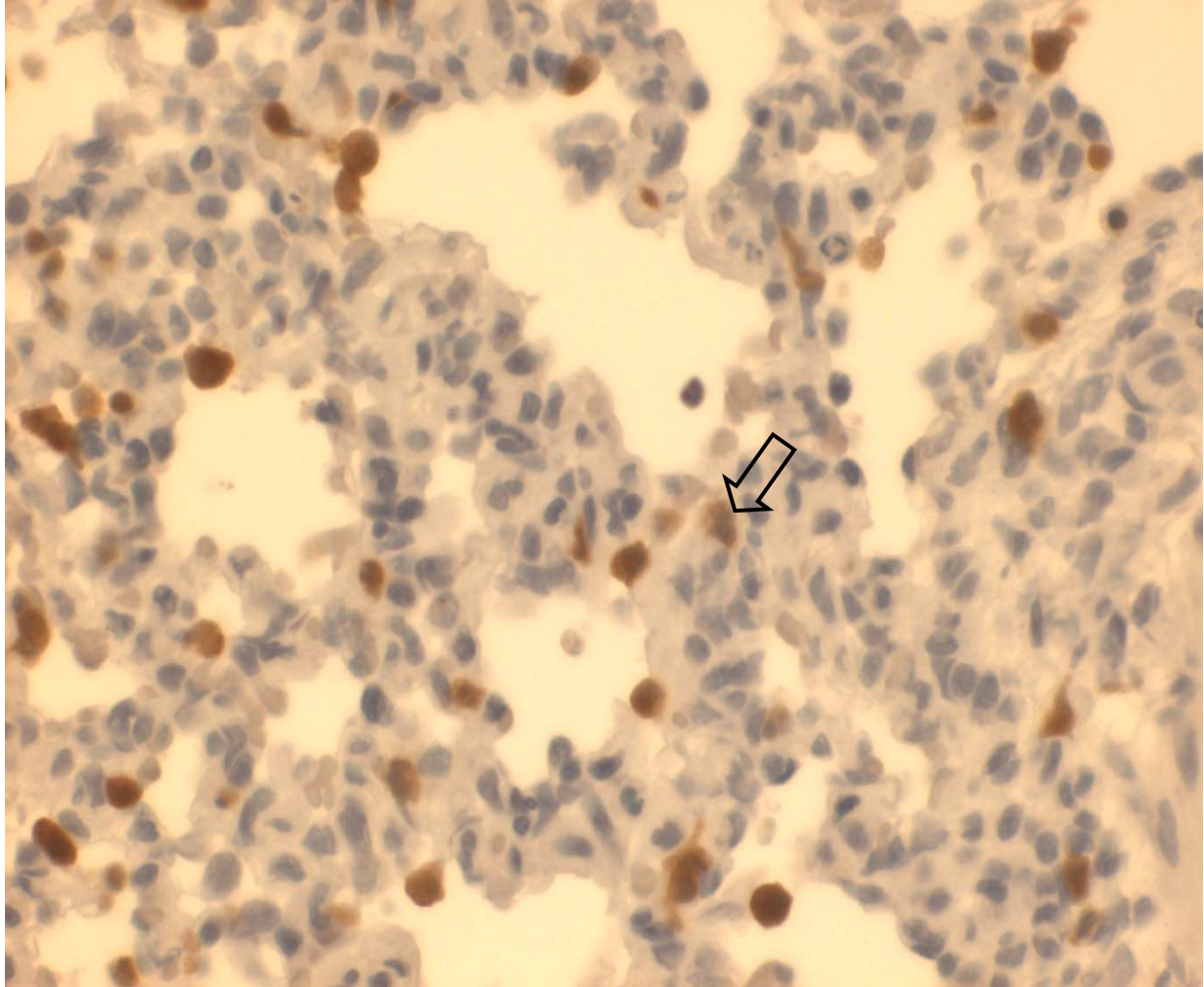


Abb. 4.7: Typische Lungenschnitte der Schweine 7 Stunden nach Induktion des akuten Lungenversagens. Zu sehen sind immunhistochemische Färbungen der CD3-positiven Zellen von Tieren der ALI-Gruppe. Diese Zellen sind braun angefärbt (Pfeil).
ALI = acute lung injury; ALI + LU = acute lung injury + LU-135252

