

**Universitätsklinikum Ulm**  
**Institut für Anästhesiologische Pathophysiologie und**  
**Verfahrensentwicklung**

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. h. c. P. Radermacher

**Effekte einer Beatmung mit 100 % Sauerstoff auf**  
**die posttraumatische Inflammationsantwort der**  
**Lunge nach stumpfem Thoraxtrauma bei**  
**zigarettenrauchexponierten sowie gesunden**  
**Mäusen**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der  
Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

von Lucia Lupetto

geboren in Göppingen

2017

**Amtierender Dekan:** Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth

**1. Berichterstatter:** PD Dr. med. Katja Wagner

**2. Berichterstatter:** PD Dr. med. Miriam Kalbitz

**Tag der Promotion:** 14.12.2018

## **Meinen Eltern**

**Teile dieser Arbeit sind erschienen in:**

Wagner K, Groger M, McCook O, Scheuerle A, Asfar P, Stahl B, Huber-Lang M, Ignatius A, Jung B, Duechs M, Moller P, Georgieff M, Calzia E, Rademacher P, Wagner F: Blunt chest trauma in mice after cigarette smoke-exposure: Effects of mechanical ventilation with 100 % O<sub>2</sub>. Public Library of Science One, 10: 1 – 20 (2015)

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Das stumpfe Thoraxtrauma .....	1
1.2	Die COPD .....	4
1.3	Hyperoxie .....	5
1.4	Reaktive Sauerstoffspezies (ROS).....	6
1.5	Oxidativer Stress .....	7
1.6	Fragestellung .....	8
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>9</b>
2.1	Verwendete Geräte und Materialien.....	9
2.2	Versuchstiere und Versuchsgruppen .....	18
2.3	Zigarettenrauchexposition .....	18
2.4	Versuchsablauf .....	19
2.5	Comet Assay .....	23
2.6	Westernblot .....	28
2.7	Statistische Auswertung .....	32
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>33</b>
3.1	Physiologische Parameter.....	33
3.2	Quantifizierung der DNA-Schädigung mittels Comet Assay .....	36
3.3	Messung der Expression von Stress - und Apoptoseproteinen im Lungengewebe .....	38
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>43</b>
4.1	Zigarettenrauch-vermittelte Effekte nach Thoraxtrauma .....	43
4.2	Hyperoxie vermittelte Effekte nach Thoraxtrauma .....	46
4.3	Limitationen der Studie.....	51
4.4	Schlussfolgerung und Ausblick .....	52

<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>53</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>74</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>75</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
AK	Antikörper
ALI	akute Lungenschädigung (acute lung injury)
AMV	Atemminutenvolumen
APS	Adenosin-5'-phosphosulfat
ARDS	Acute respiratory distress syndrome (Atemnotsyndrom des Erwachsenen)
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BE	Base Excess (Basenabweichung)
β-MSH	Beta-Mercaptoethanol
bidest.	Bidestilliert
BGA	Blutgasanalyse
BSA	Bovines Serumalbumin
CCD	Charge Coupled Device (Digitaler Kamerasensor)
CM	Colormarker
cmH <sub>2</sub> O	Zentimeter-Wassersäule
CO	Kohlenstoffmonoxid
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease (Chronisch obstructive Lungenerkrankung)
Cst	Compliance (Dehnbarkeit)
CT	Computertomographie
P450	<i>von</i> Cytochrom P450 (Hämproteine mit enzymatischer Aktivität)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
E	Einheit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
Est	Elastance (Elastizität)
Fas	<i>auch</i> Cluster of differentiation (Unterscheidungsgruppen) sind immunphänotypische Oberflächenmerkmale von Zellen

FasL	Fas-Ligand
FiO <sub>2</sub>	Fraction of inspired oxygen (inspiratorischer Sauerstoffanteil/ Sauerstofffraktion)
FKS	Fetales Kälberserum
G	Gauge
Gluc.	Glucose
Hb	Hämoglobin
HCL	Salzsäure
Hct	Hämatokrit
HF	Herzfrequenz
HIF-1 $\alpha$	Hypoxie-induzierter Faktor-1 $\alpha$
HO-1	Hämoxygenase-1
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
ICD-10	International Classification of Diseases, 10th Edition (Internationale Klassifikation von Krankheiten)
IgG	Immunglobulin G
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
IL-18	Interleukin 18
i.p.	Intraperitoneal
kDA	Kilodalton
KG	Körpergewicht
konz.	Konzentriert
K-W ANOVA	Kruskal-Wallis one-way analysis of variance (Kruskal-Wallis Test)
LMP	Low melting point (niedriger Schmelzpunkt)
M	Molar
mA	Milliampère
MAP	Mean arterial pressure (mittlerer arterieller Druck)
MCP-1	Monocyte chemotactic protein 1 (Monozyten-chemotaktisches Protein 1)
MEEO	Medium-electro-endoosmosis

MICU	Mouse intensive care unit
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mM	Millimolar
Mmol	Millimol
mtDNA	Mitochondriale DNA
MV	Minute ventilation (Atemminutenvolumen)
MZP	Messzeitpunkt
n	Anzahl
N	Nativ
Na	Natrium
NA	Noradrenalin
NaCl	Kochsalz
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOH	Natronlauge
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NO	Stickstoffmonoxid
NP	Nonylphenolethoxylat
n.s.	nicht signifikant
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OH	Hydroxid
OI	Oxygenierungsindex
OP	Operation
p	<i>auch</i> p-Wert, Überschreitungswahrscheinlichkeit, Signifikanzwert
p(a)CO <sub>2</sub>	(Arterieller) Kohlendioxidpartialdruck
p(a)O <sub>2</sub>	(Arterieller) Sauerstoffpartialdruck
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PEEP	Positive end-expiratory pressure (Positiver-endexpiratorischer Druck)
pH	Potentia hydrogenii (negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität, dimensionslos)
P insp	Inspiratorischer Druck
PK	Positivkontrolle
PNPP	Para-Nitrophenylphosphat
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck

PONV	Postoperative nausea and vomiting (Postoperative Übelkeit und Erbrechen)
Resp. R	Atemfrequenz
ROS	Reactive oxygen species (Reaktive Sauerstoffspezies)
Rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
SB	Sample buffer (Probenpuffer)
s.c.	Subkutan
SD	Semi dry (halbtrocken)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SOD	Superoxiddismutase
TBS	Tris-buffered Saline (dreifach gepufferte Salzlösung)
TBST	Tris-buffered Saline with Tween20 (dreifach gepufferte Salzlösung mit dem Tensid Tween20)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Temp	Temperatur
tHb	Totales Hämoglobin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
Tris-Base	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol)
TXT	Thoraxtrauma
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
Vs	Versus
Vt	Tidalvolumen = Atemzugsvolumen
v/v	Volume per volume (Volumen pro Volumen)
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
Wt	Wildtyp
w/v	Weight per volume (Gewicht pro Volumen)

# 1 Einleitung

Das Thoraxtrauma und die COPD (Chronisch obstruktive Lungenerkrankung) sind zwei Krankheitsentitäten, die beide einen großen Anteil an Morbidität und Mortalität in unserer Gesellschaft haben [42,69,118].

In der vorliegenden Arbeit soll evaluiert werden, ob die Zigarettenrauchexposition, eine der häufigsten Verursacher der COPD [5,42], die durch ein stumpfes Thoraxtrauma verursachten Schäden an der Lunge verschlimmert und ob die kurzfristige Beatmung mit 100 % O<sub>2</sub> protektiv wirken kann.

## 1.1 Das stumpfe Thoraxtrauma

### 1.1.1 Epidemiologie

Verkehrsunfälle sind eine der Haupttodesursachen weltweit. Laut WHO gibt es jährlich über 1,2 Millionen Tote Menschen im Straßenverkehr [137]. In Deutschland waren es 2016 fast 400000 Verunglückte bei Verkehrsunfällen, ca. 3200 davon starben an ihren Verletzungen [119]. Mit 44,7% ist das Thoraxtrauma, nach den Kopfverletzungen, das führende Verletzungsmuster [69]. Das Auftreten eines Thoraxtraumas spielt eine entscheidende Rolle für die Prognose von Polytraumatisierten. So konnten Trupka et al. zeigen, dass die Letalität dieser Patienten von 4% auf 25% steigt, wenn ein stumpfes Thoraxtrauma zum Verletzungsmusters gehört [125].

Die häufigsten Unfallursachen mit erhöhtem Risiko für Thoraxverletzungen sind Hochrasanztraumen im Straßenverkehr, Verschüttungen und Stürze aus großer Höhe [112,126]. Die stumpfe Krafteinwirkung auf den Brustkorb, oft Scherkräfte, die zum Beispiel bei Autounfällen durch das schnelle Abbremsen entstehen [22], zieht als eine der häufigsten Folgen eine Lungenkontusion nach sich [21,87].

### 1.1.2 Die Lungenkontusion und ihre Folgen

Mit 30-60% stellt die Lungenkontusion die häufigste Folge des Thoraxtraumas bei Polytraumatisierten dar und ist eine akut lebensbedrohliche Situation [126]. So zeigten Gaillard et al., dass die Mortalitätsrate signifikant stieg, wenn Traumapatienten unter einer Lungenkontusion litten [39].

Für die Ausbildung der Lungenkontusion sind drei Mechanismen verantwortlich:

1. Die Alveolarruptur: Sie entsteht beim Erstkontakt mit der Druckwelle und wird „spalling effect“ (spalling=abplatzen) genannt. 2. Abriss der Alveolen vom Hilusgewebe: Gewebe mit unterschiedlicher Dichte werden durch die Druckwelle unterschiedlich stark beschleunigt und es kommt zum Abreisen, hier spricht man vom „inertial effect“ (inertial=träge). 3. Die Überblähung: Sie wird beschrieben als „implosion effect“, bei der es am Ende der Druckwelle zur massiven Gasausdehnung in den Atemwegen kommt. [20-22]

Diese Mechanismen führen zu histologischen Veränderungen, die in Tiermodellen beschrieben wurden [41,115,128]. Durch die Ruptur der Alveolen und der benachbarten Kapillaren kommt es zu intraalveolären und interstitiellen Einblutungen, was im Verlauf zu Permeabilitätsstörungen der Lungenstrombahn und schließlich zum interstitiellen Ödem führt. Kollabierte Alveolen und Ansammlungen von Erythrozyten, sowie die Einwanderung von Entzündungszellen, wie zum Beispiel neutrophilen Granulozyten, gehören zum mikroskopischen Bild [41,115,128]. Es kommt zunächst zu einer lokalen Entzündungsreaktion. Abgesehen von dieser lokalen Reaktion kommt es zudem zu einer systemischen Entzündungsreaktion, was der Anstieg von Zytokinen, wie IL-6 und TNF- $\alpha$ , im Plasma zeigt. [51,63,96]

Neben Tierversuchen konnten retrospektive Studien an verschiedenen Patientenpopulationen Veränderungen der Lungenmechanik und des Lungenparenchyms als Folgen der Kontusion nachweisen. Es wurde regelmäßig eine Abnahme der Compliance der Lunge festgestellt und mittels apparativer Diagnostik konnten Verschattungen in Lungenarealen nachgewiesen werden, die auf Atelektasen und Ödeme schließen ließen. Der Oxygenierungs-/ Horowitz-index ( $p_aO_2/FiO_2$ ), der zur Quantifizierung des Lungenparenchymschadens herangezogen wurde, war deutlich erniedrigt und ließ in den meisten Fällen die Diagnose einer akuten Lungenschädigung (ALI) oder sogar eines Atemnotsyndroms des Erwachsenen (ARDS) zu [6,82,105].

Neben der, durch das stumpfe Thoraxtrauma entstehenden, lokalen und systemischen Inflammationsantwort konnte gezeigt werden, dass es im Lungenparenchym auch zur Apoptose kommt. Liener et al. zeigten, dass neben der histologisch erhöhten Apoptoserate auch eine signifikante Erhöhung des

Enzyms Caspase stattfand - einem der wichtigsten Marker für den programmierten Zelltod [70,133].

### 1.1.3 ARDS

Erstmals beschrieben, jedoch noch nicht so bezeichnet, wurde das ARDS 1967 von Asbaugh et al.. Sie stellten fest, dass bei einer Population von beatmeten Patienten einige nicht auf die gängige Therapie ansprachen. Klinisch und mikroskopisch hatten die Symptome starke Ähnlichkeit mit dem infantilen Atemnotsyndrom [6]. Das akute Lungenversagen ist also eine Form einer akuten diffusen entzündlichen Lungenschädigung. Klinisch zeichnet es sich durch Hypoxämie und erniedrigte Lungen-Compliance aus [97]. Mikroskopisch lassen sich dieselben Veränderungen wie bei der Lungenkontusion feststellen.

Tabelle 1: Erstveröffentlichung in Intensiv-News, Ausgabe 3-13: Abb.2: Berlin-Definition des ARDS (adaptiert nach Ranieri M, 2011; Report from ESICM consensus conference into a new definition for ARDS; Vortrag auf dem ESCIM-Kongress, Lissabon) [97,113]. ARDS (Atemnotsyndrom des Erwachsenen), PaO<sub>2</sub> (arterieller Sauerstoffpartialdruck), FiO<sub>2</sub> (inspiratorischer Sauerstoffanteil), mmHg (Millimeter Quecksilbersäule), PEEP (positiver-endexpiratorischer Druck), cmH<sub>2</sub>O (Zentimeter-Wassersäule), CT (Computertomographie).

<b>ARDS</b>			
	<b>Mild</b>	<b>Moderat</b>	<b>Schwer</b>
<b>Zeit</b>	Akuter Beginn <u>innerhalb von einer Woche</u> bei bekannten Risikofaktoren oder neuen/sich verschlechternden respiratorischen Symptomen		
<b>Hypoxämie</b>	PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> <u>201-300 mmHg</u>	PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> <u>101-200 mmHg</u>	PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> <u>≤ 100 mmHg</u>
	beurteilt bei einem PEEP von 5 cmH <sub>2</sub> O		
<b>Ursache des Ödems</b>	Das <u>respiratorische Versagen</u> kann nicht vollständig durch ein Herzversagen oder eine Hypervolämie erklärt werden. Ausschluss eines kardialen Lungenödems mittels <u>Echokardiografie</u>		
<b>Bildgebung</b>	<u>Bilaterale Verschattung oder „Verdichtung“</u> (CT, Röntgen)		

Risikofaktoren für die Ausbildung eines akuten Lungenversagens können pulmonaler oder extrapulmonaler Genese sein. So zum Beispiel Pneumonie und Aspiration, sowie Polytrauma mit Schock, Massentransfusion und Pankreatitis [54]. In Bezug auf die vorliegende Arbeit ist eine prospektive Studie von Calfee et al. besonders hervorzuheben. Diese zeigte, dass sowohl Aktiv- als auch Passivrauchen stark mit der Entwicklung einer ALI (mildes ARDS) nach stumpfen Thoraxtrauma assoziiert ist [15].

## **1.2 Die COPD**

### **1.2.1 Epidemiologie**

Unserer Gesellschaft ist weitgehend bekannt, dass Nikotinkonsum Lungenkrebs verursachen kann. Dass das Rauchen auch andere Erkrankungen, wie die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) zur Folge hat, dringt jedoch nur langsam in das Bewusstsein.

Laut WHO sind weltweit 210 Millionen Menschen von COPD betroffen, im Jahre 2015 starben ungefähr 3 Millionen Menschen an dieser Erkrankung. Damit zählt die COPD zu den zehn häufigsten Todesursachen der Welt [136,138]. Ein stetiger Anstieg bis 2030 wird prognostiziert [5].

Der Todesursachenstatistik des statistischen Bundesamtes zufolge starben im Jahre 2015 in Deutschland 13773 Frauen und 17300 Männer an den Folgen der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (ICD-10:J44). Das sind 3,4% aller Todesfälle in der Bundesrepublik für das Jahr 2015. Mit 45,5% macht die COPD fast die Hälfte aller Sterbefälle durch Atemwegserkrankungen (ICD-10:J00-J99) aus. [118] Auch bei den durch Lungenerkrankungen verursachten Rentenfällen durch verminderte Erwerbsfähigkeit nimmt die COPD mit 67% einen hohen Stellenwert ein. Eine Zunahme der Zahlen für Todes- und Rentenfälle in den letzten Jahren zusammen mit dem Anstieg der Prävalenz mit zunehmendem Alter, stellt die Bundesrepublik in Zukunft, vor allem mit Hinblick auf die Alterung der Gesellschaft, vor eine große gesundheitsökonomische Herausforderung. [7]

### **1.2.2 Pathomechanismus**

Die COPD ist definiert als eine diffuse Erkrankung der kleinen Luftwege mit Zerstörung des Lungenparenchyms bis hin zum Emphysem. Anders als beim Asthma bronchiale zeichnet sich die chronisch obstruktive Lungenerkrankung

durch eine persistierende Atemflussbehinderung aus, die nicht vollständig reversibel ist. Diese entsteht als Folge einer chronisch inflammatorischen Antwort der Lunge auf schädliche Gase oder Partikel. Der wichtigste Risikofaktor ist das Rauchen, aber auch andere exogene Faktoren wie die Luftverschmutzung durch Feinstaub aus Verkehr und Industrie tragen wesentlich zur Entstehung der COPD bei. Ein wichtiger endogener, genetischer Risikofaktor ist der  $\alpha_1$ -Antitrypsinmangel [5,42,48].

Der Gewebsschaden der Lunge entsteht unter anderem durch ein Ungleichgewicht zwischen Proteasen und Antiproteasen. Dies wurde erstmals beim  $\alpha_1$ -Antitrypsinmangel durch Laurell und Eriksson beschrieben [67,129]. Hierbei entsteht der Schaden durch das Fehlen der Antiprotease  $\alpha_1$ -Antitrypsin, die normalerweise vor allem die Elastase hemmt. Diese Protease wird unter anderem bei Entzündungsreaktionen in der Lunge durch neutrophile Granulozyten ausgeschüttet. Durch exogene Stimuli erhöht sich die Zahl dieser Leukozyten. Nikotin als solch exogener Stimulus ist wegen der hohen Prävalenz von COPD bei Rauchern gut untersucht. Man geht davon aus, dass Nikotin eine chemotaktische Funktion besitzt und in den Lungenkapillaren zur vermehrten Auswanderung von Neutrophilen und Makrophagen in die Alveolen führt. Diese werden durch Chemokine aktiviert und entlassen Granula, die Elastase und andere proteolytisch aktiven Enzyme enthalten. Im Überschuss können diese nicht mehr durch Antiproteasen inhibiert werden und führen zur Gewebsschädigung, indem sie Peptidbindungen durch Hydrolyse spalten und so die Alveolarmembran zerstören. Außerdem enthält Zigarettenrauch reaktive Sauerstoffspezies, die zu einer Imbalance zwischen Oxidanzien und Antioxidanzien führen. Die Beschädigung des Lungenparenchyms wird durch diesen oxidativen Stress noch verstärkt. Die freien Radikale führen zu einem Circulus vitiosus, da sie wiederum in das Gleichgewicht der Proteasen und Antiproteasen eingreifen, indem sie Letztere inaktivieren [64].

### **1.3 Hyperoxie**

In dieser Studie sollen unter anderem die Auswirkungen einer Beatmung mit 100 % O<sub>2</sub> überprüft werden. Seit Jahren wird über die Vor- und Nachteile der Hyperoxie diskutiert. Sowohl positive als auch negative Effekte von Sauerstoff werden in

einer Gegenüberstellung von Danzeisen et al. und Suttner et al. beschrieben [27,121]. Die Sauerstofftoxizität resultiert aus der Entstehung und Wirkung freier Sauerstoffradikale, die nach längerfristiger Beatmung zu einem hyperoxischen Lungenschaden führen und auch andere Organe schädigen können. Außerdem komme es schon nach kurzfristiger Anwendung von hohen inspiratorischen Sauerstoffkonzentrationen zur Ausbildung von Atelektasen [121]. Dem gegenüber sprächen die Reduktion von postoperativen Wundinfekten, die erhöhte Sicherheitsbreite bei unerwarteten Atemwegsproblemen und die Reduktion von PONV (Postoperative Übelkeit und Erbrechen) durch eine hohe inspiratorische Sauerstoffkonzentration eindeutig für eine routinemäßige Verwendung dieser [27]. Auch Calzia et al. sprechen sich in einer Zusammenschau von Studien für die Anwendung von 100 % Sauerstoff aus, da die mechanische Beatmung unter Hyperoxie die Gewebeoxygenierung steigere und der kurzzeitige Gebrauch keine Gewebsschädigung verursache [16].

Von besonderem Interesse für die vorliegende Arbeit ist vor allem der beschriebene Effekt auf die Lunge. Bei septischem Schock konnten histomorphologische Schäden und die Apoptoserate der Lunge durch lungenprotektive Beatmung mit 100 % O<sub>2</sub> deutlich reduziert werden [9, 46].

Die negativen Auswirkungen der Hyperoxie werden unter Anderem durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) verursacht [61] und unter normobaren Bedingungen ist vor allem die Lunge das Organ, das den größten Schaden nimmt [127]. Barth et al. zeigten wiederum in einem tierexperimentellen Modell, dass die Beatmung mit 100 % O<sub>2</sub> zu keinem Anstieg des oxidativen Stresses führte [9].

#### **1.4 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)**

Die Sauerstofftoxizität ist in der intrazellulären Bildung von teilweise reduzierten Sauerstoffprodukten, wie zum Beispiel Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Superoxid (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) und dem Hydroxylradikal (OH) begründet [59]. Ein freies Radikal ist jedes Atom oder Molekül mit ungepaartem Elektron, das für eine Zeit lang unabhängig existieren kann [60]. Da Elektronen in gepaartem Zustand jedoch am stabilsten sind [75], streben sie danach ein Elektron mehr zu besitzen oder Eines abzugeben [60]. Treffen sie also auf Nicht-Radikale beginnt eine Kettenreaktion des Elektronentransfers [60], was sie zu hochreaktiven Substanzen macht. Als ROS

werden alle Radikale und Chemikalien zusammengefasst, die an Radikal-ähnlichen Reaktionen teilhaben können, selbst aber keine wirklichen Radikale sind, also keine ungepaarten Elektronen haben [75].

Die mitochondriale Atmungskette stellt die wichtigste intrazelluläre, nicht-enzymatische Bildungsquelle von ROS in den meisten Geweben dar, indem O<sub>2</sub> durch ein „Leck“ Elektronen zugespielt werden [127]. Enzymatisch entstehen ROS beispielsweise durch die NADPH-Oxidase [35] oder durch Cytochrom P450-abhängige Oxygenasen [24].

### **1.5 Oxidativer Stress**

ROS sind normalerweise unproblematisch, solange sie durch Antioxidantien neutralisiert werden. Diese stoppen die Kettenreaktion der Radikale, indem sie diese entfernen, den angerichteten Schaden wieder reparieren oder gar ihre Bildung verhindern [60].

Zu diesen Radikalfängern gehören sowohl enzymatische, wie die Superoxiddismutase (SOD), die Katalase und die Gluthation-Peroxidase, als auch nicht-enzymatische, wie zum Beispiel Pyruvate oder Flavine. Ist die Balance zwischen den Antioxidantien und den Radikalen gestört spricht man von oxidativem Stress und es kommt zu Veränderungen an Proteinen, Lipiden und der DNA [35]. Der Prozess der Lipidperoxidation durch ROS ist einer der wesentlichen toxischen Effekte, da dadurch Zellmembranen geschädigt werden. Dies hat unter anderem zur Folge, dass die dabei entstehenden Peroxylradikale die DNA angreifen [75]. Costa et al. beschreiben, dass durch die enge Assoziation der mitochondrialen DNA zur inneren mitochondrialen Membran, wo ROS im Überfluss produziert werden, die mtDNA geschädigt werden kann [25]. Zu den entstehenden Schäden gehören Strangbrüche und Basenmodifikationen, die bis hin zu Mutationen und sogar zum Zelltod führen können [79].

Der oxidative Stress, also die Imbalance zwischen Oxidanzien und Antioxidanzien, entsteht durch verschiedenste Prozesse. Für diese Arbeit von Bedeutung ist die vermehrte Bildung von ROS bei der Entzündungsreaktion, wie zum Beispiel beim ARDS, durch die beteiligten phagozytierenden Zellen [35], die Entstehung von oxidativem Stress durch die Lungenkontusion [41,115,123,128] und der Tatsache, dass Zigarettenrauch freie Radikale enthält [64].

Zum Nachweis des oxidativen Stresses wurde in dieser Studie zum einen die Bestimmung der DNA-Strangbrüche mittels Einzelzel - Gelelektrophorese herangezogen. Zum anderen wurde die Aktivität der Hämoxigenase-1 (HO-1) durch Western Blot ermittelt. Studien zeigten, dass das Isoenzym HO-1 bei oxidativem Stress hochreguliert wird, da es zur Zytprotektion dient [43,98,130], wodurch dieses Enzym also zur Quantifizierung des oxidativen Stresses herangezogen werden kann. Außerdem konnten Wagner et al. zeigen, dass HO-1 als Stressantwort bei durch Thoraxtrauma verursachter Lungenkontusion signifikant ansteigt [133]. Außerdem wurde die Konzentration des als O<sub>2</sub>-Sensor bezeichneten Transkriptionsfaktors Hypoxie-induzierter Faktor (HIF) bestimmt. Dieser gilt als wichtigster Mediator bei der Anpassung des Organismus an unterschiedliche Versorgungszustände mit Sauerstoff [47]. Er akkumuliert bei Hypoxie in der Zelle [57,73] und sei schon bei Normoxie nicht mehr messbar [47]. Der Transkriptionsfaktor besteht als Heterodimer aus zwei Einheiten; einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit. Die  $\alpha$ -Untereinheit wird unter normoxischen Sauerstoffpartialdrücken durch eine Prolylhydroxylase dem Proteasom zugeführt und so abgebaut. Sie ist also die sauerstoffabhängige Untereinheit, dessen Konzentration als Parameter mittels Western Blot bestimmt wurde [12,73].

## **1.6 Fragestellung**

Im Rahmen dieses Versuchsvorhabens sollen an anästhesierten, volumensubstituierten und beatmeten Mäusen folgende Hypothesen getestet werden:

1. Zigarettenrauch kann post-traumatische sowie ventilations-assoziierte Lungenschäden verschlimmern.
2. Eine kurzzeitige Beatmung mit 100 % Sauerstoff kann die posttraumatische sowie die durch Zigarettenrauchexposition verursachte Inflammationsantwort der Lunge abschwächen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Geräte und Materialien

#### 2.1.1 Operationsgeräte

- Arterieller Druckmesser:  
DC-Bridge Amplifier und Brückenverstärker FMI GmbH, Seeheim-Ober Beerbach
- Beatmungsgerät: FlexiVent Scireq Inc., Montréal, Kanada
- Intraoperatives Tierbewärmungssystem  
IOW-3704 FMI GmbH, Seeheim-Ober Beerbach
- Mikroskop: OPMI Pico Carl Zeiss AG, Oberkochen
- Narkosegerät: Sulla 19 Drägerwerk AG, Lübeck
- Perfusor: 11 Plus Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA
- Radiometer: ABL 700 Series Radiometer GmbH, Willich
- Rasierer: Contura Wella GmbH, Schwalbach am Taunus

#### 2.1.2 Operationsmaterialien

- Arterieller Katheter: Ø 0,28mm \* 0,62 mm FMI GmbH, Seeheim-Ober Beerbach
- Augengel: Vidisic® Bausch & Lomb GmbH, Berlin
- Blasenkatheter:  
30cm, Ø 1,2mm \* 2,2mm Verlängerungsleitung B.Braun AG, Melsungen  
24 G (0,7mm \* 19 mm, 24 ml/min) Kanüle BD GmbH, Bad Wörishofen
- Buprenorphin, Temgesic® Reckitt Benckiser Group plc., Slough, UK
- Custodiol® Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Bensheim

- Dreiwegehahn: Discifix® B.Braun AG, Melsungen
- Fäden: Silkam 5/0, 4/0, Prolene 5/0, PDS\*II 6/0 Ethicon, Johnson&Johnson Medical GmbH, New Brunswick, NJ, USA
- Fentanyl, Fentanyl-hameln® Hameln Pharmaceuticals GmbH, Gloucester, UK
- Formalin 3,5-3,7% Otto Fischar GmbH, Saarbrücken
- Heparin-Natrium B.Braun AG, Melsungen
- Intratracheal Tubus: selbst gebaut aus Kunststoffschlauch, Adapter und abgeschliffener 18G Kanüle
- Jonosteril 500 ml, freeflex, 1/1 E Fresenius SE & Co. KGaA, Bad Homburg
- Kanülen: unterschiedliche Größen, Sterican® B.Braun AG, Melsungen
- Ketamin 10% WDT, Garbsen
- Midazolam, Midazolam-ratiopharm® Ratiopharm GmbH, Ulm
- Norepinephrin, Arterenol® Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt
- Operationsbesteck (sterilisiert) WPI Inc., Sarasota, FL, USA
- Sevofluran 100% (V/V) Abbott GmbH&Co.KG, North Chicago, IL, USA
- Spritzen: unterschiedliche Volumina, Plastipak™ BD GmbH, Bad Wörishofen
- Tetraspan® 6% (HES), 500 ml, Ecobag® B.Braun AG, Melsungen
- Venenkatheter: selbst gebaut, Ø 0,2 mm \* 0,4 mm

### 2.1.3 Laborgeräte

- Blotting System: Trans-Blot® SD Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
- Eismaschine: Scotsman AF 80 Frimont S.p.A., Mailand, Italien
- Elektrophorese WB: Mini-Protean™ Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA

- Elektrophoresekammer: Sub-Cell® GT Basic Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
- Entwicklermaschine: CP 1000 AGFA-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien
- Gefrierschrank (-80°C) Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
- Heizblock: Mixing Block MB-102 Bioer Technology Co. LTD, Hangzhou, Zhejiang, China
- Homogenisator: Ultra Turrax T25 IKA GmbH & Co. KG, Staufen
- Kochplatte: RCTbasic IKA GmbH & Co. KG Staufen
- Kühlschrank: Glass Line Liebherr, Bulle, Schweiz
- Makro-Pipettierhilfe Reichelt Chemietechnik GmbH & Co., Heidelberg
- Mikroskop: B x 41 Olympus GmbH, Shinjuku, Tokio, Japan
- Photometer: GeneQuantpro GE Healthcare Corp., Buckinghamshire, UK
- Pipetten: Eppendorf Research und Reference Eppendorf AG, Hamburg
- Schüttler: Shaker S4 LTF GmbH & Co. KG, Wasserburg/Bodensee
- Spannungsversorgung: Consort E 835 LTF GmbH & Co. KG Wasserburg/Bodensee
- Ultraschall-Homogenisator: Sonopuls Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
- Vortex/Kreisschüttler Bender & Hobein AG, München
- Waage: XS 205 Dual Range Mettler Toledo Inc., Gießen
- Wasserbad GFL GmbH, Burgwedel
- Zentrifuge: Eppendorf Centrifuge 5424 R Eppendorf AG, Hamburg

#### 2.1.4 Verbrauchsmaterialien

- Abtropfgestell: Nalgene  
Thermo Fisher Scientific Inc.  
Waltham, MA, USA
- Bechergläser (verschiedene Volumina)  
Schott AG, VWR GmbH,  
Darmstadt
- Clinitubes 85, 55, 35 µl  
Radiometer GmbH, Willich
- Cryotubes® 2 ml  
Sigma-Aldrich, Steinheim
- Deckgläser: Menzel-Gläser 24x60 mm  
Menzel GmbH,  
Braunschweig
- Einmal-Pasteurpipetten 10 ml Cellstar®  
Greiner bio-one AG,  
Kremsmünster, Österreich
- Erlenmeyerkolben (verschiedene Volumina)  
Schott AG, Mainz
- Farbküvette nach Hellendahl  
VWR GmbH, Darmstadt
- Amersham Hyperfilm ECL (18\*24 cm)  
GE Healthcare Corp.,  
Buckinghamshire, UK
- Cronex 5 (18\*24 cm)  
AGFA-Gevaert N.V., Mortsel,  
Belgien
- Filterpapier: Chromatography paper 3 mm,  
Whatman  
GE Healthcare Corp.,  
Buckinghamshire, UK
- Gaze: Porengröße 200 µm, 70 µm  
Sefar AG, Heiden, Schweiz
- Microvette® 500 µl  
Sarstedt AG & Co.,  
Nümbrecht
- Micro-Test Tubes 1,5 ml  
Eppendorf AG, Hamburg
- Mikroliterspritze: Microlitre Syringes 50 µl  
Hamilton Messtechnik  
GmbH, Höchst im Odenwald
- Nitrozelluloasemembran: Trans-Blot 0,45 µm,  
Amersham Hybond ECL  
GE Healthcare Corp.  
Buckinghamshire, UK
- Objektträger: Super Premium Microscope Slides  
VWR GmbH, Darmstadt
- Probengefäße 20 ml  
Sarstedt AG & Co.,  
Nümbrecht
- Schraubdeckeltubes Falcon®  
BD GmbH, Bad Wörishofen

- Zellkulturplatten: Cellstar®

Greiner bio-one AG,  
Kremsmünster, Österreich

### 2.1.5 Chemikalien und Reagenzien

- Acrylamid/Bis Solution 29:1

Serva Electrophoresis  
GmbH, Heidelberg

- Ampuwa Spüllösung: Plastipur®

Fresenius SE & Co. KGaA,  
Bad Homburg

- APS

Sigma-Aldrich, Steinheim

- Bromphenolblau

Sigma-Aldrich, Steinheim

- BSA

Sigma-Aldrich, Steinheim

- $\beta$ -Glycerolphosphat

Sigma-Aldrich, Steinheim

- $\beta$ -MSH

Sigma-Aldrich, Steinheim

- DMSO

Sigma-Aldrich, Steinheim

- DTT

Sigma-Aldrich, Steinheim

- EDTA

AppliChem GmbH,  
Darmstadt

- EGTA

Sigma-Aldrich, Steinheim

- Ethanol 99,8%

Sigma-Aldrich, Steinheim

- Ethidiumbromid

Carl Roth GmbH & Co. KG,  
Karlsruhe

- FKS

Biochrom AG, Berlin

- Glycerol

Sigma-Aldrich, Steinheim

- Glycin

Sigma-Aldrich, Steinheim

- Leupeptin

Sigma-Aldrich, Steinheim

- LMP-Agarose

Sigma-Aldrich, Steinheim

- MEEO-Agarose

MERCK KGaA., Darmstadt

- Methanol

Sigma-Aldrich, Steinheim

- Milchpulver

Carl Roth GmbH & Co. KG,  
Karlsruhe

- NaCl

Sigma-Aldrich, Steinheim

- NaOH (1M)

AppliChem GmbH,  
Darmstadt

- Na-Vanadat Sigma-Aldrich, Steinheim
- NP 40 Sigma-Aldrich, Steinheim
- PBS: gibco® Thermo Fisher Scientific Inc.,  
Waltham, MA, USA
- PNPP MERCK KgaA., Darmstadt
- Ponceau S Sigma-Aldrich, Steinheim
- Salzsäure VWR GmbH, Darmstadt
- Salzsäure rauchend VWR GmbH, Darmstadt
- SDS Carl Roth GmbH & Co. KG,  
Karlsruhe
- TEMED Sigma-Aldrich, Steinheim
- Tris-Base Sigma-Aldrich, Steinheim
- Triton X-100 Sigma-Aldrich, Steinheim
- Trypsin-EDTA Lösung (einfach) Sigma-Aldrich, Steinheim
- Tween-20 Serva Electrophoresis  
GmbH, Heidelberg

### 2.1.6 käufliche Analysekits

- Chemolumineszenz  
20X LumiGLO® Reagent and 20X Peroxide Cell Signaling Inc.,  
Cambridge, UK
- Color-/Farbmarker: Kaleidoscope™, Precision  
Plus Protein™ Standards Bio-Rad Laboratories Inc.,  
Hercules, CA, USA
- Erstantikörper  
Anti-HIF-1α Thermo Fisher Scientific,  
Waltham, MA, USA  
Cleaved Caspase-3 Cell Signaling, Inc., Danvers,  
MA, USA  
HO-1 Abcam, NY, USA  
Actin Santa Cruz Biotechnology,  
Inc., Santa Cruz, CA, USA  
Vinculin Santa Cruz Biotechnology,

- Proteaseinhibitorcocktail: Complete Mini<sup>®</sup> Inc., Santa Cruz, CA, USA  
La Roche AG Inc., Basel, Schweiz
- Positivkontrolle: Caspase-3 Control Cell Extracts Cell Signaling, Inc.,  
Cambridge, UK
- Zweitantikörper  
HRP-gekoppelter AK Cell Signaling, Inc., Danvers,  
MA, USA/ Santa Cruz  
Biotechnology, Inc. Dallas,  
TX, USA

### 2.1.7 Standardlösungen, Puffer und Medien

Soweit nicht anders beschrieben wurden alle Lösungen mit bidest. H<sub>2</sub>O hergestellt.

- Comet Assay:

Alkali-Elektrophoresepuffer	300 mM NaOH 1 mM Na <sub>2</sub> EDTA mit NaOH-Plätzchen bis pH > 13
Färbelösung	5 µg/ml Ethidiumbromid
LMP-Agarose	5 mg/ml LMP-Agarose in PBS
Lyse-Stammlösung	2,5 M NaCl 100 mM Na <sub>2</sub> EDTA 10 mM Tris-Base mit NaOH-Plätzchen bis pH 10
Lysepufferlösung	42,5 mM Triton X-100 1,41 M DMSO in Lyse-Stammlösung
Neutralisationspuffer	48,5 mg/ml Tris-Base rauchende HCl bis pH 7,5
- Westernblot:

Block-Puffer	TBS-Puffer (einfach) 0,1% Tween-20 5% w/v Milchpulver (gelöst)
Blotting-Puffer (einfach)	240 mM Tris Base 190 mM Glycin

	6,42 mmol SDS
	20% Methanol
EMSA-Puffer (einfach)	10 mM Tris/HCl pH 7,9
	50 mM NaCl
	1 mM EDTA
	1 mM DTT
	1% Glycerol
	10 µg BSA
Entwicklerlösung	20X LumiGlo® + 20X Peroxid im Verhältnis 1:10
Erstantikörper Dilutionspuffer	TBS-Puffer (einfach)
	5% BSA
	0,1% Tween-20
	H <sub>2</sub> O (Ampuwa Spüllösung)
Ladekontrollen Dilutionspuffer	Block-Puffer
Laufpuffer (zehnfach, pH 8,8)	1,9 M Glycin
	250 mM Tris Base
	35 mmol SDS
Lysepuffer (zweifach)	100 mM Tris/HCL pH 7,5
	500 mM NaCl
	6 mM EDTA
	6 mM EGTA
	2% Triton X-100
	1% NP 40
	20% Glycerol
mit Proteaseinhibitoren	0,1 mM Na-Vanadat
	2 mM PNPP
	2 mM DTT
	1 mM β-Glycerolphosphat
	10 µM Leupeptin
Sammelgel	4,5% Acrylamid
	Sammelgelpuffer (vierfach)
	1% TEMED
	10% APS

Sammelgelpuffer (vierfach)	H <sub>2</sub> O (Ampuwa Spüllösung) 0,5 M Tris Base 0,4% SDS HCl konz. bis pH 6,8
Sample Buffer nach Laemmli (zweifach)	208 mmol SDS 1 M Tris/HCl pH 6,8 20% Glycerol 8% β-MSH
TBS-Puffer	15,4 mM Tris/HCl (pH 7,6) 136 mM NaCl 0,05% Bromphenolblau
TBST-/Wasch-Puffer	TBS-Puffer (einfach) 0,1% Tween-20
Trenngel/Laufgel	7,5% / 10% / 12% / 15% Acrylamid Trenngelpuffer (vierfach) 1% TEMED 10% APS
Trenngelpuffer (vierfach)	H <sub>2</sub> O (Ampuwa Spüllösung) 1,5 M Tris Base 0,4% SDS HCl konz. bis pH 8,8
Zweitantikörper Dilutionspuffer	Block-Puffer

### 2.1.8 Software

Comet Assay IV	Perceptive Instruments, Haverhill, UK
Flexivent 5.2	Scireq Inc., Montréal, Kanada
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
Image J 1.4.3.67	National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
Microsoft Office Excel 2003	Microsoft, Redmond, WA, USA
Labchart 6.1.3	AD Instruments, Dunedin, Neuseeland
Microsoft Office Excel 2003	Microsoft, Redmond, WA, USA

## 2.2 Versuchstiere und Versuchsgruppen

Der Antrag für das folgende Versuchsvorhaben wurde bei der zuständigen Behörde des Regierungspräsidiums Tübingen gestellt und genehmigt (Reg.-Nr. 1046).

Als Versuchstiere wurden männliche und weibliche Wild-Typ Mäuse (C57BL/6J, Charles River Laboratories, Kisslegg, Deutschland) mit einem durchschnittlichen Gewicht von 23g und einem Alter von 10-16 Wochen verwendet. Bevor die Tiere in den Versuch eingeschlossen wurden, wurden sie mindestens eine Woche lang im Tierforschungszentrum der Universität Ulm gehalten. Dort hatten die Tiere freien Zugang zu Futter und Wasser und einen Tag-Nach-Rhythmus von 12 Stunden.

Die Erhebung, der für die Fragestellung relevanten Daten, erfolgte an folgenden Gruppen, in welche die Tiere durch Randomisierung eingeteilt wurden:

1. Thoraxtrauma: Wt NonCOPD, TXT, Normoxie ( $FiO_2 = 0,21$ ) (n = 7)
2. Thoraxtrauma: Wt COPD, TXT, Normoxie ( $FiO_2 = 0,21$ ) (n = 8)
3. Thoraxtrauma: Wt NonCOPD, TXT, Hyperoxie ( $FiO_2 = 1,0$ ) (n = 8)
4. Thoraxtrauma: Wt COPD, TXT, Hyperoxie ( $FiO_2 = 1,0$ ) (n = 9)

## 2.3 Zigarettenrauchexposition

Zur Induktion einer chronischen Entzündungsreaktion der Lunge beim Kleintier durch Zigarettenrauch wurde ein bewährtes Protokoll eingesetzt [140].

Dieser vorbereitende Versuchsteil zur Provokation einer COPD wurde in der Abteilung Nonclinical Drug Safety Germany, Gruppe Biological Laboratory Service (BLS II), der Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG in Biberach/Riss, durchgeführt. In Bezug auf die erste Hypothese wurden dort 17 der 32 Tiere in isoliert ventilierten Käfigen der Firma Tecniplast, Typ Green Line, gehalten. Dies sind 32-Liter Plexiglas-Expositionskammern mit Bodenheizung, um reproduzierbare konstante Umgebungstemperaturverhältnisse zu schaffen. Nach einer einwöchigen Akklimatisierungsphase wurden die Versuchstiere drei bis vier Wochen intermittierend dem Rauch von kommerziell erhältlichen Zigaretten (Roth-Händle ohne Filter, Teer 10mg, Nikotin 1mg, Kohlenmonoxid 6 mg, badische Tabakmanufaktur Roth-Händle®, Lahr, Deutschland), ausgesetzt.

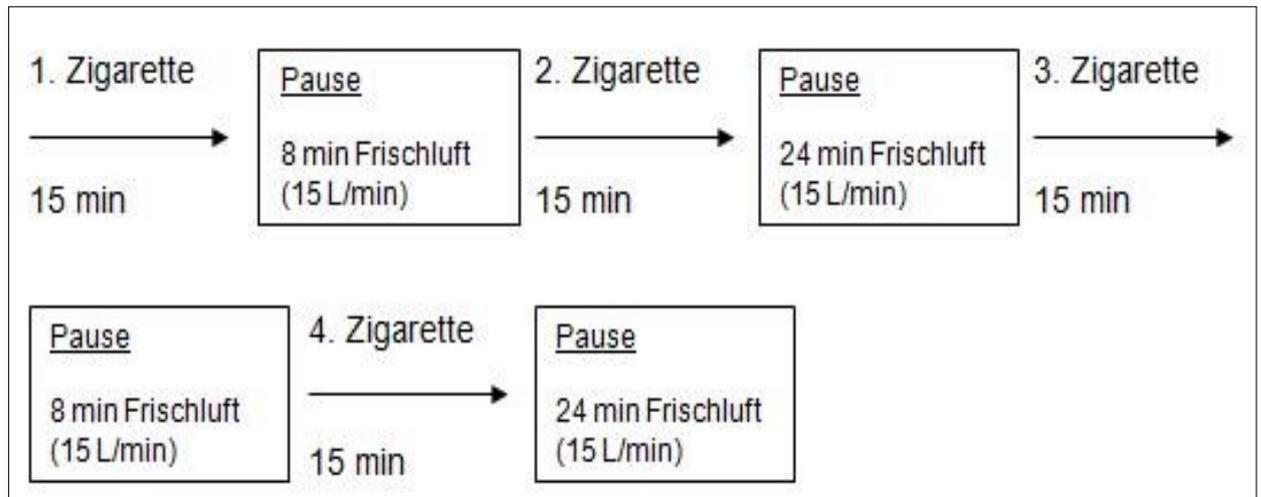


Abbildung 1: Schema der Zigarettenrauchexposition

An Tag 1 wurden die Tiere gegenüber dem Rauch von 4 Zigaretten exponiert, an Tag 2 von 6 und ab dem 3. Tag für die weitere Zeit dem Rauch von 8 Zigaretten. Um kontrollierte Bedingungen zu schaffen, was Rauchexposition und Schadstoffkonzentration angeht, wurden ein halbautomatischer Zigarettenanzünder, ein mit elektrischer Zeitschaltung ausgestatteter Rauchgenerator und ein Umgebungsschadstoffmonitor (MicroDust Pro, Casella, Amherst, NH, USA) eingesetzt.

