

Universität Ulm

Institut für Anästhesiologische Pathophysiologie und
Verfahrensentwicklung

Institutsleitung: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Peter Radermacher

Bedeutung der Cystathionin- γ -Lyase für die Lungenfunktion und Entzündungsreaktion nach stumpfem Thoraxtrauma im Mausmodell

Dissertation

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

Gregor Wangerin

geb. in Stuttgart, Baden-Württemberg

2018

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Peter Radermacher

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Huber-Lang

Tag der Promotion: 11.07.2019

Meinen Eltern gewidmet

Teile dieser Dissertation sind erschienen in

Hartmann, Clair; Hafner, Sebastian; Scheuerle, Angelika; Möller, Peter; Huber-Lang, Markus; Jung, Birgit; Nußbaum, Benedikt; McCook, Oscar; Gröger, Michael; Wagner, Florian; Weber, Sandra; Stahl, Bettina; Calzia, Enrico; Georgieff, Michael; Szabó, Csaba; Wang, Rui; Radermacher, Peter; Wagner, Katja: The Role of Cystathionine- γ -lyase in Blunt Chest Trauma in Cigarette Smoke Exposed Mice. *Shock: Injury, Inflammation, and Sepsis: Laboratory and Clinical Approaches*, 47: 491-499 (2017) doi: 10.1097/SHK.0000000000000746

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Stumpfes Thoraxtrauma	1
1.2 Schwefelwasserstoff (H ₂ S).....	2
1.3 Cystathionin-γ-Lyase und ihr Knockout	5
1.4 Mausmodell.....	6
1.5 <i>mouse intensive care unit</i>	6
1.6 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	7
2 Material und Methoden	8
2.1 Genehmigung der Tierexperimente	8
2.2 Ausstattung und Medikamente für die Tierversuche	8
2.3 Studienaufbau	20
2.4 Versuchsablauf	20
2.5 Messung der physiologischen Daten	24
2.6 Messung der Zytokinkonzentrationen.....	25
2.7 Comet Assay.....	26
2.8 Western Blot.....	29
2.9 Histologische Aufarbeitung	34
2.10 Statistik.....	41
3 Ergebnisse.....	42
3.1 Klinische Daten	42
3.2 Zytokine in Lunge und Plasma.....	44
3.3 Comet Assay.....	45
3.4 Western Blot.....	46
3.5 Immunhistochemie	48
3.6 Histopathologie	49

4	Diskussion	50
4.1	Interpretation klinischer Parameter	52
4.2	Interpretation entzündungsrelevanter Signalstoffe	55
4.3	Interpretation histomorphologischer Befunde	61
4.4	Reaktion alternativer H ₂ S-Produktionswege.....	62
4.5	Grenzen der Studie	63
4.6	Schlussfolgerungen aus der Arbeit	64
5	Zusammenfassung.....	65
6	Literaturverzeichnis	66
7	Danksagung.....	80
8	Lebenslauf	81

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung der Abkürzung, ggf. Begriffserklärung
3-MST	3-Mercaptopyruvate-Schwefeltransferase
A.	Arteria
Akt	Proteinkinase B
Alb	Albumin
ALI	<i>acute lung injury</i> milde Form des ARDS
Ang-1	Angiopoetin-1
AP39	10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl) triphenylphosphoniumbromid H ₂ S-Donor
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i> akutes Atemnotsyndrom
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	Bcl-2-assoziiertes X Protein proapoptotisches Regulationsprotein
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i> antiapoptotisches Regulationsprotein
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma–extra large</i> mitochondriales Transmembranprotein, antiapoptotisch
BGA	Blutgasanalyse
BSA	<i>bovine serum albumin</i> Rinderalbumin
Cas-3	Caspase-3
CBS	Cystathionin-β-Synthase
CCD	<i>charge-coupled device</i> ladungsgkoppeltes Bauteil
CSE	Cystathionin-γ-Lyase

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ERK	extrazelluläre signalegulierten Kinase
et al.	<i>et alii, et aliae</i> und andere (Autoren)
FiO ₂	<i>fraction of inspired oxygen</i> inspiratorische Sauerstoffkonzentration
GY4137	Morpholin-4-ium Methoxyphenylphosphinodithioat H ₂ S-Donor
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1 α
HO-1	Hämoxygenase-1
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
I κ B α	NF- κ B Inhibitor α
KC	Keratinozyt-Chemoattraktor
KG	Körpergewicht
ko	Knockout
LMP	<i>low melting point</i> niedriger Schmelzpunkt
MAP	<i>mean arterial pressure</i> mittlerer arterieller Druck

MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MCP-1	Monozyten-Chemoattraktorprotein-1
MEEO	Medium-Elektroendosmose
MICU	<i>mouse intensive care unit</i> Mäuseintensivstation
mPTP	mitochondriale Permeabilitätstransitions-pore
MZP	Messzeitpunkt
Na ₂ S	Natriumsulfid
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> Transkriptionsfaktor, reguliert u.a. Entzündung und Apoptose
NO	Stickstoffmonoxid
NT	Nitrotyrosin
ONOO ⁻	Peroxinitrit
PaCO ₂	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PaO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> isotonische Pufferlösung zur Verdünnung
PEEP	<i>positive end-expiratory pressure</i> positiver endexpiratorischer Druck
PGC-1α	<i>peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator-1α</i> Koaktivator der Transkription, reguliert Energiemetabolismus
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
RNS	<i>reactive nitrogen species</i> reaktive Stickstoffspezies
ROS	<i>reactive oxygen species</i> reaktive Sauerstoffspezies
s.c.	subkutan

SCGE	<i>single-cell gel electrophoresis</i> Einzelzellgelelektrophorese
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> Natriumlaurylsulfat
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i> systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
TBS	<i>tris buffered saline</i> zur Lösung von Proteinen verwendeter Puffer
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
V.	Vena
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VILI	<i>ventilator-induced lung injury</i> beatmungsinduzierte Lungenschädigung
WT	Wildtyp

1 Einleitung

Traumata sind die Haupttodesursache bei unter-45-jährigen in Deutschland [128]. Das Polytrauma weist als besonders schwere Ausprägung am häufigsten die Verletzungskomponenten Schädelhirntrauma und Thoraxtrauma auf und geht oft mit Hämorrhagien einher [151].

1.1 Stumpfes Thoraxtrauma

Das stumpfe Thoraxtrauma entsteht durch mechanische Krafteinwirkung von außen. Es kommt dabei zu einer Verletzung des Brustkorbs, seiner Organe und angrenzender Strukturen.

Das isolierte stumpfe Thoraxtrauma kann in der Regel wenig invasiv behandelt werden und geht mit einer geringen Letalität einher (0-5% der jungen, 10-20% der älteren Patienten [55,108,129]. Häufiger tritt es jedoch im Rahmen eines Polytraumas auf [105], in dem seine Bedrohlichkeit einen hohen Stellenwert einnimmt. So wiesen polytraumatisierte Patienten mit Thoraxtrauma in einer prospektiven Fallstudie von Waydhas et al. eine deutlich höhere Morbidität und Letalität auf im Vergleich zu Patienten ohne Thoraxtrauma mit gleichem Injury Severity Score und vergleichbaren Begleitverletzungen [150]. Zusammengefasst sind etwa 20-25% der traumaassoziierten Todesfälle auf Thoraxverletzungen zurückzuführen [46,61,118].

Ein Thoraxtrauma kann Mediastinalverletzungen und Lungenkontusionen zur Folge haben. Eine Atelektasenbildung durch Mikrohämmorrhagien oder Gewebeverdichtung durch die lokale Entzündungsantwort führt häufig zu einer akuten Verschlechterung der Lungenfunktion [114].

Wenn die Phase der akuten Lebensbedrohung durch Gewebeschädigung und Blutverlust überwunden ist, drohen nach 48 Stunden Komplikationen wie das akute Atemnotsyndrom (*acute respiratory distress syndrome*, ARDS) oder Infektion und Sepsis, die über Lungen- oder Multiorganversagen zum Tod führen können [95,129]. Neben der physischen Lungenschädigung führt eine traumavermittelte Abnahme des alveolären Sauerstoffpartialdrucks mit resultierender Hypoxämie und Gewebshypoxie zu einer sowohl lokal als auch

systemisch überschießenden Entzündungsreaktion [33]. Diese verursacht ubiquitäre Organschädigungen und geht mit vermehrtem oxidativen Stress, Apoptose und Gefäßpermeabilitätsstörungen einher [52,69]. Ein möglicher Schlüssel zur Erhaltung der Organfunktion in vergleichbaren Situationen liegt in der Wirkung von Schwefelwasserstoff.

1.2 Schwefelwasserstoff (H₂S)

Dieses leicht entzündlich-farblose Gas verströmt einen charakteristischen Geruch, der an faule Eier erinnert. Auch wenn es für seine schleimhautreizende und toxische Wirkung bekannt ist [5], wird es vom Säugetierorganismus selbst produziert und ist hier sowohl unter physiologischen, als auch unter pathophysiologischen Umständen von Bedeutung [74,133].

Die Produktion von H₂S findet im Stoffwechsel von Säugetieren mittels eines von drei Enzymen aus der Aminosäure L-Cystein statt [132]: Cystathionin-γ-Lyase (CSE), die vor allem im kardiovaskulären und respiratorischen System zu finden ist [57,164], Cystathionin-β-Synthase (CBS), die im Nervensystem prädominant ist [68] und 3-Mercaptopyruvate-Schwefeltransferase (3-MST), die neben dem zentralen Nervensystem und Gefäßendothel zwar ubiquitär vorhanden zu sein scheint [92,119,120,135], deren Bedeutung aber noch in keinem Organsystem erwiesen ist [30].

Wirkung

Als physikalisch gelöstes Gas mit niedrigem Molekulargewicht durchdringt H₂S problemlos Zellmembranen und verteilt sich durch Diffusion schnell im Gewebe, wo es ohne Vorhandensein spezifischer Rezeptoren verschiedene Wirkungen entfaltet [132,145].

Nach hämorrhagischem Schock [47,91] und Herzkreislaufstillstand [89] wurden organprotektive Eigenschaften von H₂S bzw. Na₂S beobachtet, was an einem Thoraxtraumamodell reproduziert werden konnte [146]. Der naheliegende Grund hierfür ist eine supprimierte Entzündungsreaktion; über den Einfluss von Schwefelwasserstoff auf diese ist sich die Literatur jedoch uneins. Einerseits wurde eine Hemmung der Exprimierung von Entzündungsmediatoren sowie der Leukozyten-Endothel-Interaktion beobachtet [155], andererseits stehen sich heute Nachweise pro- [3,4,11,77,134,157-161] und antiinflammatorischer Wirkung [32,35-38,41,76,123,155] gegenüber. Ähnlich verhält es sich mit beobachteten pro- [8], sowie antiapoptotischen Effekten [58]. Um das Gas als potentiell organprotektiven Wirkstoff zu untersuchen, werden verschiedene Verfahren angewandt.

Messmethoden und Applikationsformen von H₂S

Die direkte Bestimmung von H₂S-Werten im Blut ist die naheliegende Methode zur Untersuchung seiner Wirkung. Diese Messung erweist sich allerdings mit den heutigen Mitteln als unzuverlässig. In aktuellen Studien finden sich erhebliche Diskrepanzen zwischen den Angaben zu physiologischen Blutwerten beim Menschen, die von 0,1 nM [45] bis hin zu 580 µM [111] reichen. Je nach Methode kommt es zu stark variierenden Ergebnissen, von denen manche mit besonders hohen Werten wegen der Toxizität von Schwefelwasserstoff in Frage gestellt werden müssen [87]. Weiterhin sollte zumindest bei den höheren Konzentrationen dieses Bereichs der charakteristische Geruch des Gases feststellbar sein, von ihm wurde jedoch nie berichtet. Weil somit auch eine verlässliche „on line“ Messmethode zurzeit nicht existiert, beruhen viele der aktuellen Studien zum Thema entweder auf externer Zugabe oder pharmakologischer Einflussnahme auf H₂S selbst oder einen seiner Produktionswege.

Bei der inhalativen Gabe des Gases kann es zu einem lokal parenchymischschädigenden Effekt kommen [41]. Dieser kann z.B. durch intravenöse Gabe von Na_2S , in Kochsalzlösung gelöstem H_2S , verhindert werden. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass in einer wässrigen Lösung das Gleichgewicht des eher lipidlöslichen Gases und seines Anions (SH^-) einer pH-Abhängigkeit unterliegt und bei physiologischem pH und Temperatur nur 40% des Schwefels als H_2S vorliegt [25]. Dies kann Schwankungen in der Wirkung zur Folge haben und somit die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse einschränken. Bei niedrigeren pH-Werten oxidiert das Gas langsamer, wird allerdings gleichzeitig flüchtiger, was seine Handhabung erschwert [60]. Sowohl bei der inhalativen, als auch bei der intravenösen Darreichungsform ist die Substanz nur für eine kurze Zeit wirksam und erreicht zwischenzeitlich unerwünscht hohe Spitzenkonzentrationen.

Schleimhautreizende Effekte und die kurze Wirkdauer der Substanzen [13,14,89] können mit pharmakologischen Inhibitoren der H_2S -Biosynthese wie DL-Propargylglycin oder β -Cyanoalanin umgangen werden, die allerdings eine geringe Selektivität und Zellmembranpermeabilität aufweisen [19,83], was unspezifische Nebenwirkungen zur Folge haben kann [145].

Als weitere Alternative wird an H_2S -Donoren wie GYY4137 (Morpholin-4-ium Methoxyphenylphosphoinodithioat) und AP39 (10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl) triphenylphosphoniumbromid) geforscht. Diese setzen das Gas langsam frei und imitieren somit die endogene Produktion, bedürfen aber noch weiterer Untersuchung [75,126].

Die oben beschriebenen Nebenwirkungen und pharmakodynamischen Aspekte schränken die Validität der Untersuchungsergebnisse bezüglich mechanistischer Fragen ein. Hieraus ergibt sich die Indikation für den Ansatz der genetischen Blockade der H_2S -Biosynthese.