Abb. 4.8: CD3 - positive Zellen bei Tieren der ALI+LU-Gruppe

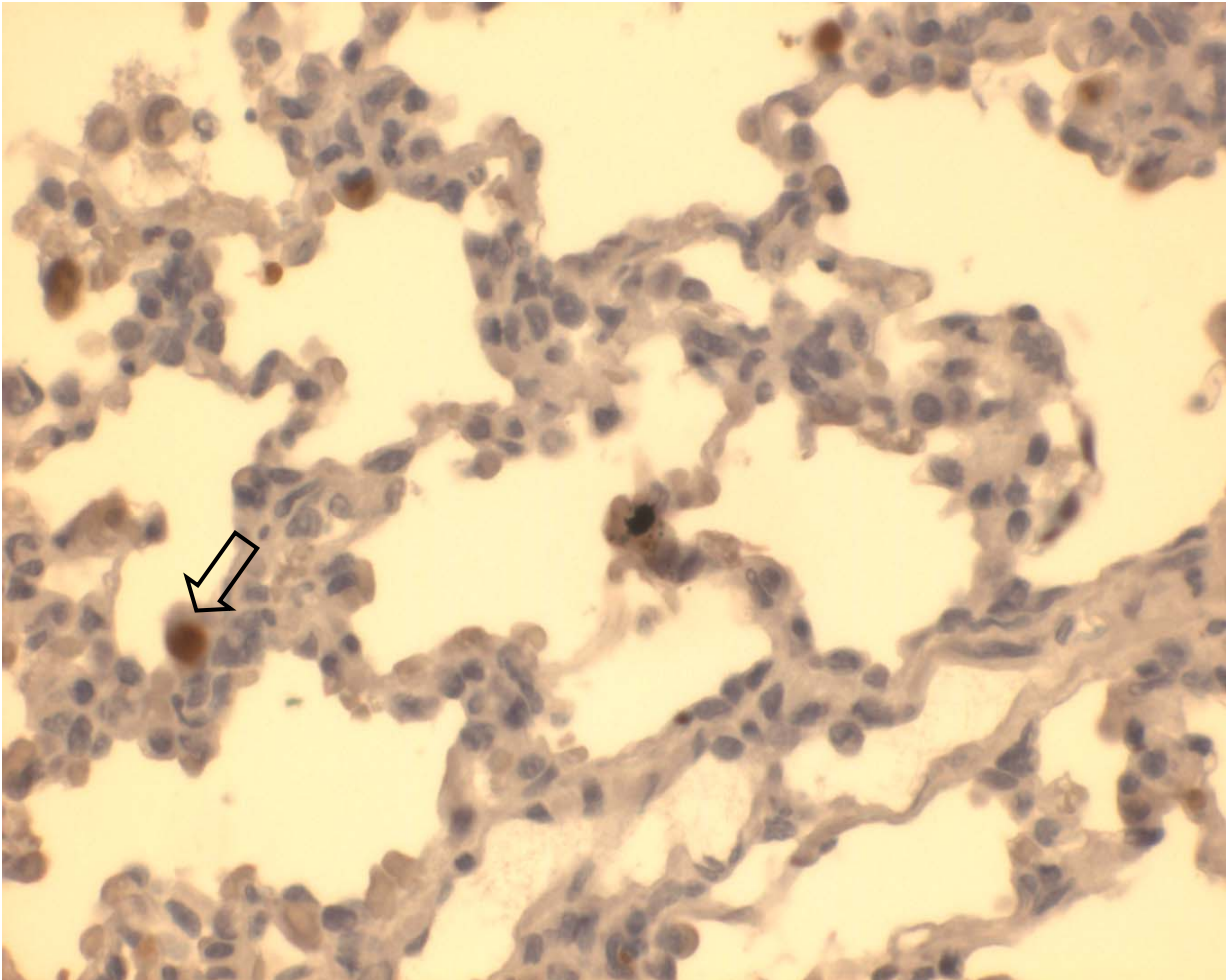


Abb. 4.8: Typische Lungenschnitte der Schweine 7 Stunden nach Induktion des akuten Lungenversagens. Zu sehen sind immunhistochemische Färbungen der CD3-positiven Zellen bei Tieren der ALI+LU-Gruppe. Diese Zellen sind braun angefärbt (Pfeil).
ALI = acute lung injury; ALI + LU = acute lung injury + LU-135252

Tab. 4.4: Mittelwerte der Makrophagen und CD3-positiven Zellen

	ALI	ALI+LU
Mittelwert Makrophagen [%]	12±1,6	8±0,45
Mittelwert CD3 pos. Zellen [%]	3,5±0,3	4,1±0,4

Tabelle 4.4: gemessene Werte der Makrophagen und der CD3-Zellen bei mit LU-135252 behandelten und unbehandelten Tieren. Die Signifikanz wurde mit dem Student's - T - Test errechnet. Die signifikanten Werte sind rot markiert. Die Werte waren alle normalverteilt. Es wurden jeweils die Mittelwerte aus allen untersuchten Gewebeschnitten errechnet. ALI=acute lung injury; ALI+LU=acute lung injury+LU-135252

Abb. 4.9: Makrophagenzahl 6h nach Induktion des ALI

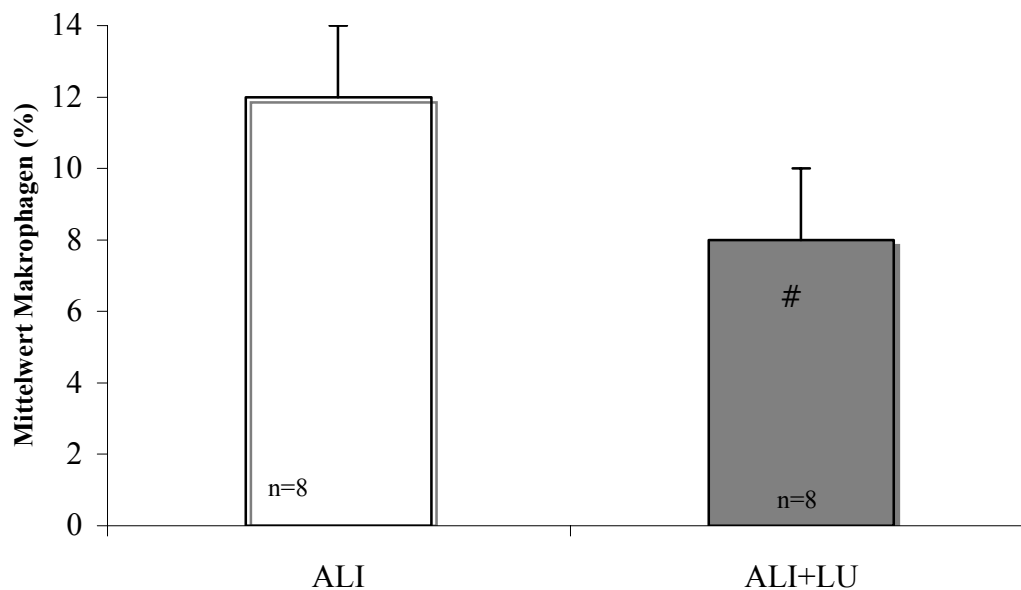


Abb. 4.9: gemessene Werte der Makrophagen nach 6h im Vergleich zwischen den behandelten und den unbehandelten Tieren. Die signifikanten Werte sind entsprechend markiert. Alle Werte waren normalverteilt. ALI=acute lung injury; ALI+LU=acute lung injury+LU-135252

4.5 biochemische Charakterisierungen

Bei der biochemischen Charakterisierung ging es darum, ob das Gewebe der nicht behandelten Tiere im Vergleich zu den behandelten Tieren spezifische entzündliche Veränderungen zeigt und somit eine Verbesserung der Entzündungssituation durch die Behandlung mit LU-135252 erzielt wurde.

Wir untersuchten mit Hilfe von dem im Methodenteil ausführlich erörterten Enzymimmunoassay folgende Werte im Gewebe:

- *Gehalt an Interleukin -1 β [pg/ml]*
- *Gehalt an Interleukin - 6 [pg/ml]*
- *Gehalt an TNF α [pg/ml]*
- *Gehalt an Endothelin [fmol/ml]*

Wir fanden im Lungengewebe der behandelten Tiere erniedrigte Werte an Interleukin-6, welche statistisch signifikant waren (*ALI: 7 \pm 1 pg/100mg Lungenfeuchtgewebe; ALI+LU: 4 \pm 1 pg/100mg Lungenfeuchtgewebe; $p < 0,05$).*

Die Werte von IL-1 β , an TNF α und auch von ET-1 waren hingegen nicht signifikant erniedrigt bei den behandelten Tieren. Dies wird in der unten angeführten Tabelle ersichtlich, in der alle Werte der biochemischen Charakterisierung aufgezeigt werden. Um einen übersichtlichen Vergleich zu schaffen wurden die Werte der histologischen Ergebnisse ebenfalls in die Tabelle mit aufgenommen.

Anschließend ist der signifikante Unterschied der Interleukin-6 - Werte als Balkendiagramm dargestellt. Die signifikanten Werte sind entsprechend markiert.

Tab. 4.5: Werte der biochemischen Charakterisierung im Vergleich

	ALI	ALI+LU
ET pro 100 mg Lungenfeuchtgewebe [fmol/ml]	3,6±0,8	3,6±0,9
TNFα pro 100 mg Lungenfeuchtgewebe [pg/ml]	6,9 ±0,6	6,3±0,3
IL -1β pro 100 mg Lungenfeuchtgewebe[pg/ml]	7,6±1	6,3±0,7
IL -6 pro 100 mg Lungenfeuchtgewebe [pg/ml]	7,0±0,9	4±0,9
Mittelwert Macrophages [%]	12±1,6	8±0,45
Mittelwert CD3 pos. Zellen[%]	3,5±0,3	4,1±0,4

Tabelle 4.5: gemessene Werte für die biochemische Charakterisierung bei behandelten und unbehandelten Tieren im Vergleich. Jeweils Mittelwert aus allen gemessenen Proben einer Versuchsgruppe, die Werte waren alle normal verteilt.

ALI = acute lung injury; ALI + LU = acute lung injury + LU-135252

Im Folgenden werden im Balkendiagramm die Differenzen der IL-6-Werte dargestellt.

Die signifikanten Werte sind entsprechend markiert.

Abb. 4.10: IL-6 - Werte im Vergleich

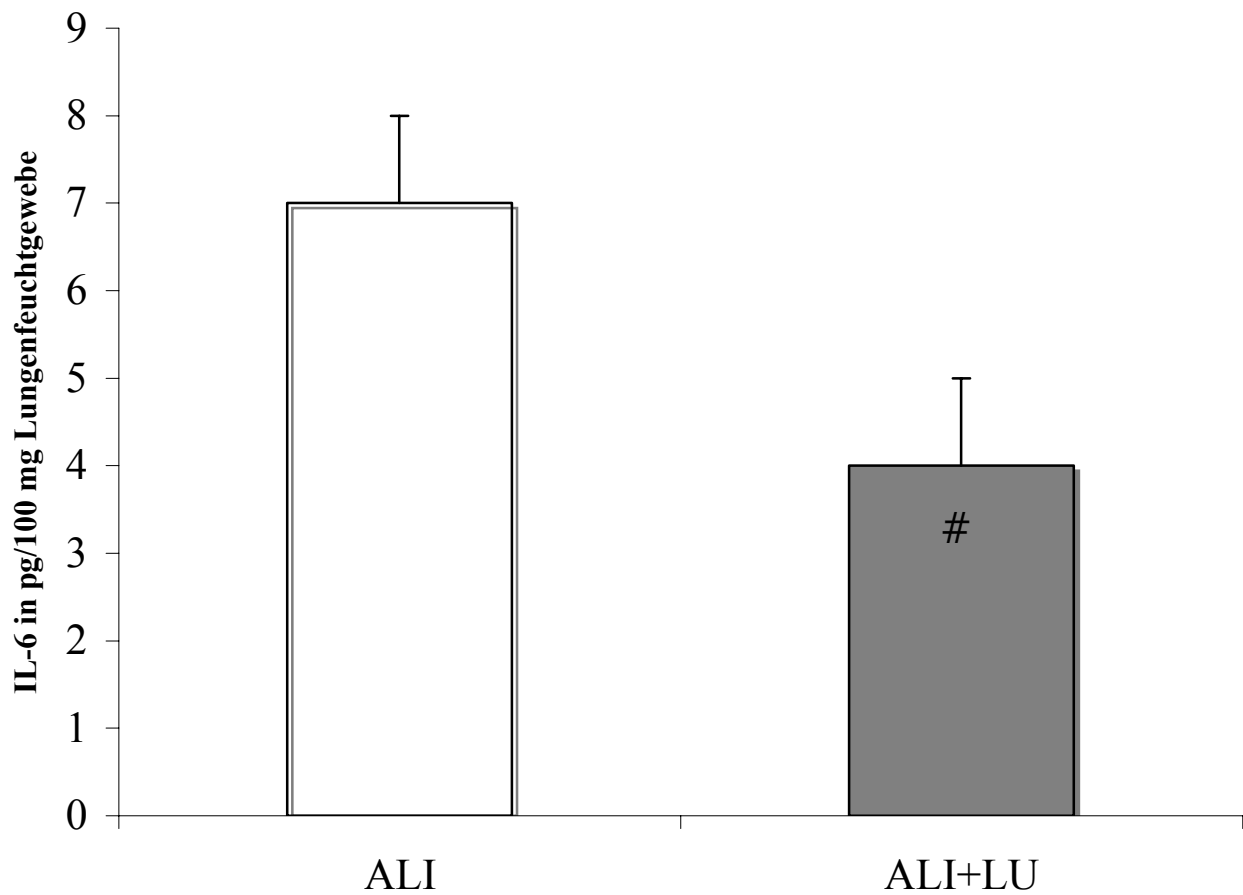


Abb. 4.10: IL-6-Werte im Vergleich bei den behandelten und unbehandelten Tieren, gemessen 6 h nach Induktion des ALI. Die signifikanten Werte sind entsprechend markiert. Alle Werte waren normalverteilt. ALI=acute lung injury; ALI+LU=acute lung injury+LU-135252

4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Inhalation von LU 135252 verbesserte signifikant die Sterblichkeit der mit LU 135252 behandelten Tiere und erhöhte den Sauerstoffpartialdruck bei den behandelten Tieren deutlich im Vergleich zu den Kontrollen (*ALI*: $53 \pm 3 \text{ mmHg}$ vs. *ALI+LU*: $316 \pm 47 \text{ mmHg}$).

Es wurde eine signifikante Reduktion von Makrophagen gemessen bei den behandelten Tieren (*Makrophagen*: *ALI*: $12 \pm 2\%$; *ALI+LU*: $8 \pm 1\%$). Die Anzahl der CD3-Zellen verbesserte sich jedoch nicht (*ALI*: $3,5 \pm 0,3\%$; *ALI+LU*: $4,1 \pm 0,4\%$).

Der Gehalt des Lungengewebes an IL-6 wurde signifikant verringert bei den mit LU-135252 behandelten Tieren (*ALI*: $7 \pm 1 \text{ pg/100mg Lungenfeuchtgewebe}$; *ALI+LU*: $4 \pm 1 \text{ pg/100mg Lungenfeuchtgewebe}$).

Die Konzentration der anderen biochemisch erfaßten Parameter wurde durch die Behandlung nicht signifikant verändert.