Nach erfolgter Zigarettenrauchexposition und gründlicher Untersuchung auf Transportfähigkeit wurden diese Tiere in das Tierforschungszentrum der Universität Ulm transportiert. Nach einer weiteren Woche wurden die Tiere in den Versuch eingeschlossen. Diese Erholungsphase diente dazu die Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse durch eine akute Stressreaktion auf die Zigarettenrauchexposition auszuschließen.

## 2.4 Versuchsablauf

Der Ablauf des Versuches gliederte sich in zwei Abschnitte. Nach adäquater Narkoseeinleitung erfolgte zunächst die Induktion des Thoraxtraumas, der sogenannte „Blast“, und die Instrumentierung des Tieres. Im Anschluss folgte die Beobachtungs- und Messphase.

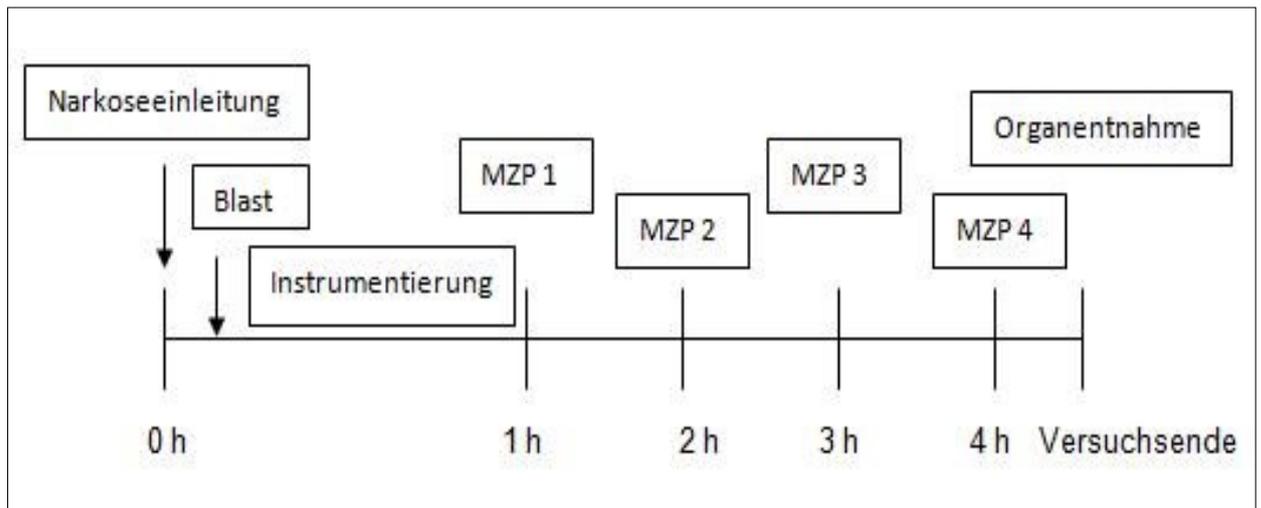


Abbildung 2: Versuchsablauf. MZIP (Messzeitpunkt).

### 2.4.1 Induktion des stumpfen Thoraxtraumas

Die Grundlage für die Induktion eines Thoraxtraumas bei Kleintieren lieferte ein erprobtes Modell [55,56], welches durch Forschergruppen der Universität Ulm zur Anwendung auf Mäuse modifiziert [63] und durch mehrfachen Einsatz etabliert wurde [62,92,133].

Vor der Induktion des Traumas kamen die Tiere zunächst in einen Glasbehälter mit Sevofluran-Atmosphäre bis sie ihr Bewusstsein verloren. Auf einer Heizmatte wurde die Narkose der spontanatmenden Tiere über eine Maske mit  $FiO_2=0,6$ , einem Flow von 2l/min und 1,5-3 Vol% Sevofluran fortgeführt. Zur Analgesie wurde den Tieren gewichtsadaptiert 1  $\mu$ g/kg Buprenorphin subkutan in die Nackenfalte injiziert. Anschließend wurde die Maus in Rückenlage auf der Heizmatte fixiert, Hals und Bauch rasiert und die Mitte des Sternums, das Xyphoid und der Rippenbogen angezeichnet. Das Tier wurde nun so unter dem sogenannten Blaster positioniert, dass der Mittelpunkt der Austrittsöffnung zentral über dem Sternum stand und der Abstand zum Thorax 1,9 cm betrug.

Der Blaster, oder auch Druckwellengenerator, bestand aus einem Schlauchsystem, durch welches komprimierte Luft geleitet wurde. Die Austrittsöffnung war durch eine Polyestermembran (Mylar, Du Pont de Nemur, Bad Homburg, Deutschland) verschlossen. Überschritt der Druck, der durch das System geleiteten Luft, die Zerreißspannung der Membran, wurde innerhalb von wenigen ms eine Druckwelle von 1 bar präzise über dem Thorax des Tieres abgegeben. Die Druckwelle wurde bei Inspiration des Tieres ausgelöst.

Ziel dieses Systemaufbaus war es das Thoraxtrauma so zu induzieren, dass die Untersuchung einer gleichseitigen, isolierten Lungenkontusion ermöglicht wurde, ohne dabei Verletzungen anderer innerer Organe oder Skelettstrukturen zu verursachen, welche die Entzündungsreaktion beeinflussen könnten.

#### **2.4.2 Tiermodell-Mouse Intensive Care Unit**

Zur Überwachung der Tiere nach Thoraxtrauma kam in diesem Versuch das etablierte Konzept der „Mouse Intensive Care Unit“ zur Anwendung [3,10,11,133]. Es simuliert am Kleintier die klinischen Bedingungen auf einer Intensivstation und ermöglicht unter Anderem pharmakologische Interventionen zu untersuchen. Dies dient dazu die gewonnenen Ergebnisse als neue Therapieschemata auf klinische Situationen übertragen zu können.

#### **2.4.3 Instrumentierung**

Unmittelbar nach dem Thoraxtrauma bekamen die Mäuse intraperitoneal Ketamin ( $85 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ), Midazolam ( $0,90 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ) und Fentanyl ( $0,18 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ) appliziert und wurden auf dem Operationstisch unter dem Operationsmikroskop positioniert und fixiert.

Tiere, die durch Atemversagen nach Narkose oder Induktion des Traumas durch Pneumo- und Hämatothoraces starben, wurden ausgeschlossen.

Eine Kontrolle der Körperkerntemperatur erfolgte durch die Verbindung der rektalen Temperatursonde der Tiere mit einer Wärmeplatte, auf der sie lagen. Durch kontinuierliche Messung und einen Feedback-Mechanismus wurde so für die Konstanthaltung der Körpertemperatur von  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  gesorgt.

Nun erfolgte der Hautschnitt am Hals für die bevorstehende Tracheotomie. Der Thymus und die Muskulatur über der Trachea wurden stumpf nach lateral hin abpräpariert und der Trachealschnitt erfolgte kaudal des Kehlkopfes. Als Tubus fungierte eine Spitzenkanüle (Größe 18 G). Die Tiere der Versuchsgruppen unter Normoxie wurden mit Raumluft ( $21\% \text{ O}_2$ ) beatmet, die Tiere der Versuchsgruppen unter Hyperoxie wurden mit  $100\% \text{ O}_2$  beatmet. Sobald die Intubation vollzogen war wurde das erste Blähmanöver zur Rekrutierung eventuell entstandener Atelektasen durchgeführt. Dazu wurde ein inspiratorischer Druck bis  $18 \text{ cmH}_2\text{O}$  für 5s aufgebaut. Anschließend wurde die erste Compliancemessung der Lunge aufgezeichnet. Diese erfolgte durch ein Druck-Volumen-Manöver, indem der

Beatmungsdruck schrittweise bis zu maximal 20 cmH<sub>2</sub>O inspiratorischem Druck gesteigert wurde.

Im nächsten Schritt wurde der Venenkatheter in die Vena jugularis dextra gelegt. Dazu wurde stumpf bis auf die Vene präpariert, sie wurde kanüliert und mit Hilfe eines Infusionsbesteckes sofort an den Perfusor angeschlossen.

Über diesen venösen Zugang wurde die Narkose aus Ketamin 100-150 µg \* g<sup>-1</sup> \* h<sup>-1</sup>, Midazolam 0,2-0,3 µg \* g<sup>-1</sup> \* h<sup>-1</sup> und Fentanyl 1-1,5 µg \* g<sup>-1</sup> \* h<sup>-1</sup> mit einer Flussrate von 0,6 ml \* h<sup>-1</sup> fortgeführt. Diese wurde je nach Narkosebedarf und Vitalparametern angepasst. Es wurde Volumen durch Tetraspan 6% 12 µl \* g<sup>-1</sup> \* h<sup>-1</sup> substituiert. Die Flussrate wurde nach 30 Minuten auf 0,005 ml \* g<sup>-1</sup> \* h<sup>-1</sup> halbiert, da der Volumenbedarf während der ersten halben Stunde durch Flüssigkeitsverschiebungen aufgrund der Narkose höher war. Zur Aufrechterhaltung eines MAPs von > 50 mmHg wurde, wenn die Volumengabe nicht ausreichend war, ergänzend Noradrenalin perfundiert (3 µg \* ml<sup>-1</sup>).

Zur kontinuierlichen, invasiven Blutdrucküberwachung wurde ein arterieller Katheter in die Arteria carotis communis dextra eingebracht. Auch diese wurde stumpf freipräpariert und kanüliert. Vor dem Anschluss an das Druckmessgerät wurden 55 µl Blut für die erste Blutgasanalyse (BGA) entnommen.

Das Operationsfeld wurde durch Rückverlagerung des Drüsenlappens und der Muskeln, so wie der Abdeckung durch einen Tupfer locker verschlossen und während der Überwachung regelmäßig befeuchtet.

Die Bauchdecke wurde mittels eines Längsschnittes oberhalb der Blase eröffnet und das Peritoneum eingeschnitten. Die so freipräparierte Blase wurde punktiert und der Katheter schließlich an der Haut fixiert. Peritoneum und Haut wurden zweischichtig durch eine kleine Naht verschlossen. Der Blasenkateter diente zur Überwachung der Gesamtdiurese.

#### **2.4.4 Messphase**

Nach der Instrumentierung folgte die vierstündige Messphase auf der MICU.

Der erste Messzeitpunkt (MZP) erfolgte eine Stunde nach Thoraxtrauma, die weiteren drei dann im Stundentakt. Es wurden kontinuierlich Herzfrequenz, mittlerer arterieller Blutdruck sowie Körpertemperatur erfasst.

Zu allen MZPs, außer zu MZP2, wurden Blutproben entnommen, woraus die Blutgase und der pH-Wert bestimmt wurden.

Außerdem wurden die Beatmungsparameter stündlich festgehalten.

Es wurde eine lungenprotektive, druckkontrollierte Beatmung durchgeführt. Dies setzte ein Tidalvolumen von 4-6 ml \* kg<sup>-1</sup>KG voraus. Dazu wurden entsprechend der Versuchsgruppe eine FiO<sub>2</sub> von 0,21/1,0 und ein Verhältnis von Inspirationszeit zu Expirationszeit von 1:2 (33,33%) bei einem PEEP von 3 cmH<sub>2</sub>O, eingestellt. Die Atemfrequenz wurde entsprechend so gewählt, dass stets ein mittlerer arterieller pCO<sub>2</sub> von 30 – 40 mmHg erreicht wurde. Die druckkontrollierte Beatmung erfolgte über die Applikation eines inspiratorischen Druckes über einen PEEP von 3 cmH<sub>2</sub>O, der über den arteriellen paO<sub>2</sub> titriert wurde. Wenn das Verhältnis von paO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>, also der Horowitz- bzw. Oxygenierungsindex (OI) > 300 war konnte der PEEP bei 3 cmH<sub>2</sub>O belassen werden. Lag der OI zwischen 200-300 wurde der PEEP auf 5 cmH<sub>2</sub>O und bei OI < 200 auf 8 cmH<sub>2</sub>O gesteigert. Zur Rekrutierung von entstandenen Atelektasen wurde alle 30 min ein Blähmanöver der Lunge durchgeführt.

#### **2.4.5 Materialgewinnung**

Nach vier Stunden wurde das Tier, durch Blutentnahme aus dem in der Arteria carotis liegenden Katheter, getötet. 30-50 µl des Blutes wurden in einem Mikrotesttube für den Comet Assay auf Eis gelegt.

Nach dem Tod des Tieres wurde umgehend der Thorax eröffnet und die Organe entnommen.

¼ der rechten Lunge wurden bei -80°C bis zur Verarbeitung für den Westernblot schockgefroren. Der Rest der rechten Lunge wurde für den Comet Assay in ein Gefäß mit PBS-Puffer gegeben.

### **2.5 Comet Assay**

#### **2.5.1 Grundlagen**

Die Einzelzell - Gelelektrophorese, oder einfach ausgedrückt der Comet Assay, ist eines der etabliertesten Verfahren um DNA-Schäden von zellkernhaltigen Geweben zu quantifizieren [8]. Die DNA an sich, genauer ausgedrückt das Zucker-Phosphat-Gerüst, ist negativ geladen, weshalb sie im elektrischen Feld in Richtung Anode wandert. Beim Comet Assay werden die Zellen in ein Agarosegel eingebettet, durch dessen Poren die DNA nur wandern kann, wenn durch Strangbrüche kleinere Fragmente entstanden sind. Das heißt, je stärker die DNA

geschädigt ist, je mehr Brüche sie also hat, desto mehr DNA bewegt sich von der Stelle des ehemaligen Zellkerns in Richtung Pluspol [8]. Durch die hier verwendete Alkalimethode konnten, im Gegensatz zur Neutralmethode, nicht nur Doppelstrangbrüche, sondern auch Einzelstrangbrüche, alkalilabile Stellen, DNA-Quervernetzungen und Basenabweichungen identifiziert werden [88]. Dies repräsentiert eine große Bandbreite an DNA-Schäden.

Durch einen fluoreszierenden Farbstoff können die DNA-Fragmente unter einem UV-Mikroskop sichtbar gemacht werden. Sie erscheinen aufgrund ihrer unterschiedlichen Laufstrecke, bedingt durch ihr Molekulargewicht, wie der Schweif eines Kometen. Je stärker die DNA geschädigt ist, desto mehr DNA wird im Kometenschweif sichtbar [8]. Das Ausmaß der DNA-Schädigung kann im Anschluss mit Hilfe bestimmter Computerprogramme, anhand verschiedener Parameter bestimmt werden.

### **2.5.2 Herstellung Agarose-beschichteter Objektträger**

Die Notwendigkeit der Beschichtung der Objektträger liegt darin, dass die mit den Proben vermischte LMP-Agarose später besser auf den Objektträgern haftet.

Zur Herstellung der 1,5%igen MEEO-Agarose werden 1,5 g Agarose mit 100 ml PBS (für etwa 100 Objektträger) in einen Erlenmeyerkolben gegeben und in einer Mikrowelle zweimal sprudelnd aufgekocht, so dass die Agarose sich komplett in PBS löst, das PBS jedoch nicht zu stark verdunstet. Im 60°C warmen Wasserbad wird die Agarose für die Zeit der Beschichtung flüssig gehalten.

Es wurden Objektträger mit Mattrand benutzt, auf welchen eine Bleistiftmarkierung zur Kennzeichnung der Oberseite angebracht wurde. Vor der Beschichtung wurden die Objektträger sorgfältig mit einem fusselreien Tuch gereinigt. Sie wurden dann einzeln in die Agarose mit dem unmattierten Ende voran eingetaucht. Hierbei war darauf zu achten, dass auch die mattierte Fläche bis zur Hälfte beschichtet wurde, um eine bessere Haftung zu erlangen. Die Rückseite musste gründlich abgewischt werden. Auf einer horizontalen Ablagevorrichtung, zur gleichmäßigen Trocknung, wurden die Objektträger bis zur Durchtrocknung bei Raumtemperatur abgelegt.

### **2.5.3 Herstellung der LMP-Agarosealiquote**

Zur Untersuchung der Vollblut- und Organproben wurde 0,5%ige LMP-Agarose benötigt. Dazu wurden 100 mg LMP-Agarose mit 20 ml PBS, wie schon in 2.7.2

beschrieben, aufgeköcht. Im Anschluss wurden jeweils 120 µl in Micro-Test-Tubes aliquotiert und bei 4°C für die weitere Verwendung gelagert.

#### 2.5.4 Probeneinbettung und Lyse

Da die Proben zeitnah verarbeitet werden mussten, bedurfte es gewissen Vorbereitungen. Zunächst wurden zwei Objektträger pro Probe entsprechend beschriftet und jeweils ein Agarose-Aliquot pro Objektträger im Wasserbad verflüssigt. Diese wurden anschließend im Heizblock wieder auf 37°C zurückgekühlt, um eine Beschädigung der Blutbestandteile durch Hitze zu verhindern.

Die Lysepufferlösung wurde in eine Plastikküvette pipettiert und bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Triton X-100 diente dazu Proteine aus ihrer Membran zu lösen. DMSO, ein Lösungsmittel, verhinderte die Kristallbildung bei Kälte und somit die weitere Schädigung der DNA. Die Lyse-Stammlösung diente dem Zellerfall durch die Auflösung von Membranen.

Bevor die Materialgewinnung in der MICU abgeschlossen war, wurde die Zellkulturplatte entsprechend dem folgenden Schema pipettiert.

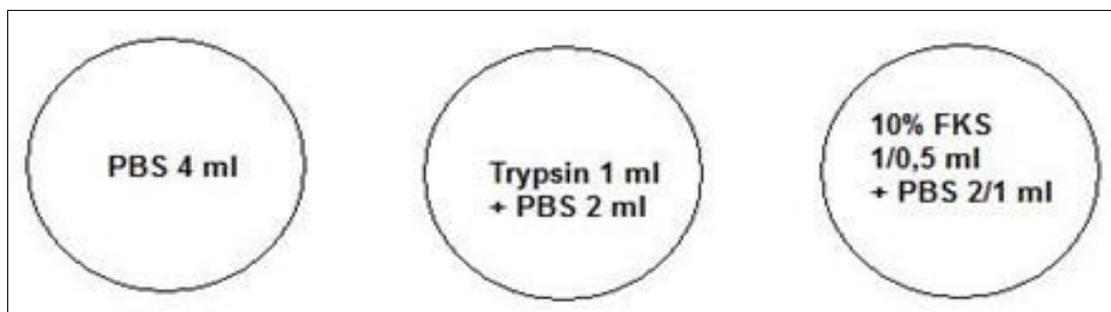


Abbildung 3: Pipettierschema zur Aufbereitung des Lungengewebes der Mäuse. FKS (fetales Kälberserum), PBS (phosphatgepufferte Salzlösung).

Von der auf Eis gelagerten heparinisierten Vollblutprobe wurden 5 µl in die flüssige LMP-Agarose pipettiert, gut vermischt und gleichmäßig auf den vorbereiteten Objektträger gegeben. Mit einem Deckglas versehen wurden die zwei so präparierten Objektträger bei 4°C zum Aushärten für 4 bis maximal 10 Minuten in den Kühlschrank gelegt. Nach dieser Zeit wurden die Deckgläser entfernt. Dabei war darauf zu achten, dass man diese im rechten Winkel zur Migrationsrichtung der DNA-Bruchstücke bei der Elektrophorese abzog, um eventuell dadurch entstandene Artefakte bei der Auswertung zu erkennen und ausschließen zu

können. Zur Zellyse wurden die Objektträger in die mit Lysepufferlösung vorbereiteten Küvetten eingebracht und lichtgeschützt für mindestens eine und maximal 48 Stunden im Kühlschrank bei 4°C belassen. Lichtgeschützt mussten die Objektträger sein, um weiteren lichtinduzierten DNA-Schäden vorzubeugen. Die Lyse löst die Zellmembranen auf, wodurch die DNA freigesetzt wird. Die Agarose verhindert jedoch die frühzeitige Wanderung der DNA und hält diese in Form des abgebauten Zellkerns an Ort und Stelle.

Das Lungengewebe wurde zunächst vorsichtig mit einem scharfen Einmalskalpell zerkleinert, bevor es für 15 Minuten in den PBS-Puffer der vorbereiteten Zellkulturplatte gelegt wurde. Danach wurden die Gewebefragmente für weitere 15 Minuten in Trypsin inkubiert. Trypsin ist ein Gemisch aus Verdauungsenzymen und dient in diesem Fall dazu, die extrazellulären Proteine aufzulösen. Da die Inkubationszeit auf 15 Minuten begrenzt war, blieben die Zellen intakt. Nun wurde über dem Gefäß mit FKS und PBS die grobe Gaze (120 µm) gespannt und das Gewebe durch diese mit einem Glasstab in die Flüssigkeit hinein gerieben. Zuletzt wurde das so entstandene Gemisch mit einer Pipette durch das feinere Netz (70 µm) gepresst, um alle noch enthaltenen Membran- und Gewebebestandteile zu entfernen. Durch das enthaltene FKS wird die Enzymreaktion des Trypsins gegen die Zellbestandteile beendet, da FKS einen Überschuss an Substraten enthält, die die Enzyme binden. Von diesem Gemisch wurden jeweils 20 µl in die flüssige Agarose gegeben. Anschließend wurde wie mit der Blutprobe weiterverfahren.

Es wurden jeweils zwei Objektträger pro Probe präpariert, um Unterschiede zwischen Objektträgern der gleichen Probe als Fehlerquelle ausschließen zu können und Verluste zu verhindern.

### **2.5.5 Alkalidenaturierung und Elektrophorese**

Die Elektrophoresekammer wurde in eine mit Eiswasser gefüllte Wanne gestellt und mit einem Elektrophoresepuffer, der auf 4°C temperiert war, aufgefüllt. Die Objektträger wurden alle in derselben Ausrichtung auf die Ablagefläche der Kammer gelegt, sodass der Mattrand der Objektträger in Richtung Kathode zeigte. Nun wurde die Kammer soweit mit dem Elektrophoresepuffer gefüllt, bis die Objektträger mit einer dünnen Schicht benetzt waren. Der Deckel der Kammer wurde geschlossen und zusätzlich mit einem Tuch abgedeckt, so dass die Alkalidenaturierung lichtgeschützt für 25 Minuten erfolgen konnte. In dieser Zeit

wurde die DNA entspiralisiert, Einzel- in Doppelstrangbrüche überführt und auch die anderen Formen der DNA-Schädigung, wie zum Beispiel alkalilabile Stellen, wurden aufgrund des alkalischen Milieus in Strangbrüche überführt. Nach Ablauf der Zeit wurde die eigentliche Elektrophorese im Puffer, der auch schon bei der Alkalidenaturierung verwendet wurde, durchgeführt. Hierzu wurde über den Spannungsgenerator eine Spannung von 25 V angelegt. Da der dabei entstandene Stromfluss vom Flüssigkeitsvolumen abhängig war, musste Puffer gegebenenfalls hinzu- oder abpipettiert werden, bis bei gegebener Spannung ein Stromfluss von 300 mA erreicht wurde. Das Funktionsprinzip der Elektrophorese ist in Kapitel 2.5.1 erklärt.

Wenn nicht alle Plätze besetzt werden konnten, mussten die restlichen mit leeren Objektträgern aufgefüllt werden.

#### **2.5.6 Neutralisierung und Dehydrierung**

Nach der Elektrophorese wurden die Objektträger auf ein Abtropfgitter gelegt und dreimal für jeweils fünf Minuten mit Neutralisationspuffer beschichtet. Dieser diente der Neutralisierung möglicher Reste der vorher verwendeten Materialien, wie Basen oder Salzen.

Abgewaschen wurde der Puffer indem die Objektträger vorsichtig in einer Küvette mit destilliertem Wasser geschwenkt wurden. Danach kamen sie für fünf Minuten in eine Küvette mit 99,8% Ethanol zur Dehydrierung.

Lichtgeschützt wurden die Objektträger horizontal liegend für mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

#### **2.5.7 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung des Comet Assays**

Zur Auswertung der DNA mussten die Objektträger zunächst mit einem fluoreszierenden Farbstoff angefärbt werden. Es wurden 50 µl Ethidiumbromid-Färbelösung pro Objektträger verwendet, die durch Auflegen eines Deckglases verteilt wurde.

Ausgewertet wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop bei 250-facher Vergrößerung. Ein Anregungsfilter von 515-560 nm sorgte dafür, dass nur das Licht mit der Wellenlänge durchgelassen wurde, die zur Anregung des Farbstoffes nötig war. Vom Objektträger wurde nun das Fluoreszenzlicht, aber auch ein Teil des Anregungslichtes reflektiert, was die Auswertung gestört hätte. Aus diesem

Grund wurde ein Barrierefilter von 590 nm verwendet, der das reflektierte Anregungslicht abfing, bevor es auf das Okular traf.

Über eine Digitalkamera, deren Bilder auf einen Computer übertragen wurden, konnten mit Hilfe eines Bildanalyseprogramms (Comet Assay IV) verschiedene Parameter quantifiziert werden. Dies waren Schweiflänge und Leuchtintensität des Schweifes, sowie Kopfdurchmesser und Leuchtintensität des Kopfes. Aus diesen Messgrößen konnte dann das Tailmoment berechnet werden, welches das Produkt aus der relativen Fluoreszenzintensität des Schweifes und dem Abstand zwischen der Mitte des Kometenkopfes und dem Ende des Schweifes ist [88].

Die Auswertung der Objektträger sollte immer von der gleichen Person durchgeführt werden, um auswertungsbedingte Fehler und Unterschiede zu vermeiden. Es wurden immer 50 Zellen pro Präparat ausgewertet. Begonnen wurde immer in etwa gleichem Abstand zum Matt- und Längsrand und der Objektträger wurde in Längsrichtung bis zum anderen Ende verfolgt. Auf der Strecke wurden alle im Blickfeld erscheinenden Zellkerne ausgemessen, außer sie fielen unter eines der Ausschlusskriterien. Zellkerne, die nahe am Rand des Objektträgers zu liegen kamen, wurden schon dadurch ausgeschlossen, dass in einem gewissen Abstand vom Rand mit der Auswertung begonnen wurde. Zellkerne, die nicht ganz rund waren oder mehrere Zellkerne bzw. deren Kometen, die zu nahe beieinander zu liegen kamen oder sich gar überschneiden, wurden nicht ausgewertet. Waren am Ende des Präparates noch keine 50 Zellkerne ausmessbar gewesen wurde der Objektträger querverschoben und mit demselben Verfahren eine weitere Strecke „abgefahren“. Der Mittelwert des Tailmoments der 50 ausgemessenen Zellkerne diente als Maß für die DNA-Schädigung.

Während der Auswertung war der Untersucher im Bezug auf die Gruppenzugehörigkeit der Tiere verblindet.

## **2.6 Westernblot**

### **2.6.1 Grundlagen**

Der Westernblot, oder auch Immunoblot, ist ein Verfahren zum Antigen- bzw. Proteinnachweis in Zelllysaten. Bevor man die Proteine sichtbar machen kann, müssen diese zunächst einzeln vorliegen. Dies wird erreicht indem das zu untersuchende Proteingemisch mittels Gelelektrophorese aufgetrennt wird. Es

wird eine Spannung angelegt, bei der die gesuchten Proteine gemäß ihrem Molekulargewicht mit einer dementsprechenden Geschwindigkeit durch die Poren des Polyacrylamidgels wandern. Vom Gel müssen die Proteine auf eine Membran transferiert werden (das eigentliche „Blotting“), wo dann die Proteindetektion stattfinden kann. Dazu werden spezifische Antikörper verwendet, die an die gesuchten Proteine binden. Ein enzymgekoppelter Zweitantikörper wird hierbei verwendet, dessen Substratumsatz durch Chemolumineszenz dazu führt, dass die Erstantikörperbindung für das menschliche Auge in Form von Lichtquanten sichtbar wird.

### **2.6.2 Organaufbereitung**

Die zuvor schockgefrorene Organprobe der Lunge wurde schonend angetaut, jedoch nicht komplett aufgetaut. Das Gewebe wurde gewogen und basierend auf dem Gewicht (z.B. 0,15g Gewebe → 150µl) mit einer bestimmten Menge eiskaltem PBS-Puffer mit einem Proteaseinhibitorcocktail versetzt. Anschließend erfolgte die Homogenisierung mit dem Ultra Turrax. Danach wurde das Homogenisat zusammen mit dem Lysepuffer (zweifach), wieder mit Proteaseinhibitoren, gut vermischt. Nachdem das Gemisch dann für 30 Minuten auf Eis inkubiert wurde, wurde es für 30 Minuten bei 14900 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet aus Zellresten verworfen. Dieser Überstand wurde anschließend für 10 Sekunden sonifiziert, d.h. mit Ultraschallwellen bearbeitet. Die in der Probe vorhandene Proteinmenge wurde kolorimetrisch im Photometer bei 595 nm bestimmt.

Anhand der so bestimmten Gesamtproteinmenge wurde EMSA-Puffer (einfach) bis zu einer Proteinkonzentration von 20µg/5µl zugefügt. Zuletzt wurde die Probe mit Sample Buffer nach Laemmli (zweifach) im Verhältnis 1:2 versetzt und zur Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten gekocht, mit dem Vortex gemischt und bis zur Verarbeitung bei -20°C eingefroren.

### **2.6.3 Gelelektrophorese**

Zur Durchführung der SDS-PAGE musste zunächst das Gel hergestellt werden, das aus einem Trenn- und einem Sammelgel bestand. Durch die unterschiedlichen pH-Werte der Gele kam es zu einer diskontinuierlichen Elektrophorese, das heißt die Probe sammelte sich am Übergang und wanderte von nun an entsprechend ihrer Größe durch das Gel und wurde so aufgetrennt.

Pro Tasche wurden 40 µg Protein, also 20 µl des Proteingemisches, geladen. Der Colormarker zeigte nach der Auftrennung farbkodiert unterschiedliche Molekulargewichte an. Außerdem wurde eine Positivkontrolle geladen. Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer hineingestellt und mit Laufpuffer (einfach) aufgefüllt. In den ersten 15 Minuten bei einer Spannung von 90 V wurden die Proteine gesammelt. In den folgenden 45 Minuten bei 180 V wurden die Proteine schließlich getrennt.

#### **2.6.4 Proteintransfer**

Für das eigentliche „Blotting“ wurde eine Nitrozellulosemembran verwendet, die in Blotting-Puffer (einfach) getränkt wurde. Das Gel wurde darauf platziert. Auch in Blotting-Puffer getränkte Filterpapiere umschlossen den Blot. Bei 20 V und 0,17 A wurde dann für eine Stunde, für Caspase nur 45 Minuten, geblottet. Der Diffusionsvorgang der Proteine vom Gel auf die Nitrozellulose erfolgte mittels ionischen und hydrophoben Wechselwirkungen.

#### **2.6.5 Membranblockierung und Antikörperinkubation**

Um den Transfer zu kontrollieren wurde die Membran mit Ponceau S Lösung angefärbt.

Im Weiteren wurde die Membran in TBS-Puffer gewaschen. Mit dem Block-Puffer wurden anschließend die unspezifischen Bindungsstellen blockiert, indem die Membran für eine Stunde mit dem Puffer inkubiert wurde.

Zur Entfernung des überschüssigen Block-Puffers wurde die Membran nach der Inkubation in TBST-Puffer gewaschen.

Im nächsten Schritt, konnte die Nitrozellulose mit dem ersten Antikörper inkubiert werden. Hierzu wurde der erste Antikörper mit der Erstantikörper Dilution vermischt. Dieses Gemisch wurde auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4°C und leichtem Schaukeln inkubiert.

Primäre Antikörper:

- Caspase: rabbit, polyclonal
- HO-1: rabbit, monoclonal
- Actin/Vinculin: goat, polyclonal (Ladekontrolle)

Nach Waschen der Membran mit TBST-Puffer konnte der Zweitantikörper aufgetragen werden. Dafür wurde der zweite Antikörper mit der Zweitantikörper Dilution vermischt.

Sekundärer Antikörper:

- HRP-gekoppelter AK: : goat anti-rabbit IgG

Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur und dem Waschen der Membran konnte die Proteindetektion erfolgen.

### **2.6.6 Proteindetektion**

Um die Proteinbanden sichtbar machen zu können, war ein Katalysator für die Enzymreaktion des Zweitantikörpers notwendig. Dieses Substrat war in der Entwicklerlösung enthalten. Die Membran wurde mit 10 ml dieser Lösung für eine Minute inkubiert, in Frischhaltefolie gewickelt, so dass keine Luftblasen entstehen konnten und in der Filmkassette befestigt. Der Film wurde in der Dunkelkammer für wenige Sekunden bis mehrere Minuten (je nach gewünschter Intensität) belichtet und anschließend in der Entwicklermaschine entwickelt.

Jede Membran wurde im Anschluss noch mit der Ladekontrolle über Nacht inkubiert. Eine Zweitantikörper-Inkubation für die Ladekontrolle war nicht notwendig, da als Ladekontrolle schon HRP-gekoppeltes Actin verwendet wurde. Da Actin eine höhere Bindungsaffinität als die verwendeten Erstantikörper hatte konnten die Membranen ein zweites Mal benutzt und nach der Erstantikörper-Inkubation direkt entwickelt werden.

### **2.6.7 Auswertung**

Das Bildbearbeitungs- und Bildverarbeitungsprogramm Image J wurde zur Auswertung der entwickelten Filme benutzt. Damit war es möglich die Banden der Proteine auf den Filmen bezüglich ihrer „Integrated Density“ auszumessen. Diese Werte dividierte man dann durch den Mittelwert der beiden Nativtiere. Die Messwerte dieser Nativtiere wurden im Zuge eines anderen Versuchsvorhabens mit identischem Versuchsaufbau ermittelt [132].

## 2.7 Statistische Auswertung

Sofern nicht anders angegeben, sind alle Ergebnisse als Median, sowie Minimum und Maximum angegeben.

Zur graphischen Darstellung wurden Box-and-Whiskers-Plots verwendet. Dadurch kann eine Vielzahl von Daten komprimiert veranschaulicht werden, da sowohl der Median als Linie in der Box, die 25% und 75% Quartile als Begrenzung der Box und die 5% sowie 95 % Quartile als Striche außerhalb der Box dargestellt werden.

Bei nicht normalverteilten Daten, die durch den Kolmogorov-Smirnov-Test erfasst wurden, erfolgte die statistische Überprüfung signifikanter Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen mittels Kruskal-Wallis one way ANOVA Test mit nachfolgendem Dunn´s Test.

Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt. Werte die mit einem + gekennzeichnet sind zeigen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur korrespondierenden NonCOPD-Gruppe, die mit einer # gekennzeichneten Werte zeigen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur korrespondierenden Raumluftgruppe. Zur Dokumentation der Daten wurde Microsoft Office Excel 2003 benutzt. Die statistische Auswertung sowie die graphische Darstellung erfolgten mit dem Programm Prism 6.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Physiologische Parameter

#### 3.1.1 Hämodynamik

Bezüglich Herzfrequenz, mittlerem arteriellen Druck und Hämoglobinwerten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Gruppen. Um den Zieldruck (MAP > 50 mmHg) zu erreichen, war bei wenigen Tieren in allen Gruppen die Verabreichung von geringen Dosen Noradrenalin notwendig. [131]

Tabelle 2: Hämodynamische Parameter

Dargestellt sind Herzfrequenz, mittlerer arterieller Druck und Hämoglobinwert der Mäuse mit und ohne COPD nach stumpfem Thoraxtrauma und vierstündiger mechanischer Beatmung mit Raumluft (FiO<sub>2</sub> 0,21) oder 100 % O<sub>2</sub> (FiO<sub>2</sub> 1,0). Werte sind als Median (Minimum;Maximum) angegeben. COPD (Chronisch obstruktive Lungenerkrankung), FiO<sub>2</sub> (inspiratorischer Sauerstoffanteil), mmHg (Millimeter Quecksilbersäule), K-W ANOVA (Kruskal-Wallis Test), n.s. (nicht signifikant), MAP (mittlerer arterieller Druck), Hb (Hämoglobin).

[131] CC BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>

	<b>NonCOPD FiO<sub>2</sub> 0,21</b>	<b>COPD FiO<sub>2</sub> 0,21</b>	<b>NonCOPD FiO<sub>2</sub> 1,0</b>	<b>COPD FiO<sub>2</sub> 1,0</b>	<b>p-Wert K-W ANOVA</b>
<b>Herzfrequenz (min<sup>-1</sup>)</b>	340 (290;360)	355 (311;460)	395 (330;450)	326 (290;557)	n.s.
<b>MAP (mmHg)</b>	54 (50;61)	56 (52;58)	57 (55;77)	58 (50;69)	n.s.
<b>Hb (g*dl<sup>-1</sup>)</b>	7,4 (5,7;7,9)	7,8 (6,7;10)	6,0 (4,9; 7,5)	7,9 (6,8; 9,5)	n.s.

### 3.1.2 Metabolismus

Zwischen den Behandlungsgruppen gab es keine signifikanten Unterschiede für die Stoffwechselfparameter Glucose und Lactat. [131]

Tabelle 3: Metabolische Parameter

Aufgeführt sind die Glucose- und Lactatwerte der Mäuse mit und ohne COPD nach stumpfem Thoraxtrauma und vierstündiger mechanischer Beatmung mit Raumluft (FiO<sub>2</sub> 0,21) oder 100 % O<sub>2</sub> (FiO<sub>2</sub> 1,0). Werte sind als Median (Minimum;Maximum) angegeben. COPD (Chronisch obstruktive Lungenerkrankung), FiO<sub>2</sub> (inspiratorischer Sauerstoffanteil), K-W ANOVA (Kruskal-Wallis Test), n.s. (nicht signifikant).

[131] CC BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>

	<b>NonCOPD FiO<sub>2</sub> 0,21</b>	<b>COPD FiO<sub>2</sub> 0,21</b>	<b>NonCOPD FiO<sub>2</sub> 1,0</b>	<b>COPD FiO<sub>2</sub> 1,0</b>	<b>p-Wert K-W ANOVA</b>
<b>Glucose (mmol* L<sup>-1</sup>)</b>	5,7 (5,0;7,8)	4,5 (3,1;5,5)	5,0 (3,8;7,2)	5,2 (1,9;8,6)	n.s.
<b>Lactat (mmol* L<sup>-1</sup>)</b>	1,8 (1;2,5)	1,1 (0,6;2,4)	1,2 (0,7;1,5)	0,9 (0,4;1,7)	n.s.

### 3.1.3 Beatmung und BGA

Eine Exposition gegenüber Zigarettenrauch zeigte Veränderungen im pulmonalen Gasaustausch. Die Lunge der berauchten Mäuse zeigte sowohl unter Normoxie als auch unter Hyperoxie eine höhere Compliance im Vergleich zu den nicht berauchten Tieren. PaO<sub>2</sub> und Oxygenierungsindex waren bei den mit Raumluft beatmeten Tieren mit COPD erniedrigt.

Sowohl zu MZP 1 (Tabelle 4) als auch zu MZP 4 (Tabelle 5) zeigten die NonCOPD-Tiere unter Hyperoxie-Beatmung einen niedrigeren Oxygenierungsindex als die Kontrollgruppe unter Raumluftbeatmung. Hingegen zeigt sich diesbezüglich in der COPD-Gruppe kein Unterscheid. Insgesamt ließ sich im Verlauf der vierstündigen Beatmung eine verbesserte Oxygenierung beobachten. [131]

Tabelle 4: Parameter der Lungenmechanik und Blutgasanalyse zu MZP 1 (nach Instrumentierung). Die Tabelle veranschaulicht ausgewählte Werte während der vierstündigen mechanischen Beatmung mit Raumluft (FiO<sub>2</sub> 0,21) oder 100 % O<sub>2</sub> (FiO<sub>2</sub> 1,0) und der Blutgasanalyse der Mäuse mit und ohne COPD nach stumpfem Thoraxtrauma. + im Vergleich zur korrespondierenden NonCOPD-Gruppe, # im Vergleich zur korrespondierenden Raumluftgruppe. Werte sind als Median (Minimum;Maximum) angegeben. COPD (Chronisch obstruktive Lungenerkrankung), FiO<sub>2</sub> (inspiratorischer Sauerstoffanteil), K-W ANOVA (Kruskal-Wallis Test), n.s. (nicht signifikant), PEEP (positiver-endexpiratorischer Druck), cmH<sub>2</sub>O (Zentimeter-Wassersäule), mmHg (Millimeter-Quecksilbersäule), PaO<sub>2</sub> (arterieller Sauerstoffpartialdruck), PaCO<sub>2</sub> (arterieller Kohlendioxidpartialdruck).

Institut für Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung, Universität Ulm 2013

	<b>NonCOPD FiO<sub>2</sub> 0,21</b>	<b>COPD FiO<sub>2</sub> 0,21</b>	<b>NonCOPD FiO<sub>2</sub> 1,0</b>	<b>COPD FiO<sub>2</sub> 1,0</b>	<b>p-Wert K-W ANOVA</b>
<b>Atemminute- volumen (<math>\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}</math>)</b>	810 (710;900)	800 (780;850)	800 (710;870)	800 (650;950)	n.s.
<b>Compliance (<math>\mu\text{L}\cdot\text{cmH}_2\text{O}^{-1}</math>)</b>	85 (60;115)	92 (72;122)	72 (48;97)	90 (73;97)	n.s.
<b>PEEP (cmH<sub>2</sub>O)</b>	3,0 (3,0;3,0)	3,0 + (3,0;5,0)	3,0 (3,0;3,0)	3,0 + (3,0;5,0)	0,029
<b>Oxygenierungs- -index (mmHg)</b>	423 (371;680)	315 + (266;371)	313 # (270;370)	328 (139;397)	0,027
<b>PaO<sub>2</sub> (mmHg)</b>	81 (68;143)	67 + (56;78)	313 # (270;370)	328 # (139;397)	<0,001
<b>PaCO<sub>2</sub> (mmHg)</b>	28 (20;35)	33 (27;40)	32 (27;44)	33 (25;45)	n.s.
<b>Arterieller pH</b>	7,30 (2,30;7,38)	7,30 (7,19;7,36)	7,30 (7,15;7,33)	7,20 (7,18;7,31)	n.s.
<b>Arterieller Basenüber- schuss (<math>\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</b>	-10,3 (-15;-9)	-11,8 (-16;-6,4)	-11,4 (-14,8;-10,8)	-11,8 (-16;-8,4)	n.s.

Tabelle 5: Parameter der Lungenmechanik und Blutgasanalyse zu MZP 4 (nach vier Stunden).

Die Tabelle veranschaulicht ausgewählte Werte der vierstündigen mechanischen Beatmung mit Raumluft ( $FiO_2$  0,21) oder 100 %  $O_2$  ( $FiO_2$  1,0) und der Blutgasanalyse der Mäuse mit und ohne COPD nach stumpfem Thoraxtrauma. + im Vergleich zur korrespondierenden NonCOPD-Gruppe, # im Vergleich zur korrespondierenden Raumluftgruppe. Werte sind als Median (Minimum;Maximum) angegeben. COPD (Chronisch obstruktive Lungenerkrankung),  $FiO_2$  (inspiratorischer Sauerstoffanteil), K-W ANOVA (Kruskal-Wallis Test), n.s. (nicht signifikant), PEEP (positiver-endexpiratorischer Druck),  $cmH_2O$  (Zentimeter-Wassersäule), mmHg (Millimeter-Quecksilbersäule),  $PaO_2$  (arterieller Sauerstoffpartialdruck),  $PaCO_2$  (arterieller Kohlendioxidpartialdruck).

[131] CC BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>

	<b>NonCOPD <math>FiO_2</math> 0,21</b>	<b>COPD <math>FiO_2</math> 0,21</b>	<b>NonCOPD <math>FiO_2</math> 1,0</b>	<b>COPD <math>FiO_2</math> 1,0</b>	<b>p-Wert K-W ANOVA</b>
<b>Atemminuten- volumn (<math>\mu L \cdot min^{-1}</math>)</b>	750 (740;900)	810 (700;920)	800 (710;880)	750 (700;840)	n.s.
<b>Compliance (<math>\mu L \cdot cmH_2O^{-1}</math>)</b>	79 (70;120)	97 + (70;130)	75 (60;90)	90 + (50;100)	0,028
<b>PEEP (<math>cmH_2O</math>)</b>	3,0 (3,0;3,0)	3,0 (3,0;5,0)	3,0 (3,0;3,0)	3,0 (3,0;5,0)	n.s.
<b>Oxygenierungs- index (mmHg)</b>	491 (381;624)	368 + (319;461)	379 # (290;414)	370 (101;477)	0,007
<b><math>PaO_2</math> (mmHg)</b>	102 (80;131)	78 + (67;97)	379 # (290;414)	370 # (101;477)	<0,001
<b><math>PaCO_2</math> (mmHg)</b>	35 (29;44)	32 (28;45)	37 (27;38)	37 (30;53)	n.s.
<b>Arterieller pH</b>	7,32 (7,24;7,37)	7,30 (7,19;7,36)	7,32 (7,27;7,43)	7,30 (7,22;7,46)	n.s.
<b>Arterieller Basenüberschu- ss (<math>mmol \cdot L^{-1}</math>)</b>	-7,4 (-9,5;-6,8)	-8,1 (-15;-4,8)	-6,8 (-9,9;-5,3)	-7,0 (-13;-1,7)	n.s.

### 3.2 Quantifizierung der DNA-Schädigung mittels Comet Assay

Zwischen den Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (siehe Tabelle 6). Bei allen war das Ausmaß der mittels Comet assay erfassten DNA-Strangbrüche gering.

Tabelle 6: Tailmoment (Comet assay) im Lungengewebe und Vollblut der Maus, Werte sind als Mittelwerte (Minimum;Maximum) angegeben. COPD (Chronisch obstruktive Lungenerkrankung), FiO<sub>2</sub> (inspiratorischer Sauerstoffanteil), K-W ANOVA (Kruskal-Wallis Test), n.s. (nicht signifikant).  
 Institut für Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung, Universität Ulm 2013

	<b>NonCOPD FiO<sub>2</sub> 0,21</b>	<b>COPD FiO<sub>2</sub> 0,21</b>	<b>NonCOPD FiO<sub>2</sub> 1,0</b>	<b>COPD FiO<sub>2</sub> 1,0</b>	<b>p-Wert K-W ANOVA</b>
<b>Tailmoment Lunge</b>	0,68 (0,30;1,06)	0,56 (0,33;0,97)	0,50 (0,33;0,67)	0,44 (0,30;0,63)	n.s.
<b>Tailmoment Blut</b>	0,39 (0,27;0,52)	0,40 (0,24;0,70)	0,38 (0,25;0,45)	0,40 (0,25;0,74)	n.s.

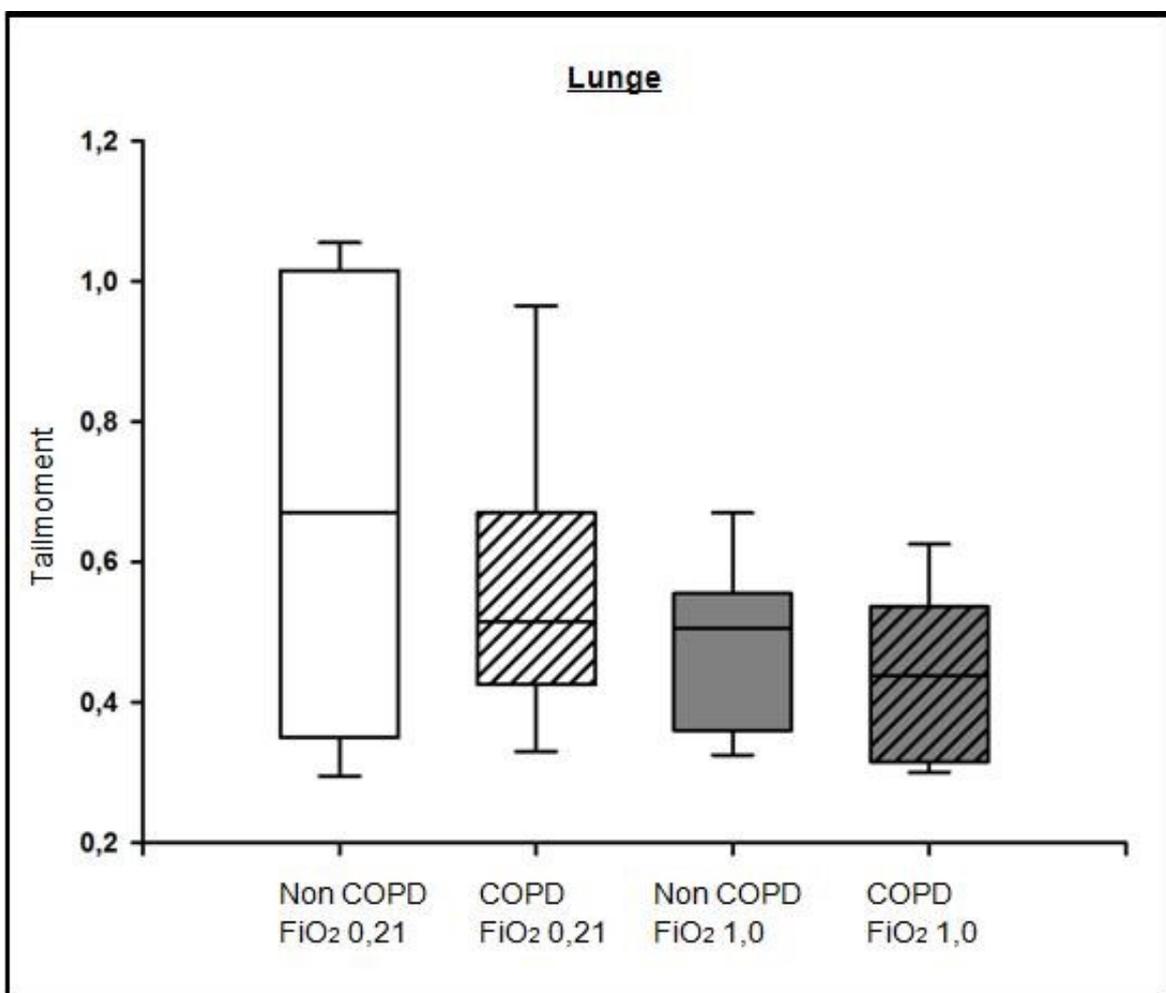


Abbildung 4: Graphische Darstellung des Tailmoment im Lungengewebe der Maus, visualisiert als Median, 5, 25, 75 und 95% Quartil der relativen Intensität (Zunahme der densitometrisch quantifizierten Intensität im Vergleich zu Kontrollproben) in den vier Behandlungsgruppen. COPD (Chronisch obstruktive Lungenerkrankung), FiO<sub>2</sub> (inspiratorischer Sauerstoffanteil).

Institut für Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung, Universität Ulm 2013

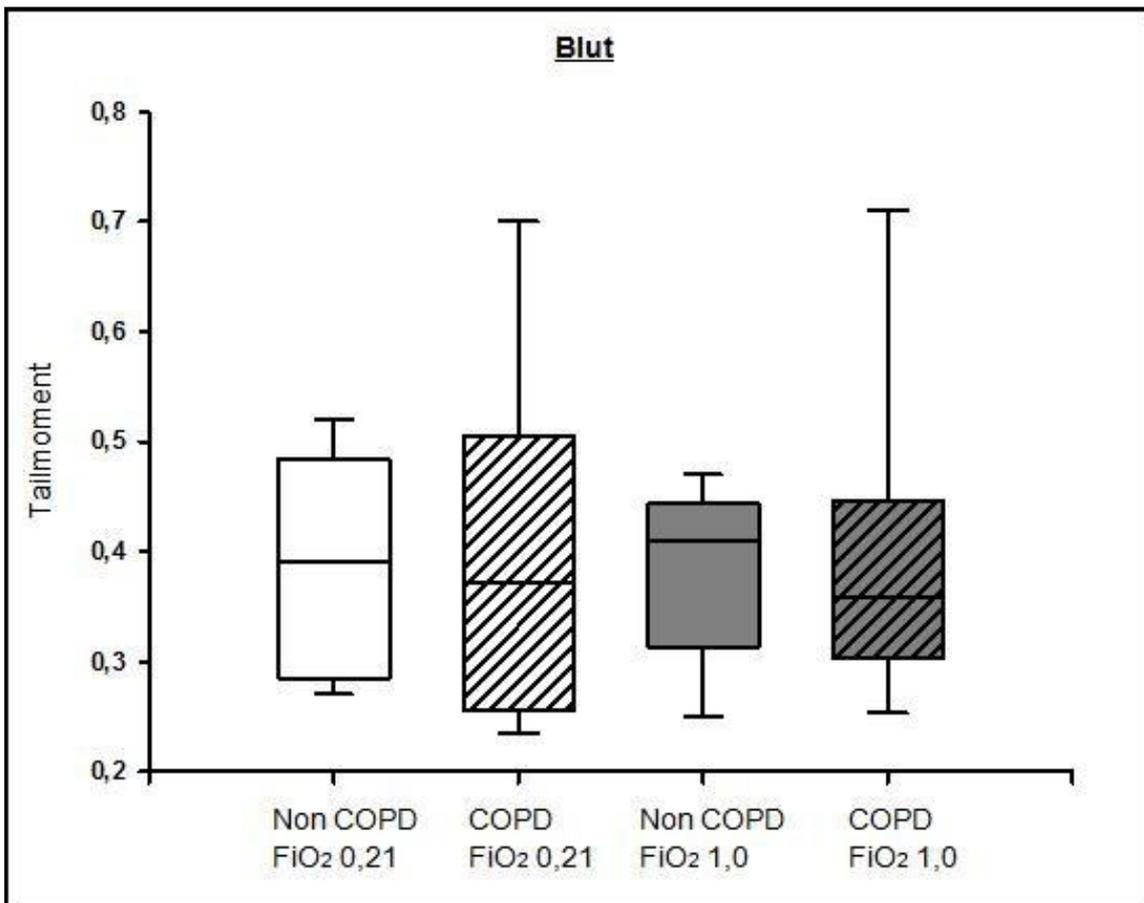


Abbildung 5: Graphische Darstellung des Tailmoment in Vollblut der Maus, visualisiert als Median, 5, 25, 75 und 95% Quartil der relativen Intensität (Zunahme der densitometrisch quantifizierten Intensität im Vergleich zu Kontrollproben) in den vier Behandlungsgruppen. COPD (Chronisch obstruktive Lungenerkrankung), FiO<sub>2</sub> (inspiratorischer Sauerstoffanteil).

Institut für Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung, Universität Ulm 2013

### 3.3 Messung der Expression von Stress- und Apoptoseproteinen im Lungengewebe

#### 3.3.1 Expression des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$

Es zeigte sich eine signifikante Reduktion des Hypoxie-induzierten Faktors 1 $\alpha$  bei den nicht beatmeten Tieren unter Hyperoxie, sowie den beatmeten Tieren unter Normoxie im Vergleich zu den nicht beatmeten Mäusen unter Normoxie. [131]

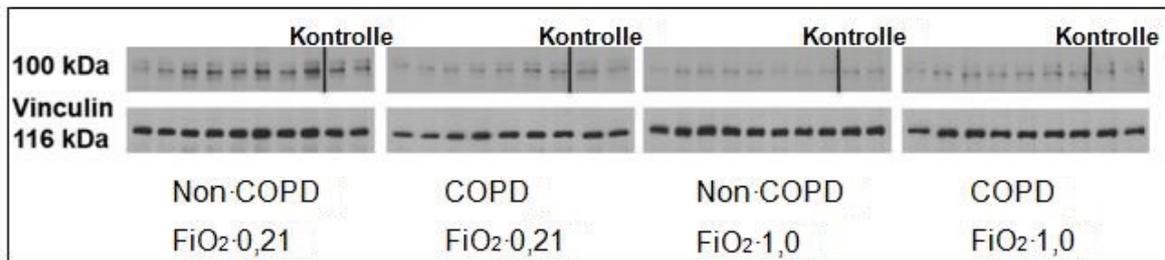


Abbildung 6: Original Westernblot-Banden der Expression des Hypoxie-induzierten Faktors 1 $\alpha$  im Lungengewebe der verschiedenen Behandlungsgruppen mit zwei Banden von Kontrolltieren (Mäuse), die weder Zigarettenrauch ausgesetzt wurden, noch der Anästhesie, dem Thoraxtrauma oder der Instrumentierung und Operation unterzogen wurden. COPD (Chronisch obstruktive Lungenerkrankung), FiO<sub>2</sub> (inspiratorischer Sauerstoffanteil), kDa (Kilodalton).

[131] CC BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>

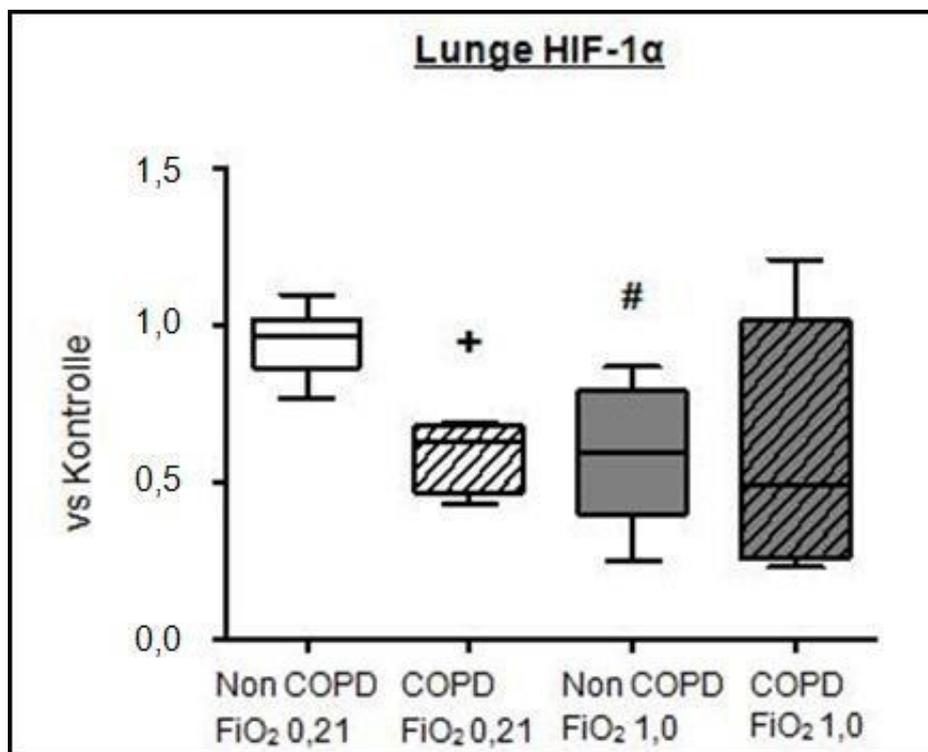


Abbildung 7: Expression des Hypoxie-induzierten Faktors 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) im Lungengewebe der Maus, visualisiert als Median, 5, 25, 75 und 95% Quartil der relativen Intensität (Zunahme der densitometrisch quantifizierten Intensität im Vergleich zu Kontrollproben) in den vier Behandlungsgruppen, + im Vergleich zur korrespondierenden NonCOPD-Gruppe, # im Vergleich zur korrespondierenden Raumluftgruppe. COPD (Chronisch obstruktive Lungenerkrankung), FiO<sub>2</sub> (inspiratorischer Sauerstoffanteil).

[131] CC BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>

### 3.3.2 Expression des Enzyms HO-1

In der Gruppe der berauchten Tiere unter Hyperoxie stellte sich ein signifikanter Anstieg der Konzentration an Hämoxigenase-1 dar. [131]

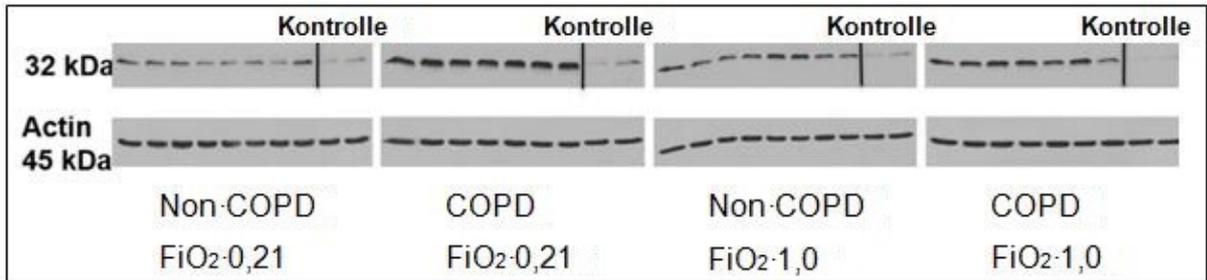


Abbildung 8: Original Westernblot-Banden der Expression von Hämoxigenase-1 im Lungengewebe der verschiedenen Behandlungsgruppen mit zwei Banden von Kontrolltieren (Mäuse), die weder Zigarettenrauch ausgesetzt wurden, noch der Anästhesie, dem Thoraxtrauma oder der Instrumentierung und Operation unterzogen wurden. COPD (Chronisch obstruktive Lungenerkrankung), FiO<sub>2</sub> (inspiratorischer Sauerstoffanteil)

[131] CC BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>

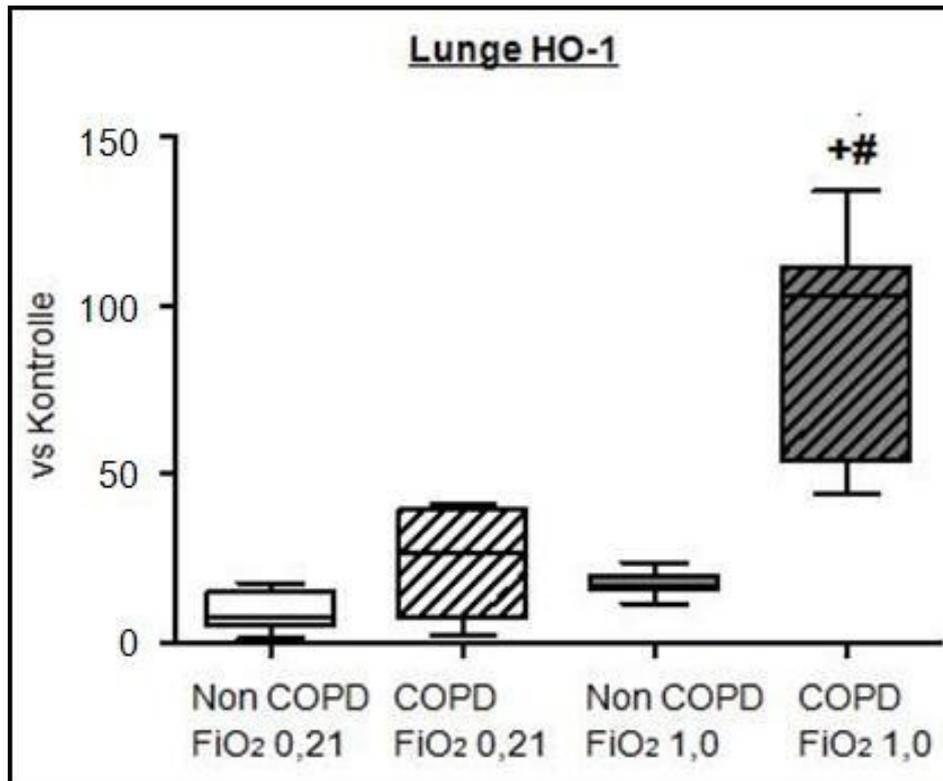


Abbildung 9: Expression der Hämoxygenase-1 (HO-1) im Lungengewebe der Maus, visualisiert als Median, 5, 25, 75 und 95% Quartil der relativen Intensität (Zunahme der densitometrisch quantifizierten Intensität im Vergleich zu Kontrollproben) in den vier Behandlungsgruppen, + im Vergleich zur korrespondierenden NonCOPD-Gruppe, # im Vergleich zur korrespondierenden Raumlufgruppe. COPD (Chronisch obstruktive Lungenerkrankung), FiO<sub>2</sub> (inspiratorischer Sauerstoffanteil).

[131] CC BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>

### 3.3.3 Expression des Apoptoseproteins Caspase-3

Die Exposition der Mäuse gegenüber Zigarettenrauch führte zu einem signifikanten Anstieg der Caspase-3 unter Raumluf. Wohingegen es unter maschineller Beatmung mit 100 % O<sub>2</sub> zu einer Reduktion der Caspase-3 bei den berauchten Tieren im Vergleich zur Raumlufgruppe kam. Dies wird durch Abb. 11 nachvollziehbar. [131]

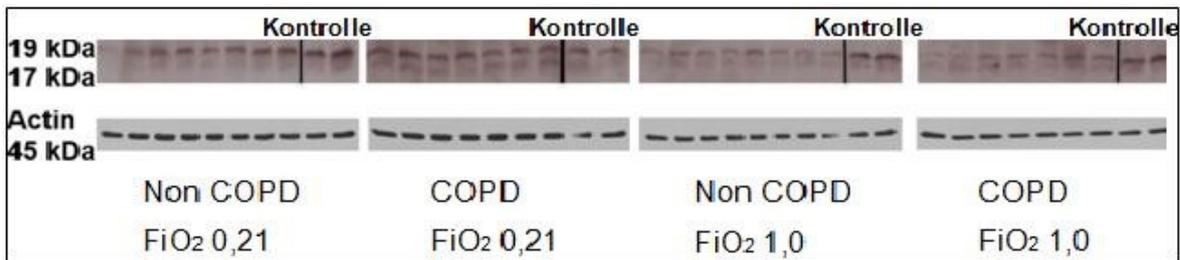


Abbildung 10: Original Westernblot-Banden der Expression von cleaved Caspase-3 im Lungengewebe der verschiedenen Behandlungsgruppen mit zwei Banden von Kontrolltieren (Mäuse), die weder Zigarettenrauch ausgesetzt wurden, noch der Anästhesie, dem Thoraxtrauma oder der Instrumentierung und Operation unterzogen wurden. COPD (Chronisch obstruktive Lungenerkrankung), FiO<sub>2</sub> (inspiratorischer Sauerstoffanteil), kDa (Kilodalton).

[131] CC BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>

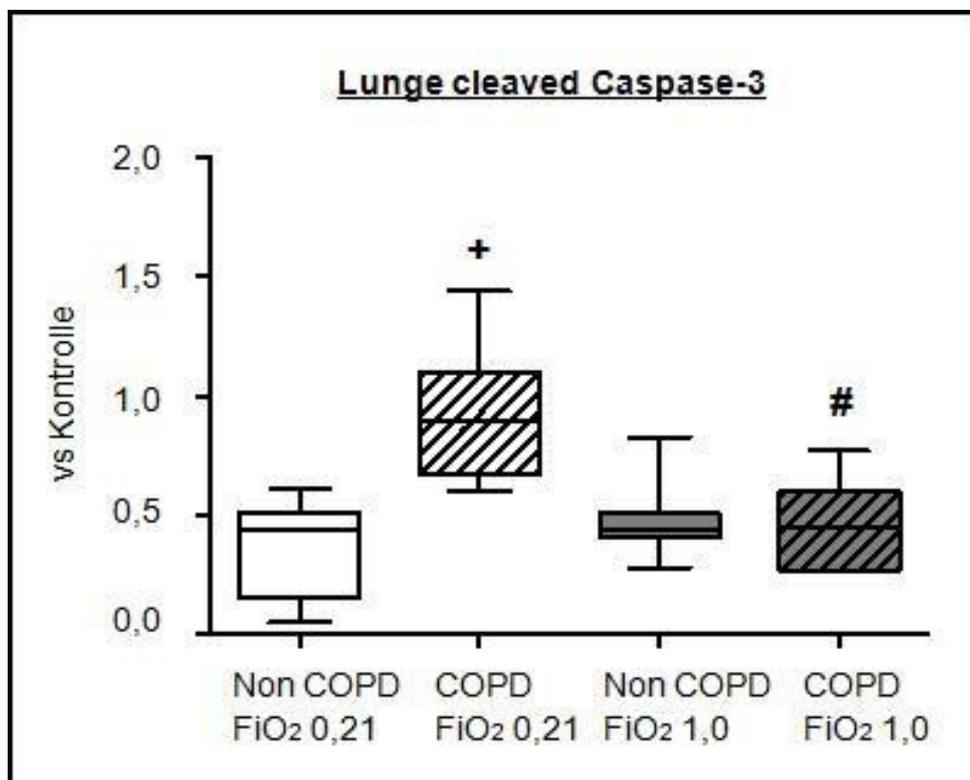


Abbildung 11: Expression von cleaved Caspase-3 im Lungengewebe der Maus, visualisiert als Median, 5, 25, 75 und 95% Quartil der relativen Intensität (Zunahme der densitometrisch quantifizierten Intensität im Vergleich zu Kontrollproben) in den vier Behandlungsgruppen, + im Vergleich zur korrespondierenden NonCOPD-Gruppe, # im Vergleich zur korrespondierenden Raumluftgruppe. COPD (Chronisch obstruktive Lungenerkrankung), FiO<sub>2</sub> (inspiratorischer Sauerstoffanteil).

[131] CC BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>

## **4 Diskussion**

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob eine kurze hyperoxische Phase Effekte auf die Entzündungsantwort und den Gasaustausch der Lunge bei Tieren nach Thoraxtrauma mit vorausgegangener Zigarettenrauchexposition hat. Anhand der gewonnenen Ergebnisse konnte diese Hypothese in Teilen bestätigt werden, was im Folgenden erörtert werden soll.

### **4.1 Zigarettenrauch-vermittelte Effekte nach Thoraxtrauma**

#### **4.1.1 Die Entstehung der COPD**

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass das für die vorliegende Arbeit verwendete Modell zur Berauchung von Mäusen zu Veränderungen der Lunge führte, wie sie auch bei der COPD des Menschen zu finden sind [30,89,90,102]. Anhand eines erniedrigten Horowitz-Indexes und des erniedrigten Sauerstoffpartialdruckes konnte eine signifikante Abnahme des Gasaustausches in der Lunge der berauchten Tiere festgestellt werden. Bei den zigarettenrauchexponierten Mäusen zeigte sich eine erhöhte Compliance, d.h. Veränderungen der Lungenmechanik [131].

Die genutzte Methode wurde mehrfach erprobt und zeigte außerdem eine inflammatorische Antwort. Auch diese ist bei der Entstehung der COPD zu beobachten [64]. So wurden in der bronchoalveolären Lavage (BAL) signifikant erhöhte Zellzahlen an Neutrophilen gefunden, außerdem konnte man histologisch perivaskulär eine diffuse Inflammationsreaktion und Veränderungen der Becherzellen nachweisen [140]. Auch andere Tiermodelle der Zigarettenrauchexposition zeigten eine Erhöhung der Anzahl an Neutrophilen und Makrophagen [40,44,76], sowie eine vermehrte Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , MCP-1 und IL-1 [40,141]. Weiter fand man eine gesteigerte Konzentration des Apoptoseenzym Caspase-3 [40,91] und Marker für vermehrten nitrosativen und oxidativen Stress [18,44]. Letztlich konnte eine Studie an Ratten zeigen, dass die Kombination aus Zigarettenrauchexposition und mechanischer Ventilation zu einer gesteigerten Menge an DNA-Fragmenten führte [49]. Die in dieser Studie verwendeten Marker zur Quantifizierung der Auswirkungen des Zigarettenrauchs decken sich mit den

oben beschriebenen Erkenntnissen. So zeigte sich ein signifikanter Anstieg der aktivierten Caspase-3 in der Gruppe der berauchten Mäuse. Auch ein Indikator für den oxidativen Stress, das Enzym HO-1, zeigte einen deutlichen Konzentrationsanstieg bei den Mäusen, die Zigarettenrauch ausgesetzt wurden. Histologische Untersuchungen des Lungengewebes am selben Modell zeigten zudem einen signifikanten Anstieg des proinflammatorischen Zytokins IL-18, des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, sowie von Nitrotyrosin, ein Marker für nitrosativen Stress [131]. Des Weiteren konnten hier auch mikroskopische Veränderungen des Lungengerüsts wie Emphysem und alveoläres Ödem festgestellt werden, wie sie auch bei an COPD erkrankten Patienten gefunden werden [64].

#### **4.1.2 Effekte auf die Lungenmechanik und den Gasaustausch**

Ultima Ratio der Behandlung einer schweren COPD mit chronischer Hypoxie ist die kontrollierte Sauerstoff-Langzeittherapie. Durch die Obstruktion kommt es zu Gasaustauschstörungen [48], wie dem Abfall des Sauerstoffpartialdruckes [14,93]. Dies deckt sich mit den beschriebenen Beobachtungen. Tiere mit COPD unter Beatmung mit Raumluft zeigten einen signifikanten Abfall des PaO<sub>2</sub> im Vergleich zu denen ohne COPD. Daraus folgt auch ein Abfall des Oxygenierungsindex (PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>) [131]. Bei gleichbleibender inspiratorischer Sauerstofffraktion und sinkendem Sauerstoffpartialdruck ergibt sich allein mathematisch eine Erniedrigung des Indexes.

Das Lungenemphysem entsteht durch die Zerstörung der elastischen Architektur der Lunge. Sowohl die elastischen Fasern der Alveolen als auch der großen und kleinen Bronchien sind im Vergleich zu denen in gesunden Lungen vermindert, fragmentiert, gerissen und perforiert, wie mehrere Studien an menschlichen und tierischen emphysematösen Lungen zeigten [13,36,106]. Die elastischen Fasern sind jedoch essentiell für die regelrechte Funktion der Lungenmechanik. Bei Inspiration tragen sie dazu bei eine Zugspannung aufzubauen, die bei Expiration in Retraktionskräfte umgewandelt wird [104]. Bei Verlust der elastischen Eigenschaften der Lunge kommt dieser Mechanismus aus dem Gleichgewicht, die Lunge wird überdehnt, was mit dem Anstieg der Compliance (Lungendehnbarkeit) gemessen werden kann. Dies lässt schlussfolgern, dass bei COPD eine Erhöhung der Compliance festzustellen sein müsste, da die Lunge bei obstruktiven Lungenerkrankungen emphysematös ist [64]. Die hier vorliegenden Ergebnisse

zeigen eine signifikante Steigerung der Compliance bei den Mäusen nach Zigarettenrauchexposition im Vergleich zu denen ohne, was sich mit Ergebnissen einer Studie von Seimetz et al. deckt [131,106]. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass das verwendete Modell mit Zigarettenrauchexposition zur Entwicklung einer COPD geführt hat.

#### **4.1.3 Hypoxie-induzierter Faktor 1 $\alpha$**

Die Zigarettenrauchexposition verursachte eine signifikante Reduktion von HIF-1 $\alpha$  in der Gruppe der mit Raumluft beatmeten Tiere im Vergleich zu den mit Raumluft beatmeten, nicht vorbehandelten Tieren. Auch zeigte sich eine geringere Expression von HIF-1 $\alpha$  in der Hyperoxie-Gruppe ohne Zigarettenrauchexposition im Vergleich zu der Raumluft-Gruppe ohne Zigarettenrauchexposition. [131]

Letzteres deckt sich mit dem biochemischen Verhalten des Transkriptionsfaktors: Wie der Name schon sagt, ist die Konzentration von HIF-1 $\alpha$  in der Zelle abhängig vom Sauerstoffgehalt. Es steigt die Konzentration unter hypoxischen Bedingungen und fällt unter normoxischen Bedingungen [32,73,108,143].

Doch was ist mit den Beobachtungen von HIF-1 $\alpha$  bei den Tieren die Zigarettenrauch ausgesetzt wurden? Unser Ergebnis deckt sich mit dem einer Studie an humanem Lungengewebe von Patienten mit COPD. Auch hier zeigte sich eine Verminderung der HIF-1 $\alpha$ -Proteinexpression [142]. Dies steht allerdings im Kontrast zu Daten aus sowohl tierexperimentellen Untersuchungen [58], als auch zu anderen Studien von Patienten mit COPD [68]. Diese zeigen nämlich eine Steigerung der HIF-1 $\alpha$ -Proteinexpression. Wie lässt sich dieser Widerspruch erklären? In einer Studie von Jiang et al. konnte gezeigt werden, dass die Expression von HIF-1 $\alpha$  nicht nur vom vorherrschenden Sauerstoffpartialdruck im Gewebe abhängt, sondern zusätzlich von anderen Faktoren, wie reaktiven Sauerstoffspezies, TNF- $\alpha$  und NF- $\kappa$ B [58]. Des Weiteren scheint Stickstoffmonoxid (NO) in diesem Zusammenhang eine Rolle zu spielen. Sowohl das Thoraxtrauma per se, als auch Zigarettenrauch führen zu nitrosativem Stress [83,131,132]. Dabei kommt es zu einem vermehrten Anfall von Nitrotyrosin und induzierbarer NO-Synthase (iNOS), was wiederum zu einer Überproduktion von NO führt und damit durch die Bildung von Radikalen zu einer Schädigung der Zellen [132]. Unter Normoxie führt der Überschuss an NO durch die Hemmung der Prolylhydroxylase zu einem verminderten Abbau von HIF-1 $\alpha$  [81]. Im Gegensatz dazu führt die

Akkumulation von NO unter hypoxischen Bedingungen zu einer reduzierten Aktivität von HIF-1 $\alpha$  und dessen Destabilisierung [52,117]. In der vorliegenden Arbeit zeigt sich eine signifikante Reduktion der Aktivität von HIF-1 $\alpha$  bei den mit Zigarettenrauch exponierten Mäusen nach Thoraxtrauma unter Raumlufbeatmung. Diese sind mit einem Oxygenierungsindex von 368 mmHg per Definition zwar nicht hypoxisch, doch haben sie einen im Vergleich zu den Tieren ohne Zigarettenrauchexposition signifikant niedrigeren Oxygenierungsindex, sowie Sauerstoffpartialdruck. Somit passen die Ergebnisse zu den in der Literatur beschriebenen Zusammenhängen zwischen Hypoxie, NO und HIF-1 $\alpha$ . Dabei bleibt jedoch zu beachten, dass die vorliegende Arbeit die Einzige ist, welche die Untersuchungen an Gewebe von Tieren durchgeführt hat, die zuvor einem stumpfen Thoraxtrauma ausgesetzt wurden. Somit liegt eine zusätzliche Variable vor, welche die Entzündungsreaktion in der Lunge beeinflusst.

## **4.2 Hyperoxie vermittelte Effekte nach Thoraxtrauma**

### **4.2.1 Effekte auf die Lungenmechanik und den Gasaustausch**

Die Beatmung mit 100 % O<sub>2</sub> hatte keinen Einfluss auf die Lungenmechanik, was sich mit den gewonnen Erkenntnissen aus der Literaturrecherche deckt. Sowohl eine Untersuchung an Patienten mit COPD, als auch ein Tiermodell zeigten, dass eine kurzfristige Beatmung mit 100 % Sauerstoff keine signifikanten Auswirkungen auf die Lungenfunktion hatte [9,101]. Allerdings zeigten sich Veränderungen auf der Ebene des Gasaustausches: Bei unseren Tieren ohne Zigarettenrauchexposition kam es zu einem signifikanten Abfall des Horowitz-Indexes im Vergleich zur Raumlufgruppe ohne Zigarettenrauchexposition. [131] Grund hierfür könnte eine Erhöhung des intrapulmonalen Rechts-Links-Shunts sein, die der Beatmung mit einem FiO<sub>2</sub> von 1,0 folgt [101,120]. Das gesteigerte Shuntvolumen bei Hyperoxie resultiert zum einen aus der Entstehung von Resorptionsatelektasen durch Alveolarkollaps [100] und zum anderen entsteht durch Minderbelüftung der Alveolen eine alveoläre Hypoxie, die reflektorisch zur Vasokonstriktion der Arteriolen führt [120]. Durch diesen sogenannten Euler-Liljestrand-Mechanismus, kommt es zur verminderten Perfusion der betroffenen Alveolen [53]. Das heißt trotz FiO<sub>2</sub> von 1,0 kommt es durch die beschriebenen

Effekte zur lokalen Hypoxie und damit zu einem erniedrigten Oxygenierungsindex im Vergleich zu den Tieren mit  $\text{FiO}_2$  von 0,21.

Es lässt sich also anmerken, dass der erniedrigte  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Index durch Inhomogenitäten des Ventilations/Perfusions-Verhältnisse entsteht und nicht, wie oft postuliert [121], durch direkte Sauerstofftoxizität. So gibt es in der vorliegenden Arbeit keine Hinweise darauf, dass die Hyperoxie zu einer Verschlimmerung der pulmonalen Inflammation nach Thoraxtrauma geführt hat. In Studien an anderen Tiermodellen mit Hyperoxiebeatmung, bei denen eine gesteigerte Inflammationsantwort in der Lunge im Sinne von alveolärem Ödem, vermehrter Leukozyteninfiltration oder Anstieg von Zytokinen und Chemokinen zu verzeichnen war, wurden deutlich höhere Tidalvolumina ( $20 - 25 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) verwendet [95,114,131]. Während einer kurzfristigen hyperoxischen mechanischen Beatmung von Mäusen mit Tidalvolumina ähnlich derer in unserer Studie ( $10 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) kam es weder zu negativen Veränderungen der Lungenmechanik noch zu einem Anstieg von proinflammatorischen Markern [17].

#### **4.2.2 DNA-Schäden durch oxidativen Stress – Comet Assay**

Die Einzelzell - Gelelektrophorese, der sogenannte Comet Assay, ist eine weit verbreitete und vor allen Dingen verlässliche Methode zur Beurteilung von DNA Schäden in biologischen Proben. Die wichtigsten Vorzüge dieses Verfahrens sind die Detektion der DNA Schäden auf der Ebene einzelner Zellen, die Notwendigkeit einer nur geringen Zahl an Zellen pro Probe, die hohe Sensitivität bei der Ermittlung der DNA Schäden und die Anwendbarkeit auf jede eukaryotische Zelle in vitro und in vivo. Außerdem spielen ökonomische Faktoren, wie zum Beispiel geringe Materialkosten, eine Rolle [37,88]. Jedoch gibt es auch einige Faktoren die das Ergebnis beeinflussen können. So sind die Dichte und Konzentration der verwendeten Agarose, die Zeit der Alkalidenaturierung, die angelegte Spannung und Dauer der Elektrophorese, sowie die Methode zur Ausmessung der `Kometen` von Bedeutung [8,33]

Im untersuchten Material ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Es lässt sich jedoch eine Tendenz erkennen. Der Tailmoment der mit 100 % Sauerstoff beatmeten Mäuse ist im Vergleich zu den mit Raumluft beatmeten Mäusen jeweils kleiner, hat also zu weniger DNA-Strangbrüchen geführt.

Warum erreichen die Ergebnisse jedoch keine Signifikanz?

Um die Gesamtheit der Schäden einer Zellpopulation erfassen zu können sei es notwendig in etwa 100 Kometen auszumessen [8]. In dieser Studie wurden 50 Zellen pro Objektträger und pro Gewebe und Versuchsgruppe insgesamt zwei Objektträger ausgewertet. Sodass letztlich, wie von Azqueta et al. empfohlen, 100 Kometen unter dem Mikroskop vermessen wurden. Eine Fehlerquelle könnte in der Image-Analyse per se liegen, da diese wesentlich das Outcome von Studien beeinflusst. Da es bisher aber noch keine Referenzstandards gibt ist die Vergleichbarkeit erschwert [37]. Außerdem als Fehlerquelle auszuschließen sind die hier verwendeten Substrate für den Comet Assay: Lungengewebe und Vollblut. Diese wurden schon mehrfach in anderen Arbeiten erfolgreich verwendet [19,65,66]. Es wurde sogar gezeigt, dass die in dieser Studie verwendete Menge (5 µl) an Vollblut für die Detektion von DNA-Strangbrüchen optimal ist [4].

Oxidativer Stress verursacht vor allem Schäden an der mitochondrialen DNA [26]. Die Detektion von durch oxidativen Stress verursachten Schäden kann mithilfe Läsions-spezifischer Enzyme mittels Comet Assay gewährleistet werden. So zeigten Collins et al. an einem Versuchsaufbau, bei dem Zellen mit einer Endonuklease beimpft wurden, dass im Beisein des ROS  $H_2O_2$  der Kometenschweif mehr geschädigte DNA enthielt als ohne  $H_2O_2$  [23]. Mitochondriale DNA jedoch, habe die Tendenz sich im umgebenden Agarose-Gel aufgrund der geringen Größe schnell zu verteilen und letztendlich keine Verbindung mehr zur DNA des Kometen zu haben [110]. Dies führt dazu, dass die mtDNA der Image-Analyse entgeht.

Letztlich lässt sich nur mutmaßen, dass es in diesem Modell zu wenige DNA-Strangbrüche in einem vielleicht zu kurzen Beobachtungszeitraum gab, als dass der Comet Assay die richtige Methode war um dies zu quantifizieren.

#### **4.2.3 HO-1**

Die Hämoxygenase-1 ist ein Enzym das den Abbau von freiem Häm zu zweiwertigem Eisen, CO und Biliverdin katabolisiert [43,98,122,130]. Da freies Häm durch die Bildung von Radikalen zur Entzündungsreaktion führen kann [31], trägt also das Enzym zur Zytoprotektion in Stresssituationen der Zelle bei. Neben den antioxidativen [34,94], werden HO-1 auch antiinflammatorische [111,139] und antiapoptotische [124] Eigenschaften zugeschrieben. So konnte zum Beispiel in

einem Mausmodell gezeigt werden, dass die HO-1-Expression nach Thoraxtrauma hochreguliert wird [132]. Auch eine prolongierte (72 Stunden) hyperoxische Beatmung von Mäusen führte zu einer Erhöhung der zytoplasmatischen Level von HO-1 [86]. Untersuchungen an humanem Gewebe unterstützen diese Erkenntnisse. In der Flüssigkeit der bronchoalveolären Lavage von Patienten mit ARDS hat man eine gesteigerte Konzentration an HO-1 Protein gefunden [85]. Besonders interessant ist auch der Zusammenhang zwischen HO-1 und Zigarettenrauchexposition. An menschlichen Lungenepithelzellen konnte gezeigt werden, dass Zigarettenrauch zu einem signifikanten Anstieg der HO-1-Genexpression in diesen Zellen führt [38,116].

In der Versuchsgruppe der beatmeten Tiere unter Hyperoxie zeigte sich ein signifikanter Anstieg der HO-1-Aktivität im Vergleich zu den beatmeten Mäusen unter Normoxie und den nicht-beatmeten Mäusen unter Hyperoxie [131]. Dieses Ergebnis ist hinweisend darauf, dass die Beatmung mit 100 % Sauerstoff einen dämpfenden Effekt auf die Inflammationsreaktion bei COPD hat. Außerdem kann man daraus ableiten, dass die kurzfristige Beatmung mit 100 % Sauerstoff keinen toxischen Effekt auf die Lunge hat, da keine gesteigerte Expression von HO-1 in der Hyperoxie Gruppe der nicht-beatmeten Tiere zu verzeichnen war.

Das biochemische Verhalten von HO-1 könnte in der Zukunft der therapeutischen Ansätze der COPD wichtig werden. Bei der Pathogenese der COPD spielen genetische Polymorphismen des HO-1 Gens und damit unterschiedliche Ausprägungen der Expression des Enzyms eine Rolle [29]. So konnte eine Studie von Maestrelli et al. zeigen, dass Patienten mit schwerer COPD im Vergleich zu Rauchern mit normaler Lungenfunktion eine geringere Expression von HO-1 in Alveolarmakrophagen haben [74].

#### **4.2.4 Apoptose im Lungengewebe**

Neben der Inflammationsantwort kommt es durch das stumpfe Thoraxtrauma auch zur gesteigerten Apoptose von Alveolarzellen in der Lunge. Dies konnte sowohl bei Patienten mit ARDS [2,77], als auch am Tiermodell mit induziertem Thoraxtrauma mehrfach gezeigt werden [71,107,132]. Die Apoptose, der sogenannte programmierte Zelltod, ist ein Mechanismus zur regulierten Beseitigung von Zellen. Dabei spielen zwei unterschiedliche Pfade eine Rolle: der extrinsische und der intrinsische Pfad [72]. In unterschiedlichen Tiermodellen

wurde gezeigt, dass für die Alveolarzell-Apoptose beim ARDS oder dem hyperoxischen Lungenschaden vor allem der Signalweg über den Fas-Rezeptor, also der extrinsische Weg, entscheidend ist [28,78,134]. Dies konnte wiederum bei Patienten mit ARDS bestätigt werden [2,77]. Der sogenannte Fas-Ligand (FasL) bindet an den Fas-Rezeptor, ein Protein, das zur Familie der TNF-Rezeptoren gehört und initiiert so eine Signalkaskade. Bei Bindung von FasL wird zunächst die Initiatorcaspase Caspase-8 aktiv, die dann wiederum eine Effektorcaspase, zum Beispiel Caspase-3, aktiviert. Caspasen wirken proteolytisch und führen am Ende des Signalwegs zum Angriff auf die DNA der Zelle, die der Apoptose zugeführt werden soll. [72].

Die Beatmung mit 100 % O<sub>2</sub> wurde in verschiedenen Tiermodellen für die Verursachung einer Lungenschädigung durch Apoptose verantwortlich gemacht. In diesen Studien handelte es sich um Untersuchungen an Zelllinien mit prolongierter Hyperoxie bis zu 72 h [80,135]. Im Gegensatz dazu konnten Barth et al. zeigen, dass die kurzfristige Hyperoxie (24h) am porcinen Modell die Apoptose in der Lunge reduzierte [9]. So könnte diese Diskrepanz an der unterschiedlichen Dauer der Hyperoxie liegen. Außerdem scheint, wie schon in Kapitel 4.2.1. ausgeführt, die Betrachtung der Beatmungsmodalitäten bei der Klärung der kontroversen Ergebnisse zu helfen. So lässt sich vermuten, dass eine Hyperoxie-Beatmung mit hohen Tidalvolumina, so wie sie zu einer gesteigerten Inflamationsantwort führt [95,114], auch die vermehrte Apoptose von Alveolarzellen nach sich zieht. Während bei niedrigen Tidalvolumina zwischen Gruppen mit FiO<sub>2</sub> 0.21, 0.3, 0.6, und 1.0 keine Unterschiede der Konzentration an inflammatorischen Zellen und Zytokinen gezeigt werden konnte [17]. In der Gruppe der NonCOPD-Mäuse, die mit 100 % O<sub>2</sub> beatmet wurden, zeigte sich kein signifikanter Anstieg der Caspase-3 verglichen mit der NonCOPD-Gruppe, die mit Raumluft beatmet wurde [131]. Dies spricht wieder dafür, dass die kurzfristige hyperoxische Beatmung, sofern mit niedrigen Tidalvolumina beatmet wird, zumindest nicht schädlich ist.

Welchen Einfluss hat nun die Zigarettenrauchexposition auf die Apoptose? Untersuchungen an humanen Alveolarepithelzellen und Lungenfibroblasten zeigten eine gesteigerte Apoptose dieser Zellen in Abhängigkeit der Zigarettenrauchexposition [91,116]. Bei der Inflamationsreaktion der Lunge auf Zigarettenrauch kommt es unter anderem zur massiven Einwanderung von

neutrophilen Granulozyten [44,140], diese wiederum induzieren die Apoptose von Alveolarzellen über den Fas/FasL-Signalweg [109]. In der vorliegenden Studie wurde die Expression der Effektorcaspase-3 als Marker für den programmierten Zelltod mittels Western Blot ermittelt. Die Zigarettenrauchexposition führte unter der Beatmung mit Raumluft im Vergleich zur NonCOPD-Gruppe zu einem signifikanten Anstieg der Caspase-3. In der Gruppe der Tiere, die zwar mit Zigarettenrauch exponiert wurden, aber auch mit 100 % O<sub>2</sub> beatmet wurden zeigte sich im Vergleich zur COPD-Gruppe unter Raumluft eine signifikant niedrigere Expression der Caspase-3. [131] Es lässt sich also die 2. Hypothese bestätigen: eine hyperoxische Beatmung vermag negative Effekte der Zigarettenrauchexposition zu dämpfen. Sollte dieses Ergebnis in weiteren Studien an Patienten reproduziert werden können, könnte das die Therapie, bezüglich Beatmungsparametern von Traumapatienten mit ARDS und dem gleichzeitig bestehenden Risikofaktor COPD, beeinflussen. Denn nach Albertine et al. geht die vermehrte Apoptose von Alveolarepithelzellen bei Patienten mit ARDS mit einem schlechteren klinischen Outcome einher [2]. Es wurde sogar gezeigt, dass die Höhe der Konzentration von Fas und FasL mit der Mortalität durch ARDS assoziiert ist [2,77].

### **4.3 Limitationen der Studie**

In dieser Arbeit wurde ein seit Jahren erprobtes Thoraxtraumamodell verwendet [45,62,92,133]. Der jedoch kurze Beobachtungszeitraum mit einer Beatmung von 4 h lässt keine Aussagen über Langzeiteffekte auf die Lunge zu. In der Literatur finden sich nur zwei Studien mit einer Ventilationsdauer bei Mäusen von bis zu acht Stunden [50,103]. Die meisten hingegen berichten von einer Beatmungsdauer von vier bis sechs Stunden [99,133].

Des Weiteren ist zu bemerken, dass die Tiere nach Thoraxtrauma per Definition kein ARDS entwickelt haben, da definitionsgemäß der Horowitz-Index für ein mildes ARDS unter 300 mmHg liegen muss. Das könnte in der hier angewandten, sehr schonenden druckkontrollierten lungenprotektiven Beatmung begründet sein, die zusätzlich Blähmanöver zur Rekrutierung entstandener Atelektasen umfasste. Dadurch haben wir beatmungsassoziierte Lungenschäden vermieden, um allein die Effekte der durch das Thoraxtrauma entstandenen Lungenkontusion

untersuchen zu können. In den wenigen Studien, die in der Literatur zu finden sind, bei denen bei mechanisch beatmeten Mäusen der Horowitz-Index die Definition eines ARDS zulässt ( $OI < 300$ ), wurde das ARDS entweder durch Endotoxin-Injektion verursacht [84] oder es wurden schädliche Tidalvolumina (12-35 mL/kg) angewandt [1].

Zuletzt ist zu bemerken, dass bisher in der Literatur keine Studien zu finden sind, die die Kombination aus Thoraxtrauma mit hyperoxischer Beatmung an mit COPD vorgeschädigten Lungen untersuchen. Das erschwert die Vergleichbarkeit unserer Ergebnisse. Umso interessanter und wichtiger wird es vergleichbare Studien anzuschließen, um die therapeutischen Optionen der Hyperoxie unter erschwerten pulmonalen Voraussetzungen zu definieren.

#### **4.4 Schlussfolgerung und Ausblick**

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Einfluss einer Co-Morbidität auf die Lungenfunktion und Entzündungsreaktion, in einem reproduzierbaren Tiermodell untersucht und zusätzlich die Effekte einer Beatmung mit 100 % Sauerstoff beleuchtet. Um einen Beitrag zur Klärung der Diskussion um die Vor- und Nachteile der hyperoxischen Beatmung zu leisten, sollte folgende Hypothese bestätigt werden: Eine Beatmung mit 100 %  $O_2$  vermag die Inflammationsreaktion und die negativen Effekte auf Lungenmechanik und Gasaustausch bei Tieren mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung nach einem stumpfen Thoraxtrauma zu mildern. Mit den vorliegenden Ergebnissen ließ sich diese Hypothese in Teilen bestätigen. Um jedoch eine eindeutigere Aussage treffen zu können und die Ergebnisse somit auf die Behandlung von Patienten umsetzen zu können, was das Ziel jeder wissenschaftlichen Arbeit sein sollte, bedarf es weiteren Untersuchungen. Denn es hat sich gezeigt, dass mit diesem Modell zwar die Voraussetzungen, nämlich Lungenkontusion nach Thoraxtrauma und eine COPD, reproduziert werden konnten, jedoch weiterführende und zusätzliche Untersuchungsmethoden zur Evaluierung der Wirksamkeit der Hyperoxie notwendig sind.

## 5 Zusammenfassung

Das stumpfe Thoraxtrauma stellt ein häufiges Verletzungsmuster bei polytraumatisierten Patienten dar. Viele dieser Patienten leiden, neben den akuten Folgen, zusätzlich auch an einer Reihe von Grunderkrankungen. Eine der Häufigsten, die Lunge betreffende Erkrankung, ist die COPD (Chronic obstructive pulmonary disease). Solch eine vorbestehende Alteration der Lunge, wie sie durch eine chronische Zigarettenrauchexposition entstehen kann, ist mit einem höheren Risiko verbunden, ein ARDS (Acute respiratory distress syndrome) nach Thoraxtrauma zu entwickeln. Eine kurzzeitige Beatmung mit 100 % Sauerstoff führte in verschiedenen Tierexperimenten zu einer abgeschwächten pulmonalen Inflamationsantwort. Auf der anderen Seite kann eine Hyperoxie aber auch zu oxidativem Stress mit potentiell schädlichen Effekten wie z.B. einem erhöhten Zelltod oder DNA-Schäden führen.

Ziel dieser Studie war es daher, Effekte einer vorbestehenden Zigarettenrauchexposition auf die posttraumatische Inflamationsreaktion der Lunge nach stumpfem Thoraxtrauma zu evaluieren. Ferner sollten die zusätzlichen Effekte einer Beatmung mit 100 % Sauerstoff im Vergleich zu einer Beatmung mit Raumluft (21 % Sauerstoff) analysiert werden.

Insgesamt wurde 32 Mäusen, nach standardisiertem Schema, ein stumpfes Thoraxtrauma zugefügt. Die Hälfte der Tiere wurde zuvor einer 3 – 4 wöchigen Zigarettenrauchexposition in einem dafür spezialisierten Labor unterzogen. Das Thoraxtrauma wurde bei den Versuchstieren unter Analgosedierung in Spontanatmung durchgeführt. Direkt nach Thoraxtrauma wurden alle Tiere umgehend tracheotomiert und lungen-protektiv beatmet (entweder mit 100 % oder mit 21% Sauerstoff). Alle Tiere erhielten, analog intensivmedizinisch behandelter Patienten, zudem einen zentralen Venenkatheter, einen arteriellen Katheter, einen Blasenkatheter sowie eine Temperatursonde. Neben dem kontinuierlichen hämodynamischen Monitoring und der Überwachung der Beatmungparameter wurden regelmäßig Compliancemessungen sowie Blutgasanalysen durchgeführt. Nach einer Beatmungsdauer von vier Stunden erfolgte die Organentnahme für die Gewebsuntersuchung. Aus Lungengewebe und Blutproben wurde eine Einzelzell - Gelelektrophorese (Comet Assay) zur Bestimmung der DNA-Schäden

durchgeführt. Ferner wurden aus dem Lungengewebe mittels Westernblot die Aktivität von HIF-1 $\alpha$  (Hypoxie-induzierte Faktor 1  $\alpha$ ), HO-1 (Hämoxygenase-1) und Caspase 3 bestimmt.

Es zeigte sich ein erniedrigter Sauerstoffpartialdruck, sowie Oxygenierungsindex bei den zigarettenrauchexponierten Tieren. Die Compliance der beatmeten Mäuse war sowohl unter Normoxie als auch unter Hyperoxie im Vergleich zu den nicht beatmeten Tieren erhöht. Unter Hyperoxie zeigte sich ferner ein Anstieg des zytoprotektiven Enzyms Hämoxygenase-1 bei den zigarettenrauchexponierten Tieren. Die HIF-1 $\alpha$  Expression war in den beiden hyperoxischen Gruppe verglichen mit der normoxischen, nicht-exponierten Gruppe reduziert. Die aktivierte Caspase-3 war in der rauchexponierten normoxischen Gruppe signifikant erhöht. Im Comet Assay zeigten sich keinerlei Unterschiede zwischen den Gruppen.

Nach stumpfem Thoraxtrauma führt eine vorausgegangene chronische Zigarettenrauchexposition zu einer Beeinträchtigung der Oxygenierung, was auf verdickte Alveolarmembranen als Folge einer erhöhten Anfälligkeit des Lungengewebes für Apoptose und Inflammation zurückgeführt werden könnte. Die Compliance ist bei den rauchexponierten Tieren sowohl unter Normoxie als auch unter Hyperoxie verbessert. Dies könnte auf eine COPD - typische Überblähung der Lunge hindeuten.

Eine kurzzeitige Beatmung mit 100 % Sauerstoff war nicht mit schädlichen Effekten auf die Lungenmechanik, den Gasaustausch oder die lokale Inflammationsantwort vergesellschaftet. Allerdings konnte auch kein bedeutender Vorteil einer Hyperoxie nachgewiesen werden.

Bei den zigarettenrauchexponierten Tieren reduzierte die Hyperoxie die Apoptose im Lungengewebe eventuell als Folge einer Hochregulation der anti-inflammatorischen und anti-apoptotischen Hämoxygenase-1.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Albaiceta G M, Fernandez A, Parra D, Gonzalo J A, Garcia-Prieto E, Taboada F: Mechanical ventilation causes monocyte deactivation in intact and endotoxin-treated mice. *Journal of trauma, injury, infection, and critical care*, 64: 470-476 (2008)
2. Albertine K H, Soulier M F, Wang Z, Ishizaka A, Hashimoto S, Zimmerman G A, Matthay M A, Ware L B: Fas and fas ligand are up-regulated in pulmonary edema fluid and lung tissue of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *American Journal of Pathology*, 161: 1783-1796 (2002)
3. Albuszies G, Radermacher P, Vogt J, Wachter U, Weber S, Schoaff M, Georgieff M, Barth E: Effect of increased cardiac output on hepatic and intestinal microcirculatory blood flow, oxygenation, and metabolism in hyperdynamic murine septic shock. *Critical Care Medicine*, 33: 2332-2338 (2005)
4. Al-Salmani K, Abbas H H, Schulpen S, Karbaschi M, Abdalla I, Bowman K J, So K K, Evans M D, Jones G D, Godschalk R W, Cooke M S: Simplified method for the collection, storage, and comet assay analysis of DNA damage in whole blood. *Free radical biology & medicine*, 51: 719-725 (2011)
5. Ambrosino N, Aniwidyaningsih W, Annesi-Maesano I, Bakke P, Blasi F, Borg S, Bracke K, Brusselle G, Burge G, Bush A, Cano N, Carlsen K -, Chavannes N H, Clancy L, Cordier J -, Costabel U, Cottin V, Cullinan P, Decramer M, Demedts M, Drysdale S, Elborn J S, Chung K F, Fletcher M, Gerritsen J, Gibson G J, Greenough A, Gulsvik A, Gupta R P, Hardavella G, Heederik D, Hecker M, Humbert M, Künzli N, Lerut T, Limb E S, Loddenkemper R, Mayer K, Migliori G B, Navani N, Nemery B, Nicod L, Nowak D, Olofsson S, Palange P, Pelosi P, Perez L, Persson U, Pison C, Rapp R, Riha R L, Seeger W, Sibille Y, Simonds A K, Simoni M, Sotgiu G, Spiro S, Steenbruggen I, Stevenson R, Strachan D P, Svenson J, Tønnesen P, Townsend J, Troosters T, Turner S, Van Schil P, Varraso R, Viegi G, Wedzicha J A, Welte T, Williams S: European lung white book. 1, European respiratory society, England, Available:

[https://www.erswhitebook.org/files/public/Chapters/01\\_burden.pdf](https://www.erswhitebook.org/files/public/Chapters/01_burden.pdf),

[https://www.erswhitebook.org/files/public/Chapters/13\\_COPD.pdf](https://www.erswhitebook.org/files/public/Chapters/13_COPD.pdf) (25.03.2014)

6. Ashbaugh D G, Bigelow D B, Petty T L, Levine B E: Acute respiratory distress in adults. *The Lancet*, 2: 319-323 (1967)

7. Aumann I, Prenzler A: Epidemiologie und Kosten der COPD in Deutschland - Eine Literaturrecherche zu Prävalenz, Inzidenz und Krankheitskosten. *klinikaerzt*, 42: 168-172 (2013)

8. Azqueta A, Collins A R: The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of Toxicology*, 87: 949-968 (2013)

9. Barth E, Bassi G, Maybauer D M, Simon F, Groger M, Oter S, Speit G, Nguyen C D, Hasel C, Moller P, Wachter U, Vogt J A, Matejovic M, Radermacher P, Calzia E, Effects of ventilation with 100% oxygen during early hyperdynamic porcine fecal peritonitis \*. *Critical Care Medicine*, 36: 495-503 (2008)

10. Barth E, Radermacher P, Thiemermann C, Weber S, Georgieff M, Albuszies G: Role of inducible nitric oxide synthase in the reduced responsiveness of the myocardium to catecholamines in a hyperdynamic, murine model of septic shock. *Critical Care Medicine*, 34: 307-313 (2006)

11. Baumgart K, Wagner F, Groger M, Weber S, Barth E, Vogt J A, Wachter U, Huber-Lang M, Knoferl M W, Albuszies G, Georgieff M, Asfar P, Szabo C, Calzia E, Radermacher P, Simkova V: Cardiac and metabolic effects of hypothermia and inhaled hydrogen sulfide in anesthetized and ventilated mice. *Critical Care Medicine*, 38: 588-595 (2010)

12. Berchner-Pfannschmidt U, Yamac H, Trinidad B, Fandrey J: Nitric Oxide Modulates Oxygen Sensing by Hypoxia-inducible Factor 1-dependent Induction of Prolyl Hydroxylase 2. *The Journal of biological chemistry*, 282: 1788-1796 (2007)

13. Black P N, Ching P S, Beaumont B, Ranasinghe S, Taylor G, Merrilees M J: Changes in elastic fibres in the small airways and alveoli in COPD. *The European Respiratory Journal*, 31: 998-1004 (2008)

14. Blanco I, Gimeno E, Munoz P A, Pizarro S, Gistau C, Rodriguez-Roisin R, Roca J, Barbera J A: Hemodynamic and gas exchange effects of sildenafil in patients with chronic obstructive pulmonary disease and pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 181: 270-278 (2010)
15. Calfee C S, Matthay M A, Eisner M D, Benowitz N, Call M, Pittet J F, Cohen M J: Active and passive cigarette smoking and acute lung injury after severe blunt trauma. *American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine*, 183: 1660-1665 (2011)
16. Calzia E, Asfar P, Hauser B, Matejovic M, Ballestra C, Radermacher P, Georgieff M: Hyperoxia may be beneficial. *Critical Care Medicine*, 38: 559-68 (2010)
17. Cannizzaro V, Berry L J, Zosky G R, Turner D J, Hantos Z, Sly P D: Impact of supplemental oxygen in mechanically ventilated adult and infant mice. *Respiratory Physiology & Neurobiology.*, 165: 61-66 (2009)
18. Cavarra E, Lucattelli M, Gambelli F, Bartalesi B, Fineschi S, Szarka A, Giannerini F, Martorana P A, Lungarella G: Human SLPI inactivation after cigarette smoke exposure in a new in vivo model of pulmonary oxidative stress. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology.*, 281: 412-417 (2001)
19. Chuang C H, Hu M L: Use of whole blood directly for single-cell gel electrophoresis (comet) assay in vivo and white blood cells for in vitro assay. *Mutation research*, 564: 75-82 (2004)
20. Clemenson C J: Blast injury. *Physiological Reviews*, 36: 336-354 (1956)
21. Cohn S M: Pulmonary contusion: review of the clinical entity. *Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care*, 42: 973-979 (1997)
22. Cohn S M, Dubose J J: Pulmonary contusion: an update on recent advances in clinical management. *World journal of surgery*, 34: 1959-1970 (2010)

23. Collins A R, Duthie S J, Dobson V L: Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis*, 14: 1733-1735 (1993)
24. Coon M J, Ding X X, Pernecky S J, Vaz A D: Cytochrome P450: progress and predictions. *The official Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 6: 669-673 (1992)
25. Costa R A, Romagna C D, Pereira J L, Souza-Pinto N C: The role of mitochondrial DNA damage in the cytotoxicity of reactive oxygen species. *Journal of Bioenergetics & Biomembranes*, 43: 25-29 (2011)
26. Costa R A, Romagna C D, Pereira J L, Souza-Pinto N C: The role of mitochondrial DNA damage in the cytotoxicity of reactive oxygen species. *Journal of Bioenergetics & Biomembranes*, 43: 25-29 (2011)
27. Danzeisen O, Priebe H J: Routinemäßige Verwendung hoher inspiratorischen Sauerstoffkonzentrationen - Pro. *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie*, 40: 350-353 (2005)
28. De Paepe M E, Mao Q, Chao Y, Powell J L, Rubin L P, Sharma S: Hyperoxia-induced apoptosis and Fas/FasL expression in lung epithelial cells. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology.*, 289: 647-659 (2005)
29. Dolinay T, Choi A M, Ryter S W: Heme oxygenase-1/CO as protective mediators in cigarette smoke-induced lung cell injury and chronic obstructive pulmonary disease. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13: 769-776 (2012)
30. Elbehairy A F, Ciavaglia C E, Webb K A: Pulmonary Gas Exchange Abnormalities in Mild Chronic Obstructive Pulmonary Disease, Implications for Dyspnea and Exercise Intolerance. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 191: 1384-1394 (2015)

31. Elsayed N M, Gorbunov N V, Kagan V E: A proposed biochemical mechanism involving hemoglobin for blast overpressure-induced injury. *Toxicology*, 121: 81-90 (1997)
32. Eltzschig H K, Carmeliet P: Hypoxia and Inflammation. *The New England Journal of Medicine*, 364: 656-665 (2011)
33. Ersson C, Moller P, Forchhammer L, Loft S, Azqueta A, Godschalk R W, van Schooten F J, Jones G D, Higgins J A, Cooke M S, Mistry V, Karbaschi M, Phillips D H, Sozeri O, Routledge M N, Nelson-Smith K, Riso P, Porrini M, Matullo G, Allione A, Stepnik M, Ferlinska M, Teixeira J P, Costa S, Corcuera L A, Lopez de Cerain A, Laffon B, Valdiglesias V, Collins A R, Moller L: An ECVAG inter-laboratory validation study of the comet assay: inter-laboratory and intra-laboratory variations of DNA strand breaks and FPG-sensitive sites in human mononuclear cells. *Mutagenesis*, 28: 279-286 (2013)
34. Feng Y, Zhang Z, Li Q, Li W, Xu J, Cao H: Hyperbaric oxygen preconditioning protects lung against hyperoxic acute lung injury in rats via heme oxygenase-1 induction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 456: 549-554 (2015)
35. Finkel T, Holbrook N J: Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408: 239-247 (2000)
36. Finlay G A, O'Donnell M D, O'Connor C M, Hayes J P, FitzGerald M X: Elastin and collagen remodeling in emphysema. A scanning electron microscopy study. *American Journal of Pathology*, 149: 1405-1415 (1996)
37. Forchhammer L, Johansson C, Loft S, Moller L, Godschalk R W, Langie S A, Jones G D, Kwok R W, Collins A R, Azqueta A, Phillips D H, Sozeri O, Stepnik M, Palus J, Vogel U, Wallin H, Routledge M N, Handforth C, Allione A, Matullo G, Teixeira J P, Costa S, Riso P, Porrini M, Moller P: Variation in the measurement of DNA damage by comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial. *Mutagenesis*, 25: 113-123 (2010)

38. Fukano Y, Oishi M, Chibana F, Numazawa S, Yoshida T: Analysis of the expression of heme oxygenase-1 gene in human alveolar epithelial cells exposed to cigarette smoke condensate. *Journal of Toxicological Sciences*, 31: 99-109 (2006)
39. Gaillard M, Herve C, Mandin L, Raynaud P: Mortality prognostic factors in chest injury. *Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care*, 30: 93-96 (1990)
40. Geraghty P, Wyman A E, Garcia-Arcos I, Dabo A J, Gadhvi S, Foronjy R: STAT3 modulates cigarette smoke-induced inflammation and protease expression. *Frontiers in Physiology*, 4: 1-10 (2013)
41. Gokce M, Saydam O, Hanci V, Can M, Bahadir B: Antioxidant vitamins C, E and coenzyme Q10 vs dexamethasone: comparisons of their effects in pulmonary contusion model. *Journal of Cardiothoracic Surgery*, 7: 1-9 (2012)
42. GOLD-The Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease: Pocket guide to COPD diagnosis, management, and prevention; A Guide for Health Care Professionals; 2017 Report, The Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease, Inc. Available: <http://goldcopd.org/wp-content/uploads/2016/12/wms-GOLD-2017-Pocket-Guide.pdf> (10.05.2017)
43. Gozzelino R, Jeney V, Soares M P: Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology*, 50: 323-354 (2010)
44. Guan S P, Tee W, Ng D S, Chan T K, Peh H Y, Ho W E, Cheng C, Mak J C, Wong W S: Andrographolide protects against cigarette smoke-induced oxidative lung injury via augmentation of Nrf2 activity. *British Journal of Pharmacology*, 168: 1707-1718 (2013)
45. Hafner S, Wagner K, Wepler M, Matallo J, Groger M, McCook O, Scheuerle A, Huber-Lang M, Frick M, Weber S, Stahl B, Jung B, Calzia E, Georgieff M, Moller P, Dietl P, Radermacher P, Wagner F: Physiological and immune-biological characterization of a long-term murine model of blunt chest trauma. *Shock*, 43: 140-147 (2015)

46. Hauser B, Barth E, Bassi G, Simon F, Groger M, Oter S, Speit G, Ploner F, Moller P, Wachter U, Vogt J A, Matejovic M, Calzia E, Georgieff M, Radermacher P, Maybauer D M: Hemodynamic, metabolic, and organ function effects of pure oxygen ventilation during established fecal peritonitis-induced septic shock. *Critical Care Medicine*, 37: 2465-2469 (2009)
47. Heinicke K, Hofer T, Wenger R H, Gassmann M: Die zelluläre Antwort auf Sauerstoffmangel, The cellular response to hypoxia. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, 53: 270-276 (2002)
48. Herold G, Bösch D: Chronisch obstruktive Lungenkrankheit (COPD) [J44.99] und chronische Bronchitis. In: Herold G (Hrsg) *Innere Medizin*, S. 349-355 (2013)
49. Hirsch J, Chalkley R J, Bentley T, Burlingame A L, Frank J A: Double impact of cigarette smoke and mechanical ventilation on the alveolar epithelial type II cell. *Critical Care*, 18: 1-12 (2014)
50. Hoetzel A, Dolinay T, Vallbracht S, Zhang Y, Kim H P, Ifedigbo E, Alber S, Kaynar A M, Schmidt R, Ryter S W, Choi A M: Carbon monoxide protects against ventilator-induced lung injury via PPAR-gamma and inhibition of Egr-1. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 177: 1223-1232 (2008)
51. Hoth J J, Hudson W P, Brownlee N A, Yoza B K, Hiltbold E M, Meredith J W, McCall C E: Toll-like receptor 2 participates in the response to lung injury in a murine model of pulmonary contusion. *Shock*, 28: 447-452 (2007)
52. Huang L E, Willmore W G, Gu J, Goldberg M A, Bunn H F: Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activation by carbon monoxide and nitric oxide. Implications for oxygen sensing and signaling. *The Journal of biological chemistry*, 274: 9038-9044 (1999)
53. Huckstorf C: Kapitel 5: Atmung Huppelsberg, Jens; Walter, Kerst. In: Huppelsberg J and Walter K (Hrsg) *Kurzlehrbuch Physiologie*, 4, Thieme Verlagsgruppe, Stuttgart, S. 98-122 (2013)

54. Hudson L D, Milberg J A, Anardi D, Maunder R J: Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine*, 151: 293-301 (1995)
55. Irwin R J, Lerner M R, Bealer J F, Brackett D J, Tuggle D W: Cardiopulmonary physiology of primary blast injury. *Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care*, 43: 650-655 (1997)
56. Jaffin J H, McKinney L, Kinney R C, Cunningham J A, Moritz D M, Kraimer J M, Graeber G M, Moe J B, Salander J M, Harmon J W: A laboratory model for studying blast overpressure injury. *Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care*, 27: 349-356 (1987)
57. Jiang B H, Semenza G L, Bauer C, Marti H H: Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O<sub>2</sub> tension. *The American journal of physiology*, 271: 1172-1180 (1996)
58. Jiang H, Zhu Y, Xu H, Sun Y, Li Q: Activation of hypoxia-inducible factor-1alpha via nuclear factor-kappa B in rats with chronic obstructive pulmonary disease. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 42: 483-488 (2010)
59. Joenje H: Genetic toxicology of oxygen. *Mutation research*, 219: 193-208 (1989)
60. Kerr M E, Bender C M, Monti E J: An introduction to oxygen free radicals. *Heart & Lung*, 25: 200-209 (1996)
61. Knight P R, Holm B A: The three components of hyperoxia. *Anesthesiology*, 93: 3-5 (2000)
62. Knoferl M W, Liener U C, Perl M, Bruckner U B, Kinzl L, Gebhard F: Blunt chest trauma induces delayed splenic immunosuppression. *Shock*, 22: 51-56 (2004)

63. Knoferl M W, Liener U C, Seitz D H, Perl M, Bruckner U B, Kinzl L, Gebhard F: Cardiopulmonary, Histological, and Inflammatory Alterations After Lung Contusion in a Novel Mouse Model of Blunt Chest Trauma. *Shock*, 19: 519-525 (2003)
64. Kumar V, Abbas A K, Aster J C: The Lung - Obstructive Lung Diseases. In: Kumar et al. (Hrsg) *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*, 9th edition, Saunders W.B., New York, S. 674-677 (2014)
65. Kyjovska Z O, Jacobsen N R, Saber A T, Bengtson S, Jackson P, Wallin H, Vogel U: DNA damage following pulmonary exposure by instillation to low doses of carbon black (Printex 90) nanoparticles in mice. *Environmental and molecular mutagenesis*, 56: 41-49 (2015)
66. Kyjovska Z O, Jacobsen N R, Saber A T, Bengtson S, Jackson P, Wallin H, Vogel U: DNA strand breaks, acute phase response and inflammation following pulmonary exposure by instillation to the diesel exhaust particle NIST1650b in mice. *Mutagenesis*, 30: 499-507 (2015)
67. Laurell C B, Eriksson S: The Electrophoretic  $\alpha_1$ -Globulin Pattern of Serum in  $\alpha_1$ -Antitrypsin Deficiency. *COPD: Journal of chronic obstructive pulmonary disease*, 10: 3-8 (2013)
68. Lee S H, Lee S H, Kim C H, Yang K S, Lee E J, Min K H, Hur G Y, Lee S H, Lee S Y, Kim J H, Shin C, Shim J J, In K H, Kang K H, Lee S Y: Increased expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia inducible factor-1alpha in lung tissue of patients with chronic bronchitis. *Clinical biochemistry*, 47: 552-559 (2014)
69. Lefering R, Waydhas C, Huber-Wagner S, Nienaber U: Traumaregister DGU, Jahresbericht 2016, Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie, (2016)
70. Liener U C, Knöferl M W, Sträter J, Pauser E, Brückner U B, Nuessler A K, Kinzl L, Gebhard F: Induziert das stumpfe Thoraxtrauma einen programmierten Zelltod im Lungengewebe? In: Siewert J R (Hrsg) *Chirurgisches Forum 2002 für experimentelle und klinische Forschung*, Bd 31, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, S. 395-397 (2002)

71. Liener U C, Knoferl M W, Strater J, Barth T F, Pauser E M, Nussler A K, Kinzl L, Bruckner U B, Gebhard F: Induction of apoptosis following blunt chest trauma. *Shock*, 20: 511-516 (2003)
72. Löffler G, Petrides P E, Heinrich P C: Kapitel 7 Replikation und Gentechnik, 7.1 Der Zellzyklus, 7.1.5 Apoptose oder der programmierte Zelltod. In: Löffler et al. (Hrsg) *Biochemie & Pathobiochemie*, 8. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, S. 225-227 (2007)
73. Löffler G, Petrides P E, Heinrich P C: Kapitel 28 Funktion der Nieren und Regulation des Wasser- und Elektrolyt-Haushalt, 28.1.10 Die Niere als endokrines Organ. In: Löffler et al. (Hrsg) *Biochemie & Pathobiochemie*, 8. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, S. 910-913 (2007)
74. Maestrelli P, Paska C, Saetta M, Turato G, Nowicki Y, Monti S, Formichi B, Miniati M, Fabbri L M: Decreased haem oxygenase-1 and increased inducible nitric oxide synthase in the lung of severe COPD patients. *The European respiratory journal*, 21: 971-976 (2003)
75. Magder S: Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? *Critical Care*, 10: 1-8 (2006)
76. Martorana P A, Beume R, Lucattelli M, Wollin L, Lungarella G: Roflumilast fully prevents emphysema in mice chronically exposed to cigarette smoke. *American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine*, 172: 848-853 (2005)
77. Matute-Bello G, Liles W C, Steinberg K P, Kiener P A, Mongovin S, Chi E Y, Jonas M, Martin T R: Soluble Fas ligand induces epithelial cell apoptosis in humans with acute lung injury (ARDS). *The Journal of Immunology*, 163: 2217-2225 (1999)
78. Matute-Bello G, Winn R K, Jonas M, Chi E Y, Martin T R, Liles W C: Fas (CD95) induces alveolar epithelial cell apoptosis in vivo: implications for acute pulmonary inflammation. *The American journal of pathology*, 158: 153-161 (2001)

79. Maynard S, Schurman S H, Harboe C, de Souza-Pinto N C, Bohr V A: Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis*, 30: 2-10 (2009)
80. McGrath-Morrow S A, Stahl J: Apoptosis in neonatal murine lung exposed to hyperoxia. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 25: 150-155 (2001)
81. Metzen E, Zhou J, Jelkmann W, Fandrey J, Brune B: Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1 $\alpha$  by inhibition of prolyl hydroxylases. *Molecular Biology of the Cell*, 14: 3470-3481 (2003)
82. Miller P R, Croce M A, Bee T K, Qaisi W G, Smith C P, Collins G L, Fabian T C: ARDS after pulmonary contusion: accurate measurement of contusion volume identifies high-risk patients. *Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care*, 51: 223-228 (2001)
83. Montalbano A M, Anzalone G, Albano G D, Sano C D, Gagliardo R, Bonanno A, Riccobono L, Nicolini G, Ingrassia E, Gjemarkaj M, Profita M: Beclomethasone dipropionate and formoterol reduce oxidative/nitrosative stress generated by cigarette smoke extracts and IL-17A in human bronchial epithelial cells. *European Journal of Pharmacology*, 718: 418-427 (2013)
84. Muller-Redetzky H C, Will D, Hellwig K, Kummer W, Tschernig T, Pfeil U, Paddenberg R, Menger M D, Kershaw O, Gruber A D, Weissmann N, Hippenstiel S, Suttrop N, Witzenrath M: Mechanical ventilation drives pneumococcal pneumonia into lung injury and sepsis in mice: protection by adrenomedullin. *Critical Care*, 18: 1-13 (2014)
85. Mumby S, Upton R L, Chen Y, Stanford S J, Quinlan G J, Nicholson A G, Gutteridge J M, Lamb N J, Evans T W: Lung heme oxygenase-1 is elevated in acute respiratory distress syndrome. *Critical Care Medicine*, 32: 1130-1135 (2004)
86. Namba F, Go H, Murphy J A, La P, Yang G, Sengupta S, Fernando A P, Yohannes M, Biswas C, Wehrli S L, Dennery P A: Expression Level and Subcellular Localization of Heme Oxygenase-1 Modulates Its Cytoprotective

Properties in Response to Lung Injury: A Mouse Model. Public Library of Science One, 9: 1-11 (2014)

87. O'Connor J V, Kufera J A, Kerns T J, Stein D M, Ho S, Dischinger P C, Scalea T M: Crash and occupant predictors of pulmonary contusion. Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care, 66: 1091-1095 (2009)

88. Olive P L, Banath J P: The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. Nature Protocols, 1: 23-29 (2006)

89. Osborne S, Hogg J C, Wright J L, Coppin C, Pare P D: Exponential analysis of the pressure-volume curve. Correlation with mean linear intercept and emphysema in human lungs. The American review of respiratory disease, 137: 1083-1088 (1988)

90. Papandrinopoulou D, Tzouda V, Tsoukalas G: Lung compliance and chronic obstructive pulmonary disease. Pulmonary Medicine, 2012: 1-6 (2012)

91. Park J W, Ryter S W, Kyung S Y, Lee S P, Jeong S H: The phosphodiesterase 4 inhibitor rolipram protects against cigarette smoke extract-induced apoptosis in human lung fibroblasts. European Journal of Pharmacology, 706: 76-83 (2013)

92. Perl M, Gebhard F, Braumuller S, Tauchmann B, Bruckner U B, Kinzl L, Knoferl M W: The pulmonary and hepatic immune microenvironment and its contribution to the early systemic inflammation following blunt chest trauma. Critical Care Medicine, 34: 1152-1159 (2006)

93. Portillo K, Torralba Y, Blanco I, Burgos F, Rodriguez-Roisin R, Rios J, Roca J, Barbera J A: Pulmonary hemodynamic profile in chronic obstructive pulmonary disease. International journal of chronic obstructive pulmonary disease, 10: 1313-1320 (2015)

94. Poss K D, Tonegawa S: Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94: 10925-10930 (1997)

95. Quinn D A, Moufarrej R K, Volokhov A, Hales C A: Interactions of lung stretch, hyperoxia, and MIP-2 production in ventilator-induced lung injury. *Journal of Applied Physiology*, 93: 517-525 (2002)
96. Raghavendran K, Davidson B A, Woytash J A, Helinski J D, Marschke C J, Manderscheid P A, Notter R H, Knight P R: The evolution of isolated bilateral lung contusion from blunt chest trauma in rats: cellular and cytokine responses. *Shock*, 24: 132-138 (2005)
97. Ranieri V M, Rubenfeld G D, Thompson B T, Ferguson N D, Caldwell E, Fan E, Fan E, Slutsky A S: Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *Journal of the American Medical Association*, 307: 2526-2533 (2012)
98. Reeve V E, Tyrrell R M: Heme oxygenase induction mediates the photoimmunoprotective activity of UVA radiation in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 9317-9321 (1999)
99. Reiss L K, Kowallik A, Uhlig S: Recurrent Recruitment Manoeuvres Improve Lung Mechanics and Minimize Lung Injury during Mechanical Ventilation of Healthy Mice. *Public Library of Science One*, 6: 1-15 (2011)
100. Rothen H U, Sporre B, Engberg G, Wegenius G, Reber A, Hedenstierna G: Atelectasis and pulmonary shunting during induction of general anaesthesia-can they be avoided? *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 40: 524-529 (1996)
101. Santos C, Ferrer M, Roca J, Torres A, Hernandez C, Rodriguez-Roisin R: Pulmonary gas exchange response to oxygen breathing in acute lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 161: 26-31 (2000)
102. Saure E W, Eagan T M, Jensen R L, Voll-Aanerud M, Aukrust P, Bakke P S, Hardie J A: Explained variance for blood gases in a population with COPD. *The clinical respiratory journal*, 6: 72-80 (2012)
103. Schellekens W J, van Hees H W, Linkels M, Dekhuijzen P N, Scheffer G J, van der Hoeven J G, Heunks L M: Levosimendan affects oxidative and

inflammatory pathways in the diaphragm of ventilated endotoxemic mice. *Critical Care*, 19: 1-9 (2015)

104. Schmidt R F, Lang F, Heckmann M: Kapitel 32, Lungenatmung, 32.3 Atmungsmechanik. In: Schmidt et al. (Hrsg) *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*, 31, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, S. 707-716 (2010)

105. Schreiter D, Reske A, Stichert B, Seiwerts M, Bohm S H, Kloeppel R, Josten C: Alveolar recruitment in combination with sufficient positive end-expiratory pressure increases oxygenation and lung aeration in patients with severe chest trauma. *Critical Care Medicine*, 32: 968-975 (2004)

106. Seimetz M, Parajuli N, Pichl A, Bednorz M, Ghofrani H A, Schermuly R T, Seeger W, Grimminger F, Weissmann N: Cigarette Smoke-Induced Emphysema and Pulmonary Hypertension Can Be Prevented by Phosphodiesterase 4 and 5 Inhibition in Mice. *Public Library of Science One*, 10: 1-16 (2015)

107. Seitz D H, Perl M, Mangold S, Neddermann A, Braumuller S T, Zhou S, Bachem M G, HuberLang M S, Knoferl M W: Pulmonary contusion induces alveolar type 2 epithelial cell apoptosis: Role of alveolar macrophages and neutrophils. *Shock*, 30: 537-544 (2008)

108. Semenza G L: Life with Oxygen. *Science*, 318: 62-64 (2007)

109. Serrao K L, Fortenberry J D, Owens M L, Harris F L, Brown L A: Neutrophils induce apoptosis of lung epithelial cells via release of soluble Fas ligand. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 280: 298-305 (2001)

110. Shaposhnikov S, Larsson C, Henriksson S, Collins A, Nilsson M: Detection of Alu sequences and mtDNA in comets using padlock probes. *Mutagenesis*, 21: 243-247 (2006)

111. Shinohara T, Kaneko T, Nagashima Y, Ueda A, Tagawa A, Ishigatsubo Y: Adenovirus-mediated transfer and overexpression of heme oxygenase 1 cDNA in

lungs attenuates elastase-induced pulmonary emphysema in mice. *Human Gene Therapy*, 16: 318-327 (2005)

112. Shorr R M, Crittenden M, Indeck M, Hartunian S L, Rodriguez A: Blunt thoracic trauma. Analysis of 515 patients. *Annals of Surgery*, 206: 200-205 (1987)

113. Simon M, Braune S, Kluge S: Die Berlin-Definition des ARDS. *Intensiv-News*, 17: 1-4 (2013)

114. Sinclair S E, Altemeier W A, Matute-Bello G, Chi E Y: Augmented lung injury due to interaction between hyperoxia and mechanical ventilation. *Critical Care Medicine*, 32: 2496-2501 (2004)

115. Sirmali M, Solak O, Tezel C, Sirmali R, Ginis Z, Atik D, Agackiran Y, Koylu H, Delibas N: Comparative analysis of the protective effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on pulmonary contusion lung oxidative stress and serum copper and zinc levels in experimental rat model. *Biological trace element research*, 151: 50-58 (2013)

116. Slebos D -, Ryter S W, van der Toorn M, Liu F, Guo F, Baty C J, Karlsson J M, Watkins S C, Kim H P, Wang X, Lee J S, Postma D S, Kauffman H F, Choi A M K: Mitochondrial localization and function of heme oxygenase-1 in cigarette smoke-induced cell death. *American Journal of Physiology. Lung cellular and molecular physiology.*, 292: 53-27 (2007)

117. Sogawa K, Numayama-Tsuruta K, Ema M, Abe M, Abe H, Fujii-Kuriyama Y: Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activity by nitric oxide donors in hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 7368-7373 (1998)

118. Statistisches Bundesamt: Gesundheit, Todesursachen in Deutschland, 2015, Fachserie 12, Reihe 4. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, Available: [https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400157004.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400157004.pdf?__blob=publicationFile) (10.05.2017)

119. Statistisches Bundesamt: Verkehr, Verkehrsunfall, Januar 2017, Fachserie 8, Reihe 7. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, Available: [https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/TransportVerkehr/Verkehrsunfaelle/VerkehrsunfaelleJ2080700167004.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/TransportVerkehr/Verkehrsunfaelle/VerkehrsunfaelleJ2080700167004.pdf?__blob=publicationFile) (10.05.2017)
120. Suter P M, Fairley H B, Schlobohm R M: Shunt, lung volume and perfusion during short periods of ventilation with oxygen. *Anesthesiology*, 43: 617-627 (1975)
121. Suttner S, Boldt J: Routinemäßige Verwendung hoher inspiratorischer Sauerstoffkonzentrationen - Kontra. *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie*, 40: 354-357 (2005)
122. Tenhunen R, Marver H S, Schmid R: The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 61: 748-755 (1968)
123. Topcu-Tarladacalisir Y, Tarladacalisir T, Sapmaz-Metin M, Karamustafaoglu A, Uz Y H, Akpolat M, Cerkezkayabekir A, Turan F N: N-Acetylcysteine counteracts oxidative stress and protects alveolar epithelial cells from lung contusion-induced apoptosis in rats with blunt chest trauma. *Journal of molecular histology*, 45: 463-471 (2014)
124. Tracz M J, Juncos J P, Grande J P, Croatt A J, Ackerman A W, Rajagopalan G, Knutson K L, Badley A D, Griffin M D, Alam J, Nath K A: Renal hemodynamic, inflammatory, and apoptotic responses to lipopolysaccharide in HO-1<sup>-/-</sup> mice. *American Journal of Pathology*, 170: 1820-1830 (2007)
125. Trupka A: Konsequenzen der Früherkennung für die frühe Beatmungstherapie. In: Nast-Kolb D, Waydhas C and Schweiberer L (Hrsg) *Posttraumatisches Multiorganversagen*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, S. 11-16 (1996)
126. Trupka A, Nast-Kolb D, Schweiberer L: Das Thoraxtrauma. *Unfallchirurg*, 101: 244-258 (1998)

127. Turrens J F: Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology*, 552: 335-344 (2003)
128. Turut H, Ciralik H, Kilinc M, Ozbag D, Imrek S S: Effects of early administration of dexamethasone, N-acetylcysteine and aprotinin on inflammatory and oxidant-antioxidant status after lung contusion in rats. *Injury*, 40: 521-527 (2009)
129. Vijayan V K: Chronic obstructive pulmonary disease. *Indian Journal of Medical Research*, 137: 251-269 (2013)
130. Vile G F, Basu-Modak S, Waltner C, Tyrrell R M: Heme oxygenase 1 mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 2607-2610 (1994)
131. Wagner K, Groger M, McCook O, Scheuerle A, Asfar P, Stahl B, Huber-Lang M, Ignatius A, Jung B, Duechs M, Moller P, Georgieff M, Calzia E, Radermacher P, Wagner F: Blunt chest trauma in mice after cigarette smoke-exposure: Effects of mechanical ventilation with 100 % O<sub>2</sub>. *Public Library of Science One*, 10: 1-20 (2015)
132. Wagner F: Das stumpfe Thoraxtrauma - Einfluss von Schwefelwasserstoff auf die Lungenfunktion, Entzündungsreaktion und Apoptose der beatmeten Maus. *Med Habilitationsschrift, Universität Ulm* (2013)
133. Wagner F, Scheuerle A, Weber S B S, Stahl B B S, McCook O B S, Knoferl M W, Huber-Lang M, Seitz D H, Thomas J, Asfar P, Szabo C, Moller P, Gebhard F, Georgieff M, Calzia E, Radermacher P, Wagner K: Cardiopulmonary, Histologic, and Inflammatory Effects of Intravenous Na<sub>2</sub>S After Blunt Chest Trauma-Induced Lung Contusion in Mice. *Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care*, 71: 1659-1667 (2011)
134. Wang H C, Shun C T, Hsu S M, Kuo S H, Luh K T, Yang P C: Fas/Fas ligand pathway is involved in the resolution of type II pneumocyte hyperplasia after acute

lung injury: evidence from a rat model. *Critical Care Medicine*, 30: 1528-1534 (2002)

135. Wang X, Ryter S W, Dai C, Tang Z L, Watkins S C, Yin X M, Song R, Choi A M: Necrotic cell death in response to oxidant stress involves the activation of the apoptogenic caspase-8/bid pathway. *The Journal of biological chemistry*, 278: 29184-29191 (2003)

136. WHO - World Health Organization. The top 10 causes of death, fact sheet, Updated January 2017. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/> (10.05.2017)

137. WHO - World Health Organization: Global status report on road safety 2015. 1., World Health Organization, Switzerland, Available: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/189242/1/9789241565066\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/189242/1/9789241565066_eng.pdf?ua=1) (10.05.2017)

138. WHO - World Health Organization. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD), Fact sheet, November 2016. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs315/en/>. (23.04.2017).

139. Willis D, Moore A R, Frederick R, Willoughby D A: Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nature medicine*, 2: 87-90 (1996)

140. Wollin L, Pieper M P: Tiotropium bromide exerts anti-inflammatory activity in a cigarette smoke mouse model of COPD. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*, 23: 345-354 (2010)

141. Wright J L, Farmer S G, Churg A: Synthetic serine elastase inhibitor reduces cigarette smoke-induced emphysema in guinea pigs. *American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine*, 166: 954-960 (2002)

142. Yasuo M, Mizuno S, Kraskauskas D, Bogaard H J, Natarajan R, Cool C D, Zamora M, Voelkel N F: Hypoxia inducible factor-1alpha in human emphysema lung tissue. *The European respiratory journal*, 37: 775-783 (2011)

143. Yu A Y, Frid M G, Shimoda L A, Wiener C M, Stenmark K, Semenza G L: Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung. *American Journal of Physiology*, 275: 818-826 (1998)

## **7 Danksagung**

*Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.*

## **8 Lebenslauf**

*Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.*

*Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.*