1.3 Cystathionin-γ-Lyase und ihr Knockout

Analog zu CBS im zentralen Nervensystem [1] ist CSE das prädominante H₂S-produzierende Enzym im kardiovaskulären und respiratorischen System [57,164]. Speziell im kardiovaskulären und respiratorischen System von Säugetieren wird es reichlich gebildet [57,164]. Mit Vitamin B₆ als Kofaktor katalysiert es die Umwandlung von Cystein zu Pyruvat und Ammoniak, bei der H₂S entsteht. Alternativ kann für die Produktion von Schwefelwasserstoff auch eine Kombination aus Cystein und Homocystein verwendet werden [125]. Sowohl Stickstoffmonoxid (NO) [164], als auch bakterielle Endotoxine [62] steigern die CSE-Expression. *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) erhöht nachweislich die H₂S-Spiegel. Wahrscheinlich liegt auch hier eine gesteigerte CSE-Expression zugrunde [104].

Die CSE wirkt sich sowohl bei Asthma [27], als auch bei chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) [26] protektiv auf die chronische Entzündung aus. Ein ebenso positiver Einfluss wurde nach Ischämie und Reperfusion der Niere beobachtet [15]. Die Rolle der CSE während einer akuten Stressreaktion der Lunge hingegen war bislang nicht eindeutig. Auf die begleitende Lungenschädigung im Rahmen einer akuten Pankreatitis hatte ihre pharmakologische Blockade einen protektiven Einfluss [134]. In einer Studie von Wagner et al. ging jedoch ein nach Thoraxtrauma protektiver Effekt von Na₂S in Kombination mit Hypothermie mit einer reduzierten CSE-Expression einher, was eine Beteiligung des Enzyms an der Akutreaktion wahrscheinlich macht [146]. In der vorliegenden Untersuchung sollte deshalb die Bedeutung der CSE für die Lungenfunktion nach Thoraxtrauma untersucht werden, ohne Störvariablen wie pharmakologischen Nebenwirkungen zu unterliegen. Hierzu wurde das Enzym anstatt einer medikamentösen Blockade durch eine genetische Veränderung außer Kraft gesetzt.

Der gezielte genetische Knockout beider Allele des CSE-enkodierenden Gens (CSE ko) der Maus wurde erstmals 2008 von Yang et al. publiziert. Hierfür wurden Tieren der Stämme C57BL/6J und 129SvEv verwendet. Die Mutation führt in homozygoten Tieren zu einer um 50% verminderten H₂S-Konzentration im Serum [154].

1.4 Mausmodell

Die Maus ist bisher die einzige Spezies, an der ein genetischer CSE-Knockout vorgenommen wurde [154](s.o.) und kommt daher auch als einzige für diese Studie in Frage. Für die Wahl des Mausmodells sprechen zusätzlich folgende Umstände: Durch die niedrigen Beschaffungs- und Haltungskosten sowie höhere Reproduktionsraten kann eine größere Anzahl von Mäusen untersucht werden als bei Verwendung von größeren Säugetieren, deren Physiologie menschenähnlicher ist. Die geringe Körpergröße der Maus erleichtert die Aufrechterhaltung der Temperaturhomöostase und durch die große genetische Homogenität der Tiere werden mögliche Fehlerquellen eliminiert. Ein weiterer zu beachtender Faktor für die klinische Relevanz dieser Studie ist das Vorhandensein Kohn'scher Poren, die der Maus wie dem Menschen eine Kollateralventilation der Lungenalveolen ermöglichen [70,93], aber zum Beispiel im Schwein nicht vorkommen [18].

1.5 *mouse intensive care unit*

Ein Teil dessen, was wir über Thorax- und andere Traumata wissen, basiert auf Modellen, die keine standardisierten intensivmedizinischen Maßnahmen beinhalten. Die MICU – eine speziell für Mäuse entwickelte Intensivstation – ermöglicht den Ausschluss verschiedener Störvariablen, die bei Untersuchungen am Mausmodell zum Tragen kommen können. Durch eine Behandlung der Versuchstiere in Anlehnung an intensivmedizinische Standards kann ein realitätsnahes Szenario erstellt werden. Teil dieser Behandlung sind eine kontinuierliche Temperatur-, sowie Kreislaufüberwachung mit Flüssigkeitsbilanzierung und Analgosedierung, sowie bedarfsgerechter Katecholamingabe. Eine individuell angepasste, druckkontrollierte, „lungenprotektive“ Beatmung mit Zugvolumina von 4,2 bis 6,6 $\mu\text{l/g KG}$, die in regelmäßigen Abständen blutgasanalytisch kontrolliert wird, ermöglicht eine bessere Vergleichbarkeit der erzielten Ergebnisse. Sie verhindert zudem die Ausbildung einer beatmungsinduzierten Lungenschädigung (*ventilator-induced lung injury*, VILI) und somit zusätzliche Gewebsschädigung. Neben trauma- und lagerungsbedingten Kompressionsatelektasen [121] führt die Narkoseinduktion an sich zu basalen Atelektasen der Lunge [17]. Durch Anlage eines positiven endexpiratorischen Drucks (*positive end-expiratory pressure*, PEEP) und

Durchführung stündlicher Rekrutiermanöver wird diesem Prozess entgegengewirkt. Die genannten Maßnahmen sind Teil jeder intensivmedizinischen Behandlung im Krankenhaus. In Kapitel 2.4 ist der Versuchsablauf im Detail beschrieben.

1.6 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Thoraxtraumata können akut oder entzündungsvermittelt subakut lebensbedrohlich sein. Ein Einfluss der CSE auf die entzündliche Stressantwort liegt nahe, ist jedoch weder verstanden noch hinreichend belegt.

In dieser tierexperimentellen Versuchsanordnung soll an CSE ko-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen folgende Fragestellung untersucht werden:

1. Verschlechtert die genetische Deletion der CSE die Lungenfunktion nach stumpfem Thoraxtrauma?
2. Verstärkt die genetische Deletion der CSE die systemische Entzündungsreaktion nach stumpfem Thoraxtrauma?

2 Material und Methoden

2.1 Genehmigung der Tierexperimente

Die notwendigen Anträge für das Versuchsvorhaben und für das Studienprotokoll wurden von den Tierschutzbeauftragten der Universität Ulm sowie der Tierversuchskommission des Regierungspräsidiums in Tübingen, Baden-Württemberg, genehmigt (Reg.-Nr. 1130). Die Handhabung der Mäuse und die Durchführung der Experimente wurden nach den Richtlinien des Tierschutzgesetzes vom 25. Mai 1998 vorgenommen. Die Tiere wurden artgerecht gehalten, gepflegt, für die Operationen vorbereitet und medikamentös behandelt.

2.2 Ausstattung und Medikamente für die Tierversuche

Versuchstiere

Es wurden insgesamt 18 Mäuse beider Geschlechter verwendet; acht hiervon waren 2008 von Yang et al. beschriebene CSE ko-Mäuse aus eigener Zuchtlinie [154]. Die Tiere sind genmoduliert und wurden im Oktober 2013 zur Untersuchung der vorliegenden Fragestellung hinzugezogen. Das Zuchtpaar wurde von Prof. Rui Wang, Department of Biology, Lakehead University, Thunder Bay, Kanada, im Rahmen einer wissenschaftlichen Kooperation zur Verfügung gestellt. Die übrigen Tiere waren C57Bl6/J Wildtyp-Mäuse von Charles River (Sulzbach, Deutschland). Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren die Tiere 10-25 Wochen alt und zwischen 23g und 29g schwer.

Materialien

In den Versuchen wurden überwiegend speziell für Mäuseversuche entwickelte Instrumente von der Firma World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA verwendet. Alle weiteren Geräte und Utensilien des Versuchsablaufs sind in Tabelle 1 aufgeführt. In Tabelle 2 sind alle hierzu verwendeten Medikamente und Gase einschließlich der Bezugsfirmen aufgelistet. Eine Aufzählung der notwendigen Geräte, Utensilien und Chemikalien für die jeweiligen Analyseverfahren erfolgt in den Tabellen 3 bis 10. Die angewandten Computerprogramme werden in Tabelle 11 angegeben.

Tabelle 1: Geräte und Utensilien des Versuchsablaufs, einschließlich der Bezugsquellen.

Gerät oder Operationsutensil	Bezugsquelle
ABL 800 Series blood gas analyzer	Radiometer GmbH, Willich, Deutschland
Analog-zu-Digital-Konverter (Power Laboratory 4/SP)	ADInstruments, Castle Hill, Australien
Arterieller Katheter	FMI, Seeheim/Ober-Beerbach, Deutschland
Blasenkatheter/Intravaskulärer Katheter (24GA 0.75IN)	Becton Dickinson Infusion Therapy Systems Inc., Sandy, UT, USA
Disposable pressure transducer TBD-1222	FMI Seeheim/Ober-Beerbach, Deutschland
Kanüle	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Kleintier-Respirator Flexivent®	Scireq, MO, Canada
Leukopor® Klebeband	BSN medical GmbH, Hamburg, Deutschland
Luer-Lock Spritze	BD Plastik, Heidelberg, Deutschland
MIO-501 DC-Brückenmessverstärker	FMI, Seeheim/Ober-Beerbach, Deutschland
Naht (5.0 Prolene, 6.0 Ethilon, 8.0 Ethilon,)	Johnson & Johnson, Neuss, Deutschland
Polyestermembran	Du Pont de Nemur, Bad Homburg, Deutschland
Spritze	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Spritzpumpe (Syringe Pump 11 Plus)	Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA
TKM-0903 temperature control	FMI Seeheim/Ober-Beerbach, Deutschland
Tracheotomieset (Selbsterstellung) aus Kanüle 18 GA und Schlauch (Silicone tubing)	B. Braun, Melsungen, Deutschland VWR International, Darmstadt, Deutschland
Venenkatheter (Selbsterstellung) aus Kanüle 30 GA 1/2 und Schlauch	BD Microlance, Heidelberg, Deutschland Bohlender, Grünsfeld, Deutschland
Waage	Kern & Sohn, Balingen, Deutschland

Tabelle 2: Medikamente und Gase des Versuchsablaufs, einschließlich der Bezugsquellen.

Medikament	Bezugsquelle
Buprenorphin (Temgesic®)	Reckitt Benckiser, Slough, UK
Fentanyl (Fentanyl-hameln®)	Hameln Pharma Plus GmbH, Hameln, Deutschland
Jonosteril 1/1 E	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Ketamin (Ketanest-S®)	Pfizer, New York City, NY, USA
Midazolam (Midazolam-ratiopharm®)	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Noradrenalin (Arterenol®)	Sanofi-Aventis, Frankfurt am Main, Deutschland
Sauerstoff	Westfalen, Münster, Deutschland
Sevofluran	Abbott, Wiesbaden, Deutschland
Stickstoff	Westfalen, Münster, Deutschland
Tetraspan 6% Infusionslösung	B. Braun, Melsungen, Deutschland

Tabelle 3: Geräte für den Comet Assay und zur histologischen und immunhistochemischen Aufarbeitung und Auswertung, einschließlich der Bezugsquellen.

Laborgerät	Bezugsquelle
AS2-Färbeautomat	Wendt Maschinenbau GmbH und Co, Georgsmarienhütte, Deutschland
Axio Imager Mikroskop (Objektiv 5-40x und Okular 10x)	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Bosch Mikrowellenherd 842C	Robert Bosch GmbH, Gerlingen, Deutschland
Dispensiereinheit MPS/P	SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland
Einbettkassete Rotilabo	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Gefrierschrank -80°C	Herafreeze, M.u.T. GmbH Berlin, Berlin
Kühlplatte MPS/C-SLEE	SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland
Kühlschrank Glass Line	Liebherr, Bulle, Schweiz
Microtom Leica RM2255	Leica, Wetzlar, Deutschland
Pipetierhilfe Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt, Deutschland
Sprout Minizentrifuge	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Tissue-TEK® TEC	Sakura Finetek, CA, USA
Vortex mixer	Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim, Deutschland
Vortex-Genie 1	Scientific Industries, Inc., NY, USA
Vorwärmeinheit MPS/W-SLEE	SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland
Wasserbad Leica HI1210	Leica, Wetzlar, Deutschland

Tabelle 4: Materialien für den Comet Assay und zur histologischen und immunhistochemischen Aufarbeitung und Auswertung, einschließlich der Bezugsquellen.

Material	Bezugsquelle
Eppendorf Tubes 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Menzel-Gläser Superfrost® Plus	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Pap Pen- Liquid blocker	Science Services GmbH, München, Deutschland
Pipetten: 100- 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen: 0,5- 10 µl, 10- 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Schmalbandklingen Leica DB80LS	Leica, Wetzlar, Deutschland

Tabelle 5: Geräte für den Western Blot und Zytokinmessungen, einschließlich der Bezugsquellen.

Laborgerät	Bezugsquelle
Autoklav	Systec 2540 EL, Linden, Deutschland
Centrifuge 5424 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Dispergiergerät Ultra-Turrax t25	IKA, Staufen, Deutschland
Eismaschine B-190	Scotsman, IL, USA
Elektrophoreseset Mini-Protean Tetra Cell System	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Entwicklermaschine CP 1000	AGFA Healthcare AG, Bonn, Deutschland
Hypercassette	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Kolbenhubpipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland Gilson, Middleton, USA
Magnetrührer Combimag RCO	IKA, Staufen, Deutschland
pH-Meter Mettler MP 220	Mettler, Columbus, USA
Pipettierhilfe Pipetboy Acu	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
PTC-200 Peltier Thermal Cycler	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Shaker S4, Shaker DRS-12	Elmi, Calabasas, CA, USA
Spannungsgeber Power Pac 200	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Spannungsgeber Power Pac 3000	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Spektralphotometer Gene Quant Pro	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Trans-Blot SP Semi Dry Transfer Cell	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Vortex Type 16700 Mixer Maxi Mix 1	Thermo Scientific, Waltham, USA
Waage BP 310 S	Sartorius, Göttingen, Deutschland

Tabelle 6: Materialien für den Western Blot und Zytokinmessungen, einschließlich der Bezugsquellen.

Material	Hersteller
Bechergläser	Schott Glas, Wertheim (Main), Deutschland
Colormarker Kaleidoscope Standards Precision Plus Protein	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Einmalpipetten (steril)	Costar, New York, USA
Entwicklerkit: Lumi GLO Reagent A Peroxide Reagent B	Cell Signaling, Danvers, USA
Entwicklerkit: Western Bright Quantum Chemiluminescent Detection Reagent Western Bright Peroxide Chemiluminescent Detection Reagent	Advansta, Menlo Park, California, USA
Eppendorf-Cups	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Erlenmeyerkolben	Schott Glas, Wertheim (Main), Deutschland
Falcon Tubes 15mL, 50mL	BD Biosciences, Bedford, USA
High performance chemiluminescence film	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Küvetten PMMA 1,5 mL halbmikro	Brand, Wertheim (Main), Deutschland
Medical X-Ray film CX-BL+	AGFA Healthcare AG, Bonn, Deutschland
Multiplex Zytokin Kit	Bio-Plex Pro Cytokine Assay, Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Precision Plus Proteinstandard, Kaleidoscope	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Nitrocellulose Blotting Membran	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Protein Assay	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Whatman Chromatography Paper	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK

Tabelle 7: Chemikalien für Comet Assay, Immunhistochemie und Western Blots, einschließlich der Bezugsquellen.

Chemikalie	Bezugsquelle
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
32% HCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Aqua dest.	Uniklinik Ulm
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
BSA, Fraction V, pH 7,0	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Citratpuffer (pH 6)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
EDTA	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 99,9%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Glycin	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Mayer's acid hemalaun	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Neo- Mount®	Merck, Darmstadt, Deutschland
Normal Donkey Serum: 017-000-121	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Normal Goat Serum: 017-000-121	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
PBS Dulbecco	Biochrom, Berlin, Deutschland
Ponceau	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Pufferlösungen pH 4 und pH 7	Fluka, jetzt Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
SDS-Pellets	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TBS (Tris Buffered Saline)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
TEMED	Fluka, jetzt Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Tween ® 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Xylol	VWR Prolabo, Fontenay-sous-Bois, Frankreich

Tabelle 8: Standardlösungen und Puffer mit jeweiliger Zusammensetzung.

Standardlösung oder Puffer	Zusammensetzung
Alkali- Elektrophoresepuffer	NaOH: 300 mM Na ₂ EDTA: 1 mM
Lyse-Stammlösung	NaCl: 2,5 M Na ₂ EDTA: 100 mM Tris-Base: 10 mM In dest. Wasser lösen, mit NaOH Pellets auf pH 8 einstellen, bei 4° lagern
Neutralisationspuffer	Tris- Base 48,5 mg/ml
Sample Buffer	Tris-HCl: 62,5 mM 20g SDS 2% 100g Glycerol 10% DTT 50 mM 0,1g Bromphenolblau 0,01% Auf 1L auffüllen
2x Lysepuffer	20mL Tris HCL pH 7,5 100mM 5,844g NaCl 500mM 2,4mL 500mM EDTA pH 8,0 6 mM 2mL 600 mM EGTA pH 8,9 6mM 4mL Triton X-100 2% 2mL NP40 1% 40mL Glycerol 20% Auffüllen auf 200 mL Vor Nutzung Zugabe von: 100 µL/50 mL DTT 2mM 50 µL/50 mL β-Glycerol 1mM 50 µL/50 mL Natriumvanadat 1mM 100 µL/50 mL PNPP 2mM 50 µL/50 mL Leupeptom 1mM

10x EMSA	Tris HCl pH 7,9 100mM 5,844g NaCl 500mM EDTA 10mM DTT 10mM Glycerol 10% BSA 100 µg
4x lower buffer	90,85g Tris 2,00g SDS In 350mL H ₂ O lösen und auf pH 8,8 einstellen, anschließend auffüllen
4x upper buffer	30,28g Tris 2,00g SDS In 350mL H ₂ O lösen und auf pH 6,8 einstellen, anschließend auffüllen
10x TBS	24,2g Tris 80g NaCl Auf pH 7,6 einstellen und auf 1L auffüllen
10x PBS	95,5g PBS Auf 1L auffüllen
10x Laufpuffer	284,8g Glycin 60,56g Tris 20g SDS Auf 2L auffüllen
Bloating Buffer	3g Tris 14g Glycin 200mL Methanol Auf 1L auffüllen
Blotto B	1x TBS 1% Milch 1% BSA 0,1% Tween-20

Tabelle 9: Antikörper zur immunhistochemischen Färbung, einschließlich der Bezugsquellen.

Antikörper	Bezugsquelle
Albumin 1°AK: sc-46289	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA
VEGF 1°AK: ab46154	Abcam, Cambridge, UK
Ang-1 1°AK: AF923	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
NT 1°AK: ab 5411	Merck Millipore Corporation, D, CA, USA
Cas-3 1°AK: #9664	Cellsignaling Technology, MA, USA
CBS 1°AK: sc-67154	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA
Donkey anti goat 2° AK: 705-055-147	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Goat anti rabbit 2° AK: 111-035-144	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland

Tabelle 10: Antikörper für die Western Blots, einschließlich der Bezugsquellen.

Antikörper	Bezugsquelle
Bcl-xL 1°AK: #2764	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Bcl-xL 1°AK: #7074	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
HIF-1 α 1°AK: PA1-16627	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
HIF-1 α 2°AK: #7074	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
HO-1 1°AK: ab52947	Abcam, Cambridge, UK
HO-1 2°AK: #7074	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
iNOS 1°AK: SP5118P	Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland
iNOS 2°AK: #7074	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
I κ B- α 1°AK: sc-371	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
I κ B- α 2°AK: #7074	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

Tabelle 11: Computersoftware , die bei den Versuchen, zur Auswertung, Darstellung oder Erstellung der Dissertation verwendet wurde, einschließlich der Bezugsquelle.

Software	Bezugsquelle
Axiovision Imaging SE 64 Rel 4.8.3	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
BioPlex Manager 4.1	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Comet Assay IV	Perceptive Instruments, Haverhill, UK
flexiWARE	SCIREQ Inc., Montreal, Kanada
Image J	Open Source Software (www.imagej.net)
Microsoft® Word 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Prism 6	GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA

2.3 Studienaufbau

Für die vorliegende Studie wurden insgesamt 18 Mäuse verwendet. Zwei Studiengruppen á acht Mäusen wurden miteinander verglichen, wobei die eine aus C57BL/6J Mäusen (Wildtyp-Gruppe), die andere aus CSE ko-Mäusen bestand. Die Eigenschaften Geschlecht, Alter und Körpergewicht waren in den Gruppen gleichverteilt. Sie enthielten je vier weibliche und männliche Tiere. Als Nativkontrollen für die Auswertung der Western Blots wurden zwei weitere C57BL/6J Mäuse verwendet, die weder einem Thoraxtrauma, noch Anästhesie oder Instrumentierung unterzogen wurden.

2.4 Versuchsablauf

Die Simulation des Thoraxtraumas wurde realitätsnah unter Spontanatmung vorgenommen. Mit dem Zeitpunkt der Instrumentierung wurde – in Anlehnung an eine Notarztversorgung mit anschließender intensivmedizinischer Betreuung – die intraperitoneale Narkose eingeleitet und das Versuchstier „lungenprotektiv“ beatmet. Die Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Sandra Weber und Dr. Michael Gröger des Institutes für Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung, Ulm durchgeführt. Abbildung 1 stellt den Versuchsablauf übersichtlich dar.

Das operative Vorgehen und die Instrumentierung der Mäuse wurden bereits in ähnlichen Experimenten im Rahmen anderer Studien im Institut durchgeführt.

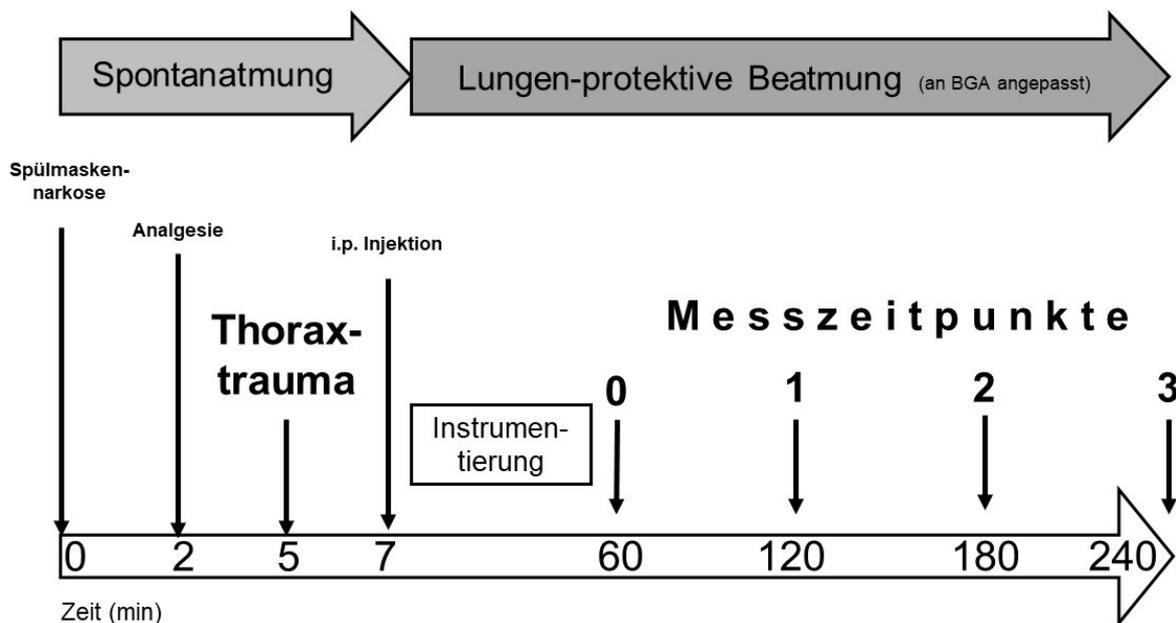


Abb. 1: Schematischer Versuchsablauf. Übersicht über die zeitliche Abfolge der an der jeweiligen Maus durchgeführten Schritte (i.p.=intraperitoneal). Oben im Bild: Art der Atmung im Zeitverlauf (BGA=Blutgasanalyse).

Tabellarischer Versuchsablauf

- Gewichtsbestimmung der Maus
- Spülmaskennarkose mit 2,5 Vol% Sevofluran und 97,5 Vol% Sauerstoff
- Analgesie mit 1,5 µg/g KG Buprenorphin s.c.
- Fixierung der Maus in Rückenlage mittels Klebeband an allen vier Extremitäten auf dem Operationstisch
- Rasur von Bauch und Thorax
- Setzen des Thoraxtraumas durch Luftdruckwelle (1-2ms, 13bar) auf das mittlere Sternum des spontan atmenden Tieres. Die Druckwelle entsteht durch das Zerreißen einer Polyester membran, die am Ende eines Metallzylinders gespannt ist und einem definiertem Luftdruck ausgesetzt wird. Der Abstand des Zylinders zum Sternum beträgt 1,9 cm.
- Aufrechterhaltung der Anästhesie durch intraperitoneale Injektion von 120 µg/g KG Ketamin, 0,25 mg/g KG Fentanyl und 1,25µg/g KG Midazolam (Gesamtvolumen ca.10 µl/g) und Beenden der Inhalationsnarkose.

- Instrumentierung:
Tracheotomie, Intubation und maschinelle, „lungenprotektive“, druckkontrollierte Beatmung mit Kleintierrespirator Felxivent® mit folgenden Einstellungen:
FiO₂ 0,21, *positive endexpiratory pressure* (PEEP) anfangs 3 cmH₂O, dann adaptiert an Horovitz-Index (PEEP = 5 bei PaO₂/FiO₂ < 300; PEEP = 8 bei PaO₂/FiO₂ < 200), V_T 4-6 µl/g KG, I:E 1:2, AF 150/min oder entsprechend Blutgasanalyse (BGA) bzw. Kapnometrie, um einen PaCO₂ von 35-45 mmHg aufrechtzuerhalten
- Rektale Messung der Körperkerntemperatur und Aufrechterhaltung von 37-38°C durch feedback-regulierte Wärmematte und -lampe
- Kanülierung der V. jugularis dextra
- Kanülierung der A. carotis dextra und Einführen eines Katheters zur kontinuierlichen Messung der Herzfrequenz und des arteriellen Blutdrucks
- Hautinzision und Anlage einer Venenverweilkanüle als Blasenkatheter
- Fortführung der Anästhesie intravenös mit 30µg/h·g KG Ketamin und 0,3µg/h·g KG Fentanyl
- Infusion von 100µl/h·g KG einer balancierten kolloidalen Volumenersatzlösung (Tetraspan®)
- Bei mittleren Blutdrücken (engl. mean arterial pressure, MAP) <50mmHg ggf. Gabe von Noradrenalin
- Stündliche Messzeitpunkte (MZP): Entnahme von 85µl Blut aus A. carotis für BGA und Kontrolle von pH, Blutzucker, Laktat, PaCO₂, PaO₂
 - Aufzeichnung von Lungencompliance
 - Rekrutiermanöver (18 cmH₂O über 5s), um die Oberfläche für den Gasaustausch aufrechtzuerhalten
- Tötung der Maus durch Blutentnahme aus A. carotis und Beendigung der maschinellen Beatmung
- Eröffnung des Thorax und Entnahme der Lunge zur weiteren Untersuchung.

Aufgrund der geringen Organgröße wurde das komplette Lungengewebe verwertet. Der linke Lungenflügel wurde der histologischen Aufarbeitung zugeführt, der rechte zur Zytokinmessung und für den Western Blot verwendet.

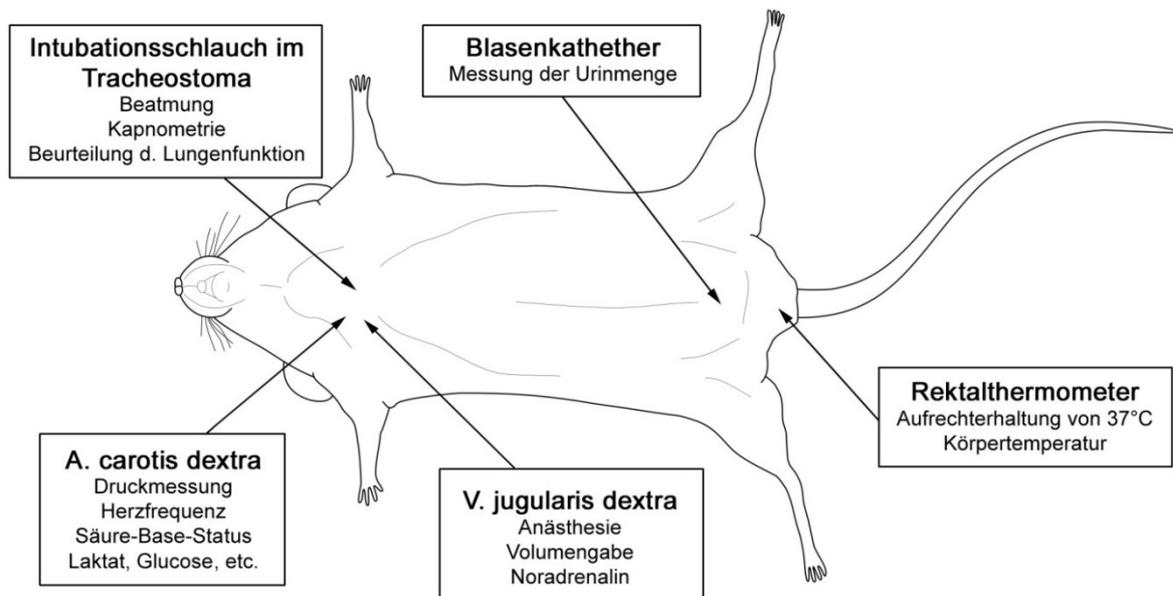


Abb. 2: Instrumentierung der Maus während des Versuchs. Anlage des Intubationsschlauchs durch Tracheostoma zur Beatmung, Kapnometrie und Erhebung lungendynamischer Parameter; Katheterisierung der Arteria carotis dextra zur kontinuierlichen Blutdruck- und Herzfrequenzmessung sowie Beurteilung metabolischer Parameter; Katheterisierung der Vena jugularis dextra für Anästhesie, Volumen- und Noradrenalingabe; Anlage eines suprapubischen Blasenkatheters zur Bestimmung der Urinmenge 5. Rektalthermometer zur Kontrolle der Körpertemperatur. Quelle Originalbild [49]: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vector_diagram_of_mouse_lying_on_its_back.svg?uselang=de, veröffentlicht unter der Lizenz CC0 1.0 Universell (CC0 1.0), <https://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/deed.de>

2.5 Messung der physiologischen Daten

Nach Instrumentierung des Versuchstieres konnten die physiologischen Daten kontinuierlich bzw. stündlich nach dem im Versuchsablauf beschriebenen Schema erhoben werden.

Blutdruck und Herzfrequenz wurden kontinuierlich über einen intraarteriellen Katheter gemessen, der per Perfusor mit Jonosteril Infusionslösung gespült wurde. Ein Druckabnehmer leitet die gemessenen Daten über einen Brückenmessverstärker an einen Analog-zu-Digital-Konverter, der die Drücke für den angeschlossenen Rechner über die zugehörige LabChart-Software verwertbar macht.

Der Kleintier-Respirator Flexivent™ erhebt in-, sowie expiratorische Beatmungsdrücke und zeigt diese über die zugehörige flexiWARE-Software an. Über dieses System wurden die oben beschriebenen Rekrutiermanöver mit Compliance-Messung durchgeführt.

Die übrigen Daten wurden stündlich mit dem Blutgasanalysegerät ABL 800 Series erhoben.

2.6 Messung der Zytokinkonzentrationen

Die Plasma- und Gewebskonzentrationen unten genannter Zytokine wurden in Zusammenarbeit mit Bettina Stahl und Rosemarie Mayer des Institutes für Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung, Ulm durch Anwendung eines mausspezifischen Multiplex Zytokin Kit nach Anweisung des Herstellers bestimmt. Es folgt eine Übersicht über den Ablauf:

Die Plasma- und Gewebeproben wurden auf eine Filterplatte aufgetragen und mit chemisch an fluoreszierende Mikrokugeln gebundenen Antikörpern inkubiert. Im Anschluss wurden jedem Probenbehälter vorgemischte Detektionsantikörper und Streptavidin-Phycoerythrin beigegeben. Danach wurden die Kugeln entnommen und die Menge an benötigter Zytokinreaktionsmischung mit dem Bio-Plex protein array reader bestimmt. Die Daten wurden mit der Bio-Plex Manager Software 4.1 automatisch verarbeitet und analysiert. Dabei wurde die Zytokin Standardkurve verwendet, die mittels rekombinanter Zytokinstandards erstellt worden war. Um eine statistische Auswertung zu ermöglichen, wurden nicht nachweisbare Konzentrationen als null gewertet.

Folgende Zytokine wurden mit dieser Methode gemessen:

Proinflammatorische Zytokine

Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-18 (IL-18)

Antiinflammatorische Zytokine

IL-6, Interleukin-10 (IL-10)

Chemokine

Keratinozyt-Chemoattraktor (KC), Monozyten-Chemoattraktorprotein-1 (MCP-1)

2.7 Comet Assay

Mit dem Comet Assay oder single-cell gel electrophoresis (SCGE) wird anhand des Ausmaßes des Tailmoments der im Vollblut enthaltenen, kernhaltigen Zellen die Summe an Einzel- und Doppelstrangbrüchen der Desoxyribonukleinsäure (DNS) gemessen. Die Methode wurde ursprünglich 1984 von Östling und Johanson entwickelt [98] und durch Singh im Jahre 1988 zur Erkennung von Einzelstrangbrüchen mittels basischer Puffer erweitert [124]. Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Michael Gröger des Institutes für Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung, Ulm durchgeführt. Abbildung 3 stellt den Arbeitsvorgang übersichtlich dar.

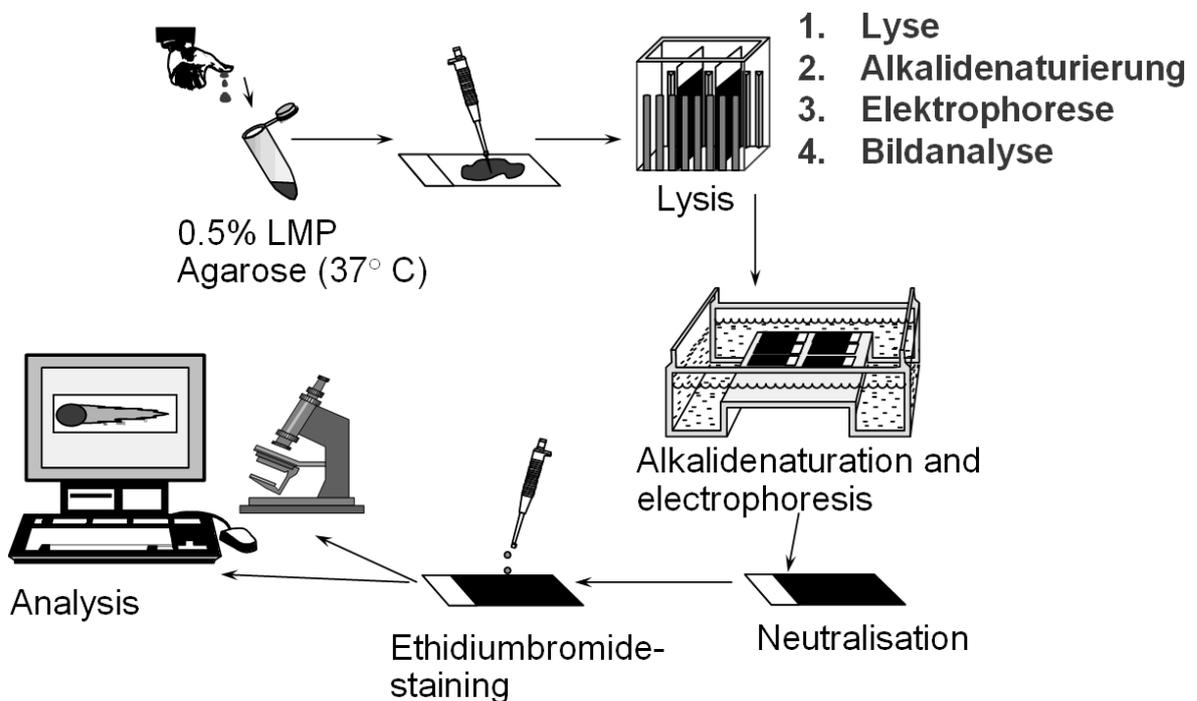


Abb. 3 Schematische Darstellung des Comet Assay. 1. Lyse: Die Vollblutprobe wird der vorbereiteten LMP (low melting point)-Agarose beigefügt und das Gemisch auf Objektträger aufgetragen. Diese werden nun in mit Lysestammlösung gefüllten Lysebehältern gelagert. 2. Alkalidenaturierung: Die Proben werden in eine mit alkalischem Elektrophoresepuffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt, um Einzelstrangbrüche der DNS zu kompletten Brüchen zu denaturieren. 3. Elektrophorese: An die Kammer wird elektrische Spannung angeschlossen, um DNS-Fragmente als Tailmoment sichtbar zu machen. 4. Bildanalyse: Die Tailmomente werden mit Ethidiumbromidlösung angefärbt und mithilfe eines Fluoreszenz-Auflichtmikroskops sowie des Bildanalyseprogramms Comet Assay IV ausgewertet. Quelle [127]: Speit & Hartmann, *Methods Mol Biol.* 2005;291:85-95

Herstellung beschichteter Objektträger

Um die notwendige Haftung der Blutproben auf den Objektträgern zu gewährleisten, wurden diese vorab mit Agarose beschichtet. Hierzu wurde 1,5% MEEO-Agarose (Medium-Elektroendosmose) verwendet, deren Schmelzpunkt höher ist als der für die Proben verwendeten LMP (*low melting point*)-Agarose. Die Herstellung funktionierte wie folgt: 1,5 g MEEO-Agarose wurden mit 100 ml PBS-Puffer in einem Erlenmeyerkolben zweimal sprudelnd aufgekocht, um die Agarose zu lösen. Anschließend wurde die Lösung bei 60°C warm gehalten. Nach Reinigung der Objektträger wurden diese in die Agaroselösung getaucht und so bis zum Mattrand beschichtet. Die Rückseite wurde nun mit einem Papiertuch wieder gesäubert und der Objektträger in waagerechter Position luftgetrocknet.

Vorbereitung der LMP-Agarose und der Lyselösung

Zur Aufbereitung der heparinisierten Vollblutproben wird LMP-Agarose benötigt. Jeweils 100mg LMP-Agarose wurden in 20 ml PBS aufgekocht, gelöst und in Aliquoten von 125µg bei 4°C gelagert.

Die Lysepufferlösung wurde aus 1 ml Triton X-100, 10 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) und 89ml Lysestammlösung gemischt und im Kühlschrank bei 4°C temperiert. Das beigefügte DMSO vermindert eine eventuelle gewebeschädigende Kristallbildung während der Kühlung.

Zuerst wurden die mit LMP-Agarose gefüllten Eppendorfgefäße im heißen Wasserbad erhitzt, bis diese flüssig war und anschließend auf 37°C zurückgekühlt.

Durchführung des Comet Assay

Zu MZP 3 wurde aus der A. carotis eine Vollblutprobe von 10 µl entnommen und in Lithium-Heparin-Monovetten gefüllt. Diese wurde mit 125 µl temperierter, flüssiger LMP-Agarose vermischt und auf einen Objektträger gegeben, der vorher mit MEEO-Agarose beschichtet worden war. Mit einem Deckglas versehen wurde er nun 5 Minuten lang bei 4°C im Kühlschrank ausgehärtet. Die Deckgläser wurden seitlich abgezogen und die Proben in vorbereitete Lysebehälter gegeben. Zur Auflösung der Zellmembranen ruhten diese für eine Stunde bis maximal 48 Stunden.

Anschließend wurde eine Alkalidenaturierung durchgeführt. Dabei wurde der Objektträger längs zur Stromspannung in eine vor Lichteinfall geschützte Phoresekammer gelegt, die in einer mit Eiswasser gefüllten Wanne stand und mit einem 4°C kalten, alkalischen Phoresepuffer mit pH-Wert >13 gefüllt war. Dieser Schritt überführt in 40 Minuten Einzelstrangbrüche in der DNS in quantifizierbare Doppelstrangbrüche.

Es folgte eine 40-minütige Gelelektrophorese im selben Puffermedium bei 25 Volt und 300mA. Der Großteil der DNS verbleibt hierbei am Ort der Zellkerne, da die Agarose die Blutbestandteile fixiert. Die fragmentierte DNS wandert allerdings entlang eines elektrischen Feldes in Längsrichtung des Objektträgers durch die lysierte Kerndoppelmembran. So entstand seitlich der Kerne der namensgebende „Kometenschweif“ (Tailmoment).

Der Objektträger wurde nun dreimal für fünf Minuten mit Neutralisationspuffer beschichtet, mit destilliertem Wasser abgespült und zehn Minuten lang in 99,9% Ethanol getrocknet.

Zur Anfärbung der DNS wurden 50 µl Ethidiumbromidlösung (1%, 1:2500fach verdünnt) verwendet und der Objektträger erneut mit einem Deckglas abgedeckt.

Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenz-Auflichtmikroskop, an das eine CCD-Kamera (*charge-coupled device*) angeschlossen war. Mit Hilfe des Bildanalyseprogramms (Comet Assay IV) wurden die Tailmomente standardisiert und verblindet ausgewertet. Hierzu wurden die Proben bei 400facher Vergrößerung betrachtet. An 50 Zellkernen pro Präparat wurde die Länge des Schweifs relativ zur Kerngröße bewertet und die Leuchtintensität quantifiziert.

Aus Sicherheitsgründen wurden jeweils zwei identische Präparate angefertigt und ausgewertet.

2.8 Western Blot

Beim Western Blot werden Proteine auf eine Trägermembran übertragen und elektrophoretisch getrennt. Anschließend können sie durch markierte Antikörper sicht- und messbar gemacht werden. Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Bettina Stahl und Rosemarie Mayer des Institutes für Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung, Ulm durchgeführt. Basis für die quantitative und qualitative Bewertung von HO-1, HIF-1 α , iNOS, Bcl-xL, und I κ B α ist das folgende Protokoll.

2.8.1 Herstellung des Zellhomogenats

Unmittelbar nach Organentnahme wurde die Lungengewebsprobe zur Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde sie zur Proteinisolation angetaut und in kaltem PBS unter Zusatz von Proteaseinhibitoren mit einem Dispergiergerät homogenisiert. Das Homogenat wurde in der gleichen Menge Lysepuffer (2x) für 30 min auf Eis inkubiert. Die Probe wurde für 30 min bei 4°C zentrifugiert, anschließend der Überstand abgenommen und zweimal für 10s mithilfe eines Sonicators beschallt. Das verbleibende Pellet aus Zellresten wurde verworfen.

Um eine Vergleichbarkeit der Proben sicherzustellen, wurde die enthaltene Menge Protein mithilfe des Bio-Rad Protein Assay bei 595 nm photometrisch bestimmt. Um die Konzentration der Probe anschließend auf die gewünschte Konzentration einzustellen, wurde sie mit einfach konzentriertem EMSA Puffer verdünnt.

Zur weiteren Reduktion wurde sie in einer 1:2 Verdünnung mit zweifach konzentriertem Sample Buffer versetzt. Diese Mischung wurde für 10 min bei 95°C gekocht und anschließend bei -20°C aufbewahrt.

2.8.2 Durchführung des Western Blots

Als Trägermatrix wurde eine SDS-Page (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis*) mit Sammel- und Trenngel verwendet [72]. Nach Gießen und Aushärten von Taschen für die Proben wurden sie dreimal mit Laufpuffer (pH 8,8) gewaschen. Mithilfe einer Hamiltonspritze wurde das Gel vor und nach der Beladung durch die Probe mit 10 µl Sample Buffer versetzt. Zur Unterscheidung der Molekulargewichte wurde ein Kaleidoscope Proteinstandard verwendet; eine Positivkontrolle wurde mit durchgeführt. In die übrigen Taschen wurden die Proteinproben gefüllt. Dann wurde das Gel in die Elektrophoresekammer gegeben und diese mit Laufpuffer aufgefüllt. Es wurde Strom mit 90 V für die ersten 15 min und 180 V für weitere 35 min angelegt.

Mit dem sogenannten Blottingprozess sollen die aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen werden, um sie anschließend per Antikörper nachweisen zu können. Es wurde zunächst eine Nitrozellulosemembran in Blotting Puffer gelegt. Das Gel wurde darauf platziert und beides zwischen in Blotting Puffer getränkte Filterpapiere in eine Transferzelle gelegt. Der gesamte Stapel wurde durch Walzen von Luftblasen befreit und im Anschluss für eine Stunde vertikal eine Spannung von 20 V angelegt.

Nach dem Blottingprozess wurde die Nitrozellulose mitsamt übertragenem Protein zunächst in TBS-Puffer (*tris buffered saline*) gewaschen. Der Proteintransfer und die gleichmäßige Proteinbeladung wurden durch eine reversible Färbung mit Ponceau S für 2 min sichtbar gemacht und kontrolliert. Nach Abwaschen der Färbung mit TBS-Puffer wurden die übrigen Bindungsstellen mit einem Milchpuffer blockiert, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden. Nach einer Stunde Inkubation wurde die Membran abermals mit TBS-Puffer gewaschen, um anschließend den primären Antikörper aufzutragen. Folgende Antikörper wurden verwendet:

Hämoxygenase-1

Die Hämoxygenase-1 (HO-1) ist die induzierbare Form eines Enzyms, das als Katalysator im Hämabbau fungiert. Sie wird u.a. im Rahmen von Entzündungsreaktionen und hypoxischen Zuständen vermehrt sezerniert, ist jedoch in erster Linie als Indikator für oxidativen Stress zu werten [81]. Sie nimmt indirekten Einfluss auf den Gefäßtonus durch Eingriff in die Produktion von Kohlenmonoxid und in die Funktion der induzierbaren NO-Synthase (iNOS). Letztere ist für ihren entzündungshemmenden Effekt verantwortlich [100].

1. AK: Monoclonal HO-1 rabbit IgG Verdünnung: 1:2000

2. AK: HRP-linked antibody, goat anti-rabbit IgG Verdünnung: 1:2000

Proteinmenge pro Geltasche: 20 µg/10 µL

Hypoxie-induzierter Faktor 1α

Dieser Transkriptionsfaktor (HIF-1 α) wird von den meisten, wenn nicht allen sauerstoffatmenden Spezies produziert und spielt nicht nur eine Rolle in Entwicklung und Metabolismus, sondern auch in der zellulären Anpassung an hypoxische Bedingungen. So bewirkt er z.B. eine Ausschüttung von VEGF und die Transkription verschiedener zellproliferativer und glykogenolytischer Gene [116].

1. AK: Polyclonal HIF-1α rabbit IgG Verdünnung: 1:1000

2. AK: HRP-linked antibody, goat anti-rabbit IgG Verdünnung: 1:2000

Proteinmenge pro Geltasche: 20 µg/10 µL

Induzierbare NO-Synthase

Als katalysierendes Enzym trägt die induzierbare NO-Synthase (iNOS) zur Oxidierung von L-Arginin zu NO bei. Neben dessen Rolle als vasodilatierender Gasotransmitter wird es als freies Radikal in größeren Mengen durch die iNOS hergestellt. Dieser Vorgang wird durch Zytokine ausgelöst und dient zur Immunabwehr [94].

1. AK: Polyclonal NOS1/bNOS rabbit IgG Verdünnung: 1:1000

2. AK: HRP-linked antibody, goat anti-rabbit IgG Verdünnung: 1:2000

Proteinmenge pro Geltasche: 40µg/20 µL

Bcl-xL

Als mitochondriales Transmembranprotein stabilisiert Bcl-xL (B-cell lymphoma–extra large) die Membranhomöostase. Es verhindert in Stresssituationen die Ausschüttung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und somit die Aktivierung von Caspase 9, wodurch es antiapoptotisch wirkt [28].

1. AK: Monoclonal Bcl-xL rabbit IgG Verdünnung: 1:2000

2. AK: HRP-linked antibody, goat anti-rabbit IgG Verdünnung: 1:2000

Proteinmenge pro Geltasche: 10 µg/10 µL

IκBα

Dieses zytoplasmatische Protein ist ein direkter Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF-κB. Es verhindert durch Komplexbildung mit ihm sowohl dessen Aktivierung, als auch seine Bindung an die DNS. NF-κB spielt eine tragende Rolle in der Entwicklung einer Entzündungsantwort und wirkt je nach Stimulus und Zelltyp anti- oder proapoptotisch [7,67]. Dafür ist die Spaltung des Komplexes durch Phosphorylierung von IκBα notwendig, etwa durch inflammatorische Zytokine oder reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) [102]. Somit korreliert die Konzentration von freiem IκBα negativ mit der von NF-κB.

1. AK: Polyclonal IκBα rabbit IgG Verdünnung: 1:2500

2. AK: HRP-linked antibody, goat anti-rabbit IgG Verdünnung: 1:2000

Proteinmenge pro Geltasche: 10 µg/10 µL

Verdünnt in Blotto B wurden die Primärantikörper auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4°C und leichtem Schwenken inkubiert. Danach wurde der jeweilige sekundäre Antikörper in der o.g. Verdünnung in Milchpuffer zusammen mit 10 ml Blotting Puffer auf die Nitrozellulosemembran aufgetragen. Nach einstündiger Inkubation wurde die Membran erneut mit einer TBS/Tween20 Mischung gewaschen.

Blots, die unscharfe oder inhomogene Anfärbungen oder starkes Hintergrundrauschen aufwiesen, wurden verworfen. Die gleichmäßige Proteinverteilung in den Taschen aller verwendeten Blots wurde mit Aktin Ladekontrollen überprüft.

2.8.3 Auswertung

Der Blot wurde mithilfe des LumiGLO® Entwicklerkits nach Herstellerangaben entwickelt. Anschließend wurde der Blot – in Frischhaltefolie gewickelt – in einer Röntgenkassette auf dem Röntgenfilm befestigt. In einer Dunkelkammer wurde dieser antikörperabhängig exponiert und anschließend entwickelt. Dadurch entsteht ein radiologisches Abbild der Banden. Zur Digitalisierung wurde das Programm Image J verwendet, mit dem die einzelnen Banden ausgemessen und densitometrisch analysiert wurden.

Zum Vergleich wurden zusätzlich Gewebeproben der beiden C57BL/6J Kontrollmäuse ausgewertet, weshalb die Ergebnisse in Kapitel 3.4 als „Vielfaches des Nativwertes“ angegeben sind.

2.9 Histologische Aufarbeitung

Das Lungengewebe wurde immunhistochemischen und histopathologischen Auswertungen zugeführt. Die Gewebsfixierung und die immunhistochemischen Verfahren wurden in Zusammenarbeit mit Rosa Engelhardt und Oscar McCook des Institutes für Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung in Ulm durchgeführt. Die histopathologische Auswertung wurde von einer unabhängigen, erfahrenen Pathologin durchgeführt (Dr. Angelika Scheuerle).

2.9.1 Gewebsfixierung

Sowohl für die immunhistochemische, als auch für die histopathologische Auswertung müssen Paraffin-Schnittpräparate hergestellt werden. Hierzu wurde unmittelbar post mortem der linke Lungenflügel für die Anfertigung histologischer und immunhistochemischer Präparatefärbungen entnommen, in einer Einbettkassette platziert und für die Dauer von sechs Tagen in Paraformaldehyd (4%) fixiert. Danach folgten die Dehydrierung des Gewebes in einer Reihe Lösungen mit aufsteigender Alkoholkonzentration (70, 90, 100, 100%), die Entfernung des Alkohols mittels Xylol, die Imprägnierung des Gewebes in flüssigem Paraffin und schließlich die Verarbeitung zu Paraffinblöcken.

An einem Microtom wurden nun 3 µm dicke Paraffinschnittpräparate angefertigt und in vollentsalztes Wasser von 50°C gegeben. Gleich danach wurden sie mit Glasobjektträgern wieder herausgeholt, auf denen sie haften blieben. Nach dem Trocknen im Brutschrank bei 41 °C wurden die Gewebeschnitte in vier Waschgängen mit Xylol für insgesamt 14 Minuten entparaffiniert und durch jeweils 5 Minuten in Bädern einer Alkoholreihe absteigender Konzentration (100, 100, 90, 70%) wieder in ein wässriges Milieu überführt. In diesem Zustand wurden die Schnittpräparate den verschiedenen Färbemethoden zugeführt.

2.9.2 Immunhistochemie

Nach der Entparaffinierung wurden die Objektträger für 4 Minuten in destilliertem Wasser gespült und ein *heat-induced epitop retrieval* (HIER) mittels 10 mM Citratpuffer (pH 6) durchgeführt, um die Bindung der Antigene zu verbessern. Dafür wurden die Objektträger in Citratpuffer 2 mal 4 Minuten in der Mikrowelle bei 700 Watt erhitzt. Die kontinuierliche Benetzung der Präparate mit Citratpuffer wurde durch Auffüllen des Behälters mit destilliertem Wasser zwischen den beiden Erhitzungsschritten gewährleistet.

Nach Abkühlen und erneutem Waschen der Proben in destilliertem Wasser und TBS-Puffer (*Tris Buffered Saline*, pH 8) folgte eine 20 minütige Inkubation der Objektträger mit 10% „Normal Donkey Serum“ für die Anfärbung von Albumin und Angiopoietin-1 (Ang-1), bzw. mit 10% „Normal Goat Serum“ für die Anfärbung von CBS, Caspase-3 (Cas-3), Nitrotyrosin (NT) und VEGF. Beide Seren wurden mit TBS-Puffer und 0,001 % Tween-20 verdünnt. Sie dienen der Reduktion der unspezifischen zytoplasmatischen Hintergrundfärbung. Anschließend folgte bei Raumtemperatur die einstündige Inkubation mit dem verdünnten Primärantikörper in einer Lösung aus 10 ml TBS-Puffer (pH 8,0) mit 30 µl Tween 20 und 10 µl des entsprechenden Serums. Mit den 1:25-verdünnten Sekundärantikörpern (Donkey anti goat für Albumin und Ang-1, ansonsten goat anti rabbit, Substanz A des Dako REAL™ Detection Systems) wurde 30 Minuten lang inkubiert. Anschließend wurden die Antikörper-Antigen-Komplexe durch Chromagen mit den Substanzen C, D, E und F des Kits nach Angaben des Herstellers sichtbar gemacht, um das in Abb. 4A dargestellte Ergebnis zu erhalten. Zwischen den einzelnen Inkubationen erfolgten ca. 5 minütige Waschschrte mit TBS und 0,002 % Tween 20.

Nach Inkubation der Antikörperlösungen wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer für 30 Sekunden vorgenommen. Nach ca. 10 minütigem Waschen mit Leitungswasser und schließlich vollentsalztem Wasser erfolgte eine Behandlung der Objektträger mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70, 90, 100%) für je 3 Minuten und zwei Xylol-Bäder für insgesamt 6 Minuten. Abschließend konnten die immunhistochemisch gefärbten Objektträger mit Neo-Mount® benetzt und mit Deckgläsern versehen werden. Folgende Antikörper wurden zur Darstellung bestimmter Gewebeeigenschaften verwendet:

Albumin

Albumin macht den größten Teil des im Blut vorhandenen Eiweißes aus. Weil es bei Fehlfunktionen der Endothelbarriere in großen Mengen ins Gewebe übertritt wird die extravaskuläre Anfärbung von Albumin als Indikator der endothelialen Barriestörung mit erhöhter vaskulärer Permeabilität verwendet. Ihr liegt ein Mangel an gelöstem NO zugrunde, der in diesem Fall am ehesten aufgrund Inaktivierung durch Sauerstoffradikale entsteht [34].

Für den immunhistochemischen Nachweis einer endothelialen Barriestörung wurde ein polyklonaler Ziegenantikörper in einer 1:60-Verdünnung verwendet.

Angiopoietin-1

Ang-1 spielt eine Rolle in der Aufrechterhaltung und Wiederherstellung der endothelialen Integrität [136] und wird durch H₂S reguliert [79]. Es verringert die Wahrscheinlichkeit eines Lungenödems und verlängert die Überlebenszeit nach akuter Lungenschädigung (*acute lung injury*, ALI) [59].

Für den immunhistochemischen Nachweis vaskulären Wachstums und Reparatur wurde ein polyklonaler Ziegenantikörper in einer 1:60-Verdünnung verwendet.

Cystathionin-β-Synthase

CBS ist das Schlüsselenzym eines der Pfade zur H₂S-Produktion (vgl. Kapitel 1.2). Es gilt zu untersuchen, wie ein CSE ko diese alternativen Pfade beeinträchtigt.

Für den immunhistochemischen Nachweis der alternativen H₂S-Produktion in der Lunge wurde ein polyklonaler Kaninchenantikörper in einer 1:100-Verdünnung verwendet.

Caspase-3

Cas-3 ist das terminale Enzym der Apoptosekaskade. Sowohl der intrinsische Pfad (Zellulärer Stress führt zur Aktivierung von Caspase-9), als auch der extrinsische (Bindung von Liganden an den extrazellulären „death cell receptor“ aktiviert Caspase-8) führen schließlich zur Spaltung der inaktiven Pro-Caspase-3 zur ausführenden Caspase-3. [73,112]. Sie ist damit das Bindeglied zwischen den beiden apoptotischen Signalwegen.

Für den immunhistochemischen Nachweis von Apoptose wurde ein polyklonaler Hasenantikörper gegen aktivierte Caspase-3 in einer 1:100 -Verdünnung verwendet.

Nitrotyrosin

NT ist eine modifizierte Aminosäure, deren Vorhandensein als Indiz für nitrosativen Stress gilt. Hyperoxidationen (O_2^-) reagieren mit NO zum stark zytotoxischen Peroxynitrit ($ONOO^-$), das verschiedene Biomoleküle attackiert und somit einen Zellschaden hervorrufen kann [101]. Zusätzlich nitrosyliert es freie Tyrosinreste in Proteinen. Dieser Prozess ist mittels Nitrotyrosin als Biomarker nachweisbar. In gesunden Organismen findet er, wenn überhaupt, nur sehr geringfügig statt und ist in der Regel nicht messbar [44].

Für den immunhistochemischen Nachweis von nitrosativem Stress wurde ein polyklonaler Hasenantikörper gegen NT in einer 1:200 -Verdünnung verwendet.

Vascular endothelial growth factor

VEGF ist ein Signalmolekül, das NO-Ausschüttung und Angiogenese, insbesondere am Endothel stimuliert [53]. Es wird bei Sauerstoffmangel durch hypoxieinduzierte Faktoren induziert, aber auch von Peroxynitrit moduliert [122]. Seine Konzentration korreliert mit der Wahrscheinlichkeit eines Lungenödems im Rahmen einer ALI [142].

Für den immunhistochemischen Nachweis von nitrosativem und oxidativem Stress wurde ein polyklonaler Kaninchenantikörper in einer 1:200-Verdünnung verwendet.

Auswertung

Die angefärbten Präparate wurden lichtmikroskopisch und verblindet mittels „AxioVision Imaging Software“, einer Software für Bildanalyse, ausgewertet. Hierbei erfolgte eine Messung sowohl der Intensität der Rotfärbung, als auch ihrer Fläche in μm^2 . Pro Präparat wurden mehrere Areale $800\ 000\ \mu m^2$ in die Wertung aufgenommen, wie in Abb. 4 dargestellt. Nur eindeutig gefärbte Bereiche wurden in die Wertung aufgenommen.

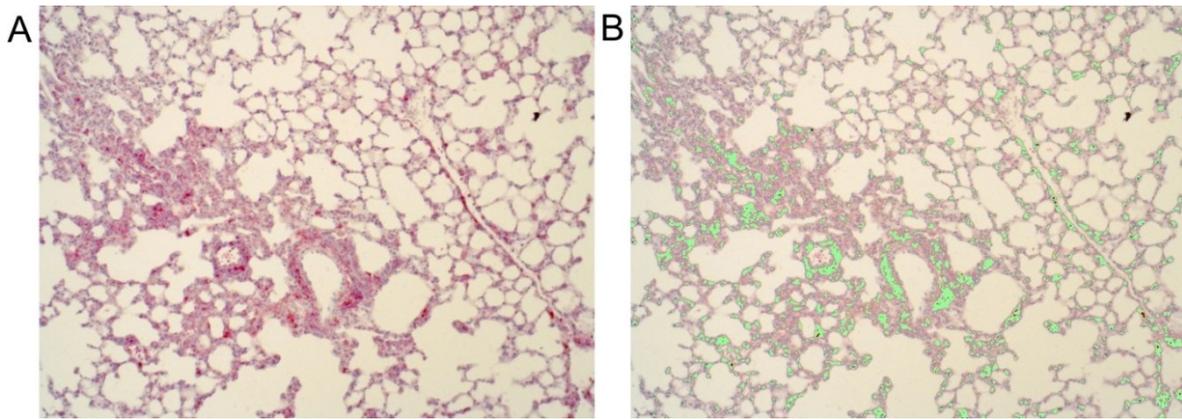


Abb. 4: Quantitative Auswertung der immunhistochemischen Anfärbung am Beispiel des *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Bild A: 800 000 μm^2 großer Ausschnitt eines auf VEGF angefärbten Präparates. Bild B: Die von AxioVision Imaging als positiv gewerteten Areale desselben 800 000 μm^2 - Ausschnitts sind grün markiert.

2.9.3 Histopathologie

Um die Lungenpräparate morphologisch beurteilen zu können, wurden diese zunächst mithilfe eines Färbautomats mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt. Dieser inkubierte die Schnitte in Mayers Hämalaun und nach kurzem Spülen mit destilliertem Wasser in Eosin. Dehydriert wurden sie in aufsteigender Alkoholreihe, ähnlich wie in Kapitel 2.9.2 beschrieben. Nach anschließendem Xylobad wurden die Proben ebenfalls mit Neo-Mount® und Deckgläsern versehen.

Diese Färbemethode ermöglicht eine differenzierte Beurteilung des Präparats, da basophile Strukturen durch Hämalaun blau und eosinophile Strukturen durch Eosin rot gefärbt werden.

Die lichtmikroskopische Auswertung der HE (Hämatoxylin-Eosin)-gefärbten Lungenpräparate erfolgte verblindet. Folgende Kriterien wurden einbezogen: Dystelektase, emphysematöse Überblähung, Alveolarmembranverdickung, Makrophagen und Lymphozyten. Da unter Beachtung des Anfärbeverhaltens von Granulozyten nur wenige eindeutig identifiziert werden konnten, wurden diese nicht mit in die Wertung aufgenommen. Weitere enzymatische Färbungen erschienen nicht sinnvoll, da das Gewebe bereits fixiert war. Dies spiegelt sich in den Erkenntnissen von Matute-Bello et. al wider, laut derer Mäuse im Vergleich zum Menschen weniger zirkulierende neutrophile Granulozyten aufweisen (10-25% versus 50-70%) und sich die Unterscheidung von Granulozyten und

Lymphozyten bzw. Monozyten bei der Maus als schwierig erweist [86]. Die untersuchten Parameter wurden anhand folgender Skala bewertet:

0	Nicht vorhanden
1	Kaum erkennbar
2	Sehr gering ausgeprägt
3	Gering ausgeprägt
4	Mäßig ausgeprägt
5	Stark ausgeprägt

Die Makrophagen und Lymphozyten wurden ausgezählt, die Punktevergabe erfolgte hier nach Anzahl pro Hauptgesichtsfeld.

Die so bestimmten Werte jeder einzelnen Maus wurden addiert, separat statistisch ausgewertet und in Kapitel 3.6 als „Gesamt-Score“ für histologische Schädigung angegeben.

Abb. 5 stellt ein repräsentatives Beispiel der ausgewerteten Lungenschnitte der beiden Gruppen dar.

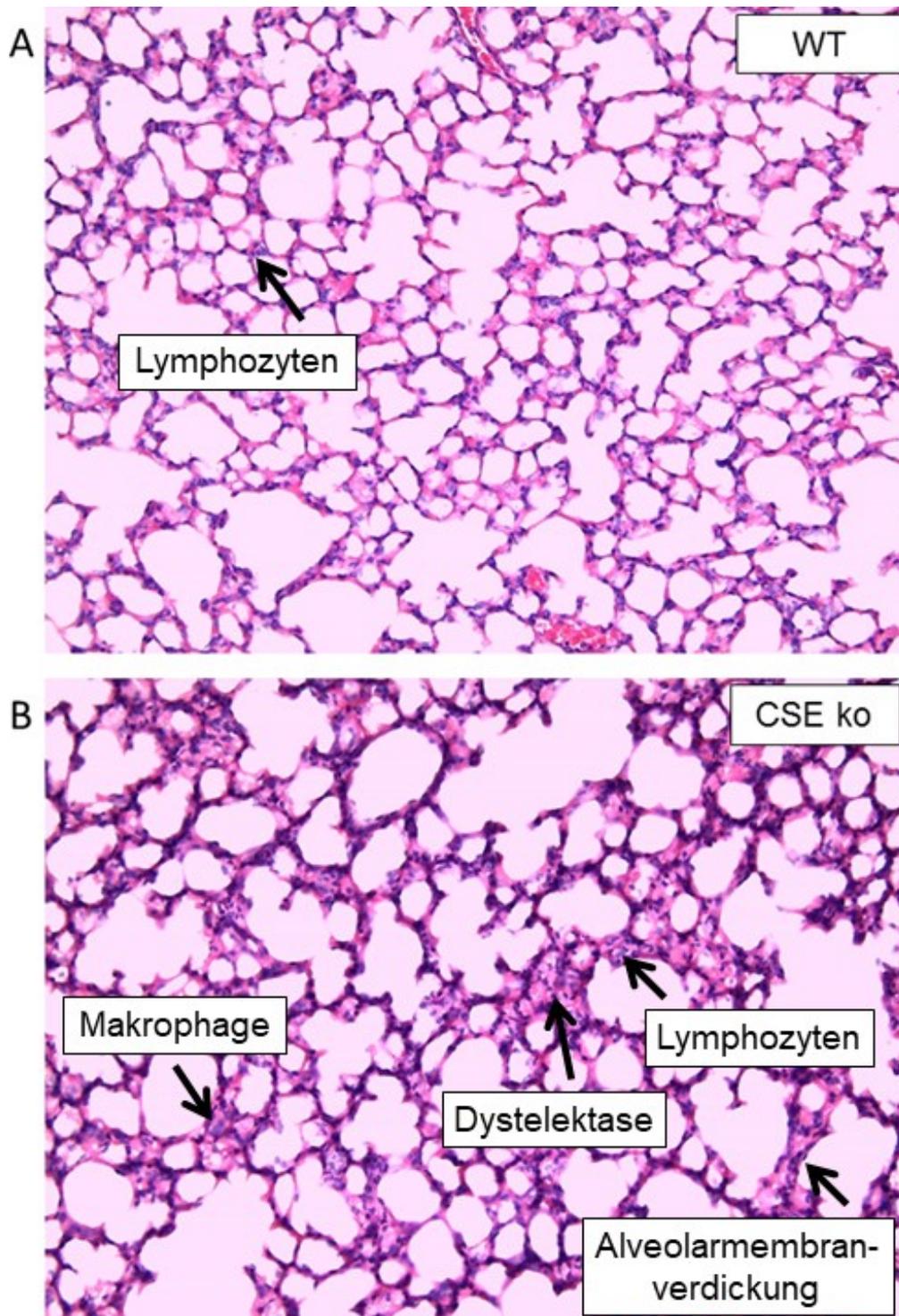


Abb. 5: Histopathologische Auswertung der Lungenpräparate. Je ein repräsentatives Beispiel der Hämatoxylin-Eosin gefärbten Präparate der Wildtyp (WT)-Gruppe (A) und der Cystathionin- γ -Lyase (CSE ko)-Gruppe (B) sind abgebildet. Auf beiden Präparaten sind eingewanderte Lymphozyten und Makrophagen zu erkennen, unten ausgeprägtere Verdickungen der Alveolarmembran und dezente Dystelektasen. Vergrößerung: 400x

2.10 Statistik

Dies ist eine prospektive, kontrollierte und randomisierte Studie. Eine Normalverteilung der Ergebnisse wurde nicht angenommen, deshalb wurde die Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mithilfe des Mann-Whitney Rangsummentests für unabhängige Stichproben durchgeführt.

Die tabellarisch dargestellten Ergebnisse dieser Arbeit sind als Median, 25. und 75. Perzentile angegeben. Kenngrößen mit arbiträren Werten sind für eine bessere Übersichtlichkeit mittels Boxplots veranschaulicht, in denen zusätzlich Minimal- und Maximalwerte abgebildet sind.

Als statistisch signifikant wurden Tests mit einem p kleiner als 0,05 betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Daten

Die an MZP 0 und 3 gemessenen Daten zu Hämodynamik, Lungenmechanik, Gasaustausch, Metabolismus und Säure-Basen-Status sind in Tabelle 12 aufgeführt. Der PaO₂, PaO₂/FiO₂ und auch der arterielle pH-Wert stiegen in der Wildtyp-Gruppe im Verlauf des Versuchs an (p=0,0002, p=0,0002, p=0,046). Bei CSE ko-Mäusen waren Herzfrequenz und mittlerer arterieller Blutdruck an MZP 3 signifikant höher als bei der Wildtyp-Gruppe (p=0,016, p=0,020). In der CSE ko-Gruppe war die Lungencompliance während des gesamten Versuchsablaufs höher als in der Wildtyp-Gruppe (MZP 0: p=0,026; MZP 3: p=0,019). Der Blutglukosespiegel wurde an MZP 3 bestimmt und war in der CSE ko-Gruppe gegenüber dem Wildtyp signifikant erniedrigt (p=0,0006). Aus Tabelle 12 ist außerdem zu entnehmen, dass es zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede im Noradrenalinbedarf gab, um einen mittleren arteriellen Druck von ≥ 50 mmHg aufrechtzuerhalten.

Tabelle 12: Hämodynamische und lungenmechanische Parameter, Gasaustausch, Säure-Basen-Status und metabolische Daten von Mäusen mit (CSE ko) und ohne Cystathionin- γ -Lyase-Knockout (WT). Die Daten an Messzeitpunkt (MZP) 0 wurden eine Stunde nach Thoraxtrauma, an MZP 3 vier Stunden nach Trauma erhoben. Die Daten sind als Median (Quartile) dargestellt. §= p<0,05 versus Wildtyp-Gruppe desselben MZP, #= p<0,05 versus MZP 0 derselben Versuchsgruppe.

Parameter	Gruppe	MZP 0	MZP 3
Herzfrequenz [min ⁻¹]	WT	316 (301; 365)	328 (314; 340)
	CSE ko	414 (315; 424)	385 (348; 480) §
Mittlerer arterieller Druck [mmHg]	WT	57 (51;61)	57 (49; 58)
	CSE ko	61 (48; 72)	63 (57; 78) §
Noradrenalingabe [μ L \cdot h ⁻¹]	WT	0 (0; 15)	0 (0; 0)
	CSE ko	0 (0; 15)	0 (0; 0)
Atemminutenvolumen [mL \cdot min ⁻¹ \cdot kg ⁻¹]	WT	753 (743; 705)	790 (755; 822)
	CSE ko	775 (705; 876)	750 (705; 818)

Compliance [$\mu\text{L} \cdot \text{cmH}_2\text{O}^{-1}$]	WT	86 (53; 90)	87 (81; 91)
	CSE ko	108 (88; 125) §	122 (103; 141) §
PaO ₂ [mmHg]	WT	76 (73; 79)	102 (91; 105) #
	CSE ko	86 (64; 92)	101 (76; 110)
PaCO ₂ [mmHg]	WT	37 (33; 40)	32 (29; 31)
	CSE ko	30 (27; 38)	30 (25; 38)
PEEP [cm H ₂ O]	WT	3 (3; 3)	3 (3; 3)
	CSE ko	3 (3; 3)	3 (3; 3)
PaO ₂ /FiO ₂ [mmHg]	WT	364 (348; 375)	485 (428; 499) #
	CSE ko	407 (306; 438)	480 (362; 523)
Arterieller pH	WT	7,30 (7,27; 7,33)	7,34 (7,31; 7,44) #
	CSE ko	7,34 (7,39; 7,27)	7,39 (7,34; 7,45)
Arterieller Basenüberschuss [mmol·L ⁻¹]	WT	-7,5 (-9,0; -6,6)	-4,7 (-8,4; -3,4)
	CSE ko	-7,6 (-9,6; -5,5)	-5,9 (-7,4; -4,9)
Glukose [mmol·L ⁻¹]	WT		113 (108; 129)
	CSE ko		92 (87; 97) §
Laktat [mmol·L ⁻¹]	WT		1,6 (1,33; 1,8)
	CSE ko		1,2 (0,8; 1,4)

3.2 Zytokine in Lunge und Plasma

Tabelle 13 stellt die in Lunge und Blutplasma gemessenen Konzentrationen der pro- und antiinflammatorischen sowie der chemotaktischen Zytokine dar. In der Lunge von CSE ko-Mäusen war eine signifikante Erhöhung des IL-18 ($p=0,003$), IL-1 β ($p=0,002$) und der KC ($p=0,021$) gegenüber der WT Gruppe messbar. Im Plasma waren in der CSE ko-Gruppe dagegen IL-6 ($p=0,0002$), KC ($p=0,021$) und MCP-1 ($p=0,028$) signifikant erhöht.

Tabelle 13: Zytokin- und Chemokinkonzentrationen in Lunge und Plasma: Vergleich zwischen Wildtyp- (WT) und Cystathionin- γ -Lyase-Knockout-Gruppe (CSE ko). Die Daten sind als Median (Quartile) dargestellt. §= $p<0,05$ versus Wildtyp-Gruppe desselben Messzeitpunkts.

Gewebe	Parameter	WT	CSE ko
Lunge	TNF α [pg•mg _{protein} ⁻¹]	79 (66; 97)	57 (53 ;77)
	IL-18 [pg•mg _{protein} ⁻¹]	486 (434; 537)	940 (664; 1155) §
	IL-6 [pg•mg _{protein} ⁻¹]	5,0 (4,5; 5,9)	5,7 (3,9; 19,0)
	KC [pg•mg _{protein} ⁻¹]	138 (106; 272)	279 (235; 481) §
	MCP-1 [pg•mg _{protein} ⁻¹]	22 (20; 27)	22 (20; 24)
	IL-1 β [pg•mg _{protein} ⁻¹]	66 (59; 78)	114 (92; 171) §
	IL-10 [pg•mg _{protein} ⁻¹]	7,7 (6,8; 10,0)	7,7 (5,3; 9,7)
Plasma	TNF α [pg•mL ⁻¹]	20 (10; 26)	17 (11; 33)
	IL-18 [pg•mL ⁻¹]	163 (138; 199)	121 (82; 200)
	IL-6 [pg•mL ⁻¹]	52 (40; 61)	118 (88; 158) §
	KC [pg•mL ⁻¹]	52 (34; 89)	145 (86; 241) §
	MCP-1 [pg•mL ⁻¹]	71 (49; 91)	100 (88; 841) §
	IL-1 β [pg•mL ⁻¹]	18 (12; 29)	12 (10; 17)
	IL-10 [pg•mL ⁻¹]	25 (20; 28)	14 (11; 22)

3.3 Comet Assay

Abb. 6 ist zu entnehmen, dass der Tailmoment der CSE ko-Gruppe statistisch signifikant erhöht war. In dieser Gruppe wurden also an MZP 3 mehr DNS-Schäden gemessen als in der WT-Gruppe.

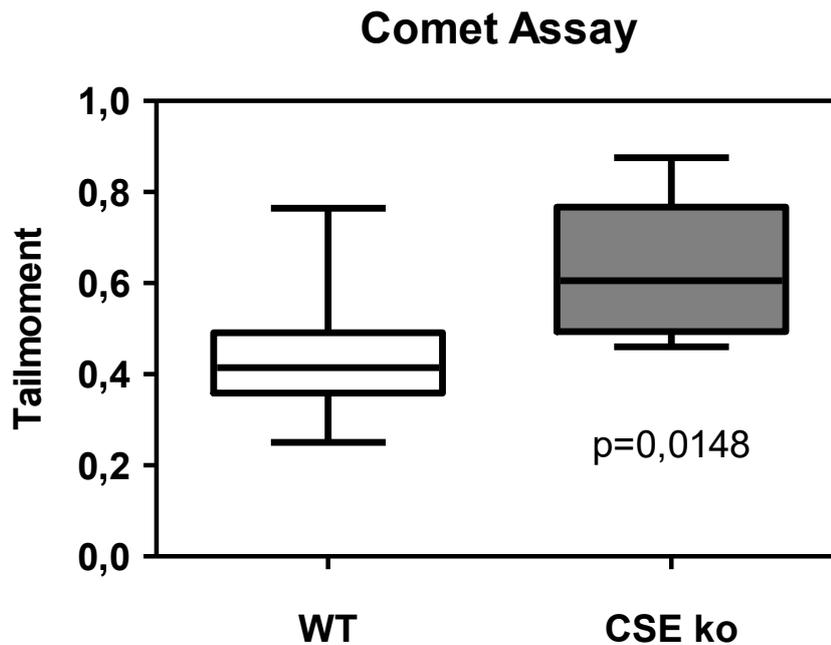


Abb. 6: Comet Assay. Die Graphik vergleicht die Ausprägung des Tailmoments zwischen den Mäusen der Wildtyp- (WT) und der Cystathionin- γ -Lyase-Knockout-Gruppe (CSE ko). Die Daten sind als Median (Quartile, Minimum und Maximum) dargestellt.

3.4 Western Blot

Im Lungengewebe der CSE ko-Gruppe zeigte sich an MZP 3 eine signifikant stärkere Ausprägung von HO-1 als in der WT Gruppe. Im Gegensatz hierzu wurde eine signifikant geringere Konzentration von HIF-1 α gemessen, wie in Abb. 7 zu erkennen ist. Die stärkste Veränderung wurde bei I κ B α festgestellt, das durch den Knockout stark zurückging. Die iNOS und Bcl-XL waren in der CSE ko-Gruppe schwächer exprimiert. Diese Tendenzen erreichten allerdings kein Signifikanzniveau.

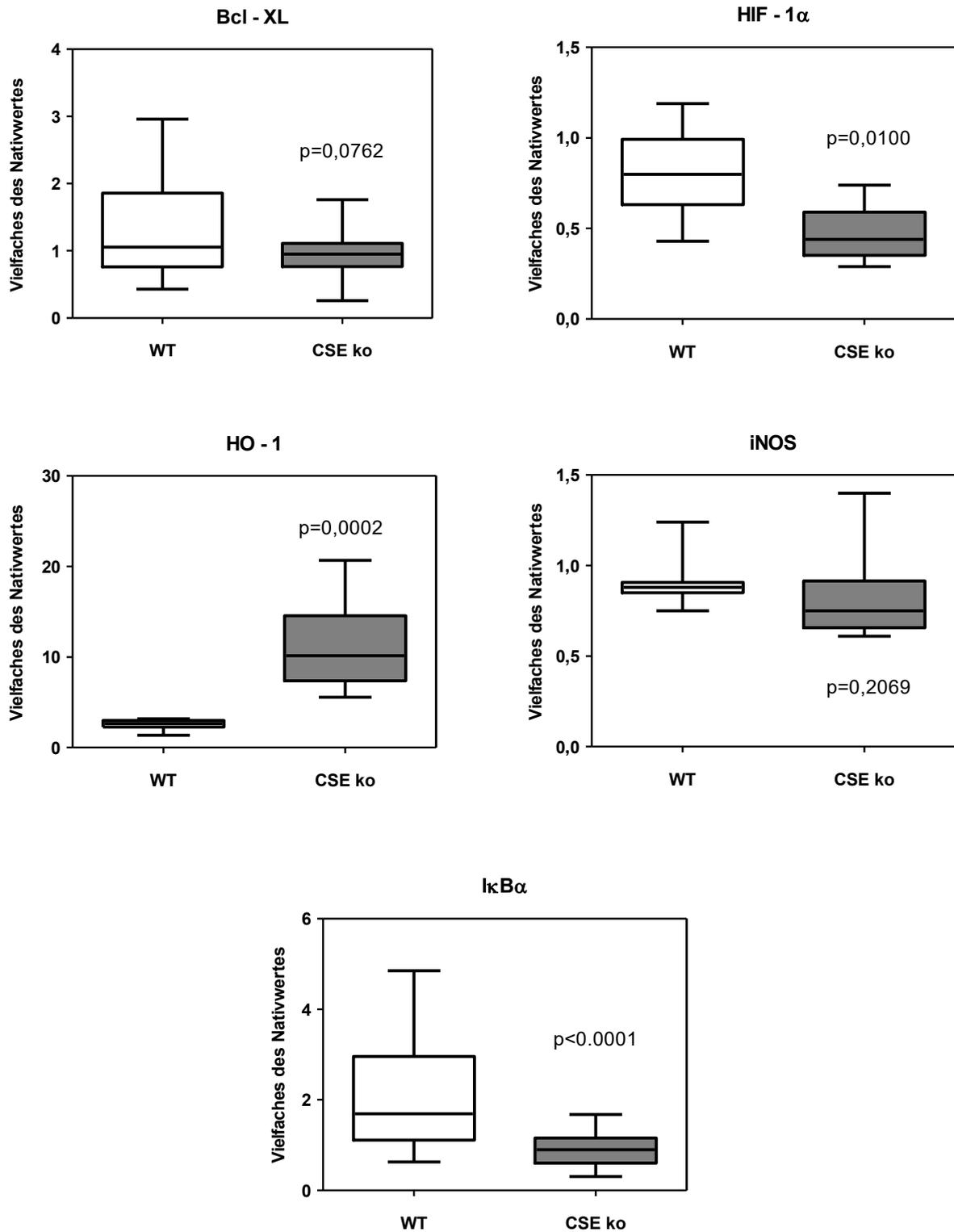


Abb. 7: Western Blots des Lungengewebes für *B-cell lymphoma-extra large* (Bcl-XL), Hypoxie-induzierter Faktor 1 α (HIF-1 α), Hämoxygenase-1 (HO-1), induzierbare NO-Synthase (iNOS) und *Inhibitor of κ B, α* (I κ B α). Die Graphiken vergleichen die jeweiligen Proteinkonzentrationen zwischen den Mäusen der Wildtyp- (WT) und der Cystathionin- γ -Lyase-Knockout-Gruppe (CSE ko). Die Daten sind als Median (Quartile, Minimum und Maximum) dargestellt.

3.5 Immunhistochemie

Die immunhistologische Anfärbung des Lungengewebes nach MZP 3 ergab insgesamt kaum signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (s. Abb. 8). Allein Angiopoietin-1 war in der CSE ko-Gruppe deutlich erhöht. Stärker färbten sich in der CSE ko-Gruppe außerdem Albumin und Nitrotyrosin an, beide allerdings nicht signifikant.

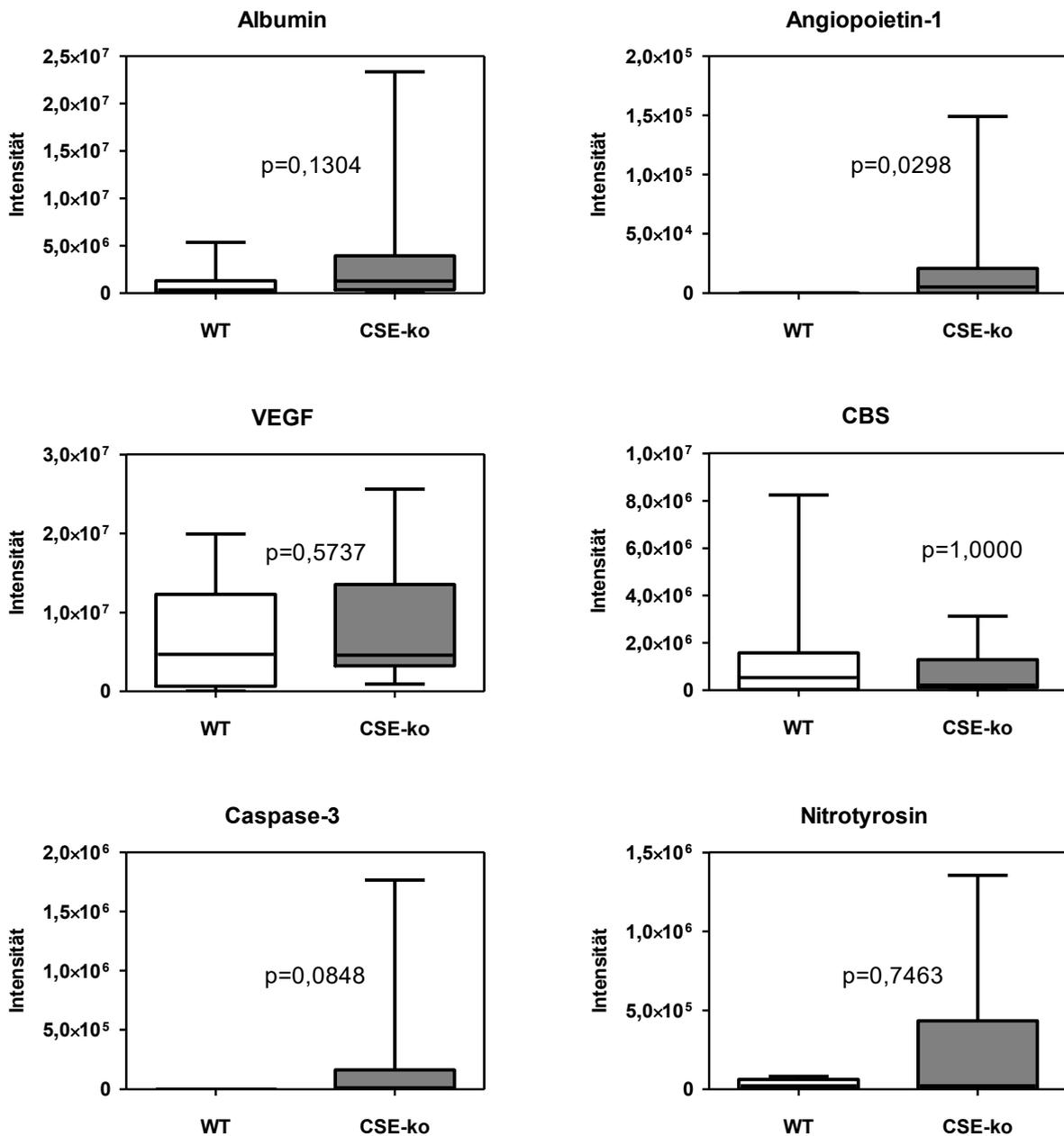


Abb. 8: Immunhistochemie des Lungengewebes für Albumin, Angiopoietin-1, vascular endothelial growth factor (VEGF), Cystathionin- β -Synthase (CBS), Caspase-3 und Nitrotyrosin. Die Graphiken vergleichen die jeweiligen Farbintensitäten des Lungengewebes zwischen den Mäusen der Wildtyp- (WT) und der Cystathionin- γ -Lyase-Knockout-Gruppe (CSE ko). Die Daten sind als Median (Quartile, Minimum und Maximum) dargestellt.

3.6 Histopathologie

Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung des Lungengewebes unter dem Lichtmikroskop sind in Tabelle 14 abgebildet. Der Knockout führte zu stärker ausgeprägter Dystelektase ($p= 0,0235$) und Migration von Entzündungszellen, von welchen aber nur die Makrophagen statistische Signifikanz erreichten ($p= 0,0021$). Auch der „Gesamt-Score“ ist in der CSE ko-Gruppe deutlich höher ($p= 0,0149$) und weist auf ausgeprägtere gewebestrukturelle Veränderungen dieser Gruppe hin.

Tabelle 14: Quantifizierung der histopathologischen Auswertung des Lungengewebes. Die Lungenschnitte der Wildtyp- (WT) und Cystathionin- γ -Lyase-Knockout-Gruppe (CSE ko) wurden in Bezug auf die dargestellten Kriterien bewertet mit 0 (nicht vorhanden), 1 (kaum erkennbar), 2 (sehr gering), 3 (gering), 4 (mäßig), oder 5 (stark ausgeprägt). Makrophagen sind als Anzahl pro Hauptgesichtsfeld (HPF) dargestellt. Der „Gesamt-Score“ wurde aus der Summe aller Werte jeder Maus errechnet. Die Daten sind als Median (Quartile) angegeben. §= $p<0,05$ versus Wildtyp.

Parameter	WT	CSE ko
Dystelektase	0,0 (0,0; 0,0)	2,0 (0,3; 3,8) §
Emphysem	3,5 (2,3; 4,0)	3,0 (1,3; 3,8)
Alveolarmembranverdickung	1,0 (0,0; 2,5)	2,0 (1,0; 3,8)
Lymphozyten	0,5 (0,0; 3,0)	2,5 (1,3; 3,0)
Makrophagen [HPF ⁻¹]	0,0 (0,0; 0,0)	2,5 (1,1; 3,0) §
Gesamt-Score	4,5 (3,3; 8,8)	10,25 (9,0; 13,8) §

4 Diskussion

Über den Einfluss von Schwefelwasserstoff auf die Mechanismen der Entzündungsantwort ist sich die Literatur bislang uneins. Es ist hierbei eine deutliche Heterogenität der Studien zu erkennen, was untersuchte Organsysteme (Hinterpfote [10], Leber [13], Lunge [37], Niere [138], systemisch [77]), Zellen und Darreichungsform (inhaliert [37], intravenös als Na₂S [146], als *slow-releasing drug* [75]) bzw. Blockade von H₂S [157] betrifft. Womöglich stehen sich heute aus diesen Gründen Zeugnisse einer pro- [3,4,77,157-161] und antiinflammatorischen [6,35-38,41,76,123,137,146,147,155] sowie einer pro- [8,21,84] und antiapoptotischen [14,32,37,89,109,138] Wirkung von Schwefelwasserstoff gegenüber.

Ähnlich verhält es sich mit dem H₂S-produzierenden Enzym CSE, welches in der vorliegenden Studie untersucht wurde. Bei Asthma [27], COPD [26] sowie nach Nierenschaden [15] wurden protektive Effekte beobachtet; auf den begleitenden Lungenschaden im Rahmen einer Pankreatitis wirkte sich jedoch seine Blockade positiv aus [134]. Zur Übertragbarkeit der erhobenen Ergebnisse auf ein klinisch relevantes Setting, wie die MICU, fehlt es bislang gänzlich an Untersuchungen.

Die vorliegende Studie setzte sich deshalb zum Ziel, mit einem klinisch relevanten Versuchsaufbau die Effekte der CSE auf die Entzündungsantwort nach Thoraxtrauma zu untersuchen, ohne verfälschenden Variablen wie Pharmakodynamik oder –kinetik sowie dosis- und organabhängiger Unterschiede in der Wirkung zu unterliegen, wie sie bei bisherigen Untersuchungen zur Wirkung von H₂S zum Tragen kamen. Dies war dadurch möglich, dass die Versuche an genetisch modifizierten Mäusen ohne CSE-Expression und in einer eigens dafür entwickelten intensivmedizinischen Einheit durchgeführt wurden.

Zusammengefasst wurden folgende Ergebnisse beobachtet:

- Der CSE ko erhöhte die pulmonale Compliance a.e. im Sinne einer emphysematösen Überblähung. Gegen Ende des Versuchs steigerte er zudem Herzfrequenz und arteriellen Blutdruck, ließ jedoch den Gasaustausch unbeeinflusst.
- Eine beobachtete Senkung der Blutglukose steht in Einklang mit einem vorbeschriebenen blutzuckersteigernden Effekt von H₂S.
- Die Erhöhung mehrerer Zyto- und Chemokine in der CSE ko-Gruppe legt eine entzündungshemmende Wirkung von Schwefelwasserstoff nahe, sowohl auf lokaler als auch auf systemischer Ebene.
- Festgestellte Schäden der DNS und weitere Indikatoren für oxidativen Stress bilden die antioxidative Wirkung von H₂S ab, ein klarer Einfluss der Mutation auf die Gefäßfunktion oder Apoptose war nicht festzustellen.
- Als histomorphologisches Korrelat der Entzündung befanden sich in den Lungen der CSE ko-Tiere mehr Entzündungszellen, auch waren vermehrt Dystelektasen auszumachen. Größere strukturelle Schäden verursachte der Knockout nicht.
- Die Expression von CBS als alternativer Produktionsweg für Schwefelwasserstoff blieb unverändert.

4.1 Interpretation klinischer Parameter

Bei der Interpretation aller vorliegenden Werte muss beachtet werden, dass sie keine definitiven Rückschlüsse auf die Wirkung von H₂S zulassen [51]. Untersucht wurde lediglich die Wirkung des Knockouts der CSE, was nicht gleichbedeutend ist mit einem Nichtvorhandensein von H₂S. Zum einen kann keine sichere Aussage über die tatsächlich verfügbare Menge des Gases getroffen werden, weil diese nicht gemessen wurde (siehe dazu Abschnitt 1.2). Zum anderen ist es vorstellbar, dass der Knockout von der H₂S-Konzentration unabhängige Effekte mit sich bringt. Es können somit im vorliegenden Versuchsaufbau valide Schlussfolgerungen nur über die Wirkung der CSE, nicht aber über die von H₂S gezogen werden.

4.1.1 Kreislaufparameter

Die Ergebnisse mehrerer Studien suggerieren, dass Schwefelwasserstoff über die Öffnung von K_{ATP}-Kanälen gefäßerweiternd und somit blutdrucksenkend wirkt [29,90,163,164]. Wie schon in der erstmaligen Untersuchung der CSE ko-Mäuse [154] wurde auch im vorliegenden Setting zu Ende des Versuchs ein erhöhter Blutdruck gemessen. Die an MZP 3 gesteigerte Herzfrequenz nach Knockout steht ebenfalls in Einklang mit einem vorbeschriebenen negativ chronotropen Effekt von exogen appliziertem H₂S, der auch unabhängig von einer durch das Gas verursachten Hypothermie auftritt [106,131,143]. Allerdings konnten beide Effekte erst an MZP 3, also vier Stunden nach Versuchsbeginn, beobachtet werden. Passend hierzu kann der hohe Puls auch als Ausdruck einer stärkeren Stressreaktion als Resultat der gesteigerten Zytokinantwort und vermehrten Atelektasenbildung verstanden werden. Auch wenn der Effekt des Knockouts nicht gleichzusetzen ist mit niedrigeren H₂S-Plasmakonzentrationen (s. Abschnitt 4.1), konnte die vorbeschriebene kardiovaskuläre Wirkung des beobachtet werden.

4.1.2 Lungenmechanik und Gasaustausch

Die meisten der erhobenen Parameter zu Lungenmechanik und Gasaustausch zeigten sich durch den genetischen Knockout unbeeinträchtigt. Einzig die Compliance war gegenüber der Wildtypgruppe sowohl zu Anfang des Versuchs, als auch zu dessen Ende signifikant erhöht. Im vorliegenden Setting ist eine

Beeinträchtigung der Compliance am ehesten durch das Thoraxtrauma an sich zu erwarten, da eine VILI unter „lungenprotektiver“ Beatmung mit Tidalvolumina von unter 6 $\mu\text{l/g KG}$ unwahrscheinlich ist. Dementsprechend wurde in einem vergleichbaren Modell derselben Arbeitsgruppe eine Veränderung der Compliance nach Thoraxtrauma beobachtet, nachher appliziertes Na_2S hatte hierauf jedoch keinen Einfluss [146]. Allerdings führen sowohl diese Art der Schädigung, als auch eine VILI durch Entstehung eines Lungenödems regelhaft zu einer verminderten, nicht wie hier zu einer erhöhten Compliance [114,139]. Des Weiteren ist zumindest in letzterem Fall ein protektiver Effekt durch Schwefelwasserstoff vorbeschrieben [41]. Esehie et al. beschrieben einen solchen positiven Einfluss auch nach kombinierter Brand- und Rauchinhalation [36]. Somit lässt sich über die Entstehung der vorliegenden Werte nur spekulieren.

Eine mögliche Ursache für hohe Compliance-Werte ist eine emphysematöse Überblähung der Lunge, wie sie beim chronisch-entzündlichen Krankheitsbild der COPD vorkommt [51]. Der vorbeschriebene protektive Effekt von H_2S auf die COPD [26] passt gut in dieses Bild. Die ähnlichen histopathologischen Emphysemwerte der Versuchsgruppen sind hiermit vereinbar, da auch die COPD bei noch unbeeinträchtigter Lungenkapazität die statische Compliance durch Überblähung erhöhen kann [96]. Es ist z.B. vorstellbar, dass der CSE ko an sich Einfluss auf die pulmonale Elastizität nimmt und somit die Compliance a priori beeinflusst. Zumindest in der glatten Atemwegsmuskulatur von Ratten wurde das Enzym immunhistochemisch nachgewiesen [27]. Unterstützt wird diese These von einer Studie an Ratten, in der Na_2S eine abnorme Kollagenakkumulation in den kleinen Pulmonalarterien verhinderte [156]. Da verschiedene Kollagene für die Gewebeelastizität der Lunge mitverantwortlich sind [130], ist ein Zusammenhang hier vorstellbar, wenn auch rein spekulativ.

4.1.3 Blutzucker

Da die Leber als essentielles Organ des Glukosehaushalts gleichzeitig Hauptproduktionsort von H_2S ist, überrascht es nicht, dass die beiden Stoffwechselwege interagieren. Einerseits stellten Guan et al. und Pan et al. fest, dass hohe Glukosespiegel in vitro sowohl CSE-Expression als auch H_2S -Produktion reduzieren [48,103]. Auch im Mausmodell konnten Merz et al. eine

Verminderung der CSE-Konzentration in der Leber durch Hyperglykämie feststellen, noch ausgeprägter im Rahmen eines septischen Schocks [88]. Andererseits induziert Schwefelwasserstoff sowohl Glykogenolyse als auch Glukoneogenese [162]. Verschiedene Mechanismen scheinen hierbei beteiligt zu sein, wie die Blockade der Insulinsekretion im Pankreas und eine Modulation der mitochondrialen Biogenese via PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α*) [88,141]. Der höhere Blutzucker in den Wildtyp-Mäusen passt gut zu diesen Erhebungen.

Akute Stressreaktionen wie hier nach Thoraxtrauma gehen mit für die Stressadaptation essentiellen Erhöhungen der Blutglukose einher [9,85], eine Reaktion, die auch am Mausmodell vorbeschrieben ist [50]. Deshalb ist auch hier von einem solchen reaktiven Anstieg auszugehen, was die gemessenen Werte zu einer Momentaufnahme der posttraumatischen Dynamik macht. Der Vergleich der Konzentrationen lässt mutmaßen, dass der Knockout den reaktiven Blutglukoseanstieg bei Stress im vorliegenden Modell unterdrückt. Hierbei können jedoch – neben der oben beschriebenen direkten Wirkung von H₂S – weitere Mechanismen eine Rolle gespielt haben:

Eine mögliche Ursache für die niedrigeren Glukosewerte ist eine gesteigerte glykolytische Aktivität durch die stärkere systemische Inflammationsantwort in der CSE ko-Gruppe [51]. Dieser Effekt wurde von Ostroukhova et al. an Asthmapatienten beobachtet und verschiedenen T-Zell-vermittelten Pfaden zugeschrieben [99].

Weiterhin könnte der Hypoglykämie ein mechanisches Problem zugrunde liegen [51]. Eine überblähte Lunge, die auch für die hohen Compliancewerte der CSE ko-Gruppe verantwortlich sein könnte, geht mit erhöhtem Widerstand im Lungenkreislauf einher. Folge hiervon kann ein Blutstau vor dem rechten Herzen sein, welcher zu einer Minderversorgung der Leber führen [140] und schließlich deren glukoneogenetische Funktion beeinträchtigen würde.

Welche der diskutierten Faktoren im vorliegenden Fall zum Tragen gekommen sind, lässt sich nur mit der gemessenen Blutglukosekonzentration nicht sagen, da keine Differenzierung der beteiligten Stoffwechselwege möglich ist. Die zugrunde liegenden Mechanismen müssten in weiterführenden Studien untersucht werden.

4.2 Interpretation entzündungsrelevanter Signalstoffe

Divergierende Resultate vorgegangener Untersuchungen zum Einfluss Schwefelwasserstoffs auf entzündliche Prozesse wurden in Kapitel 1.2 sowie am Anfang dieses Abschnitts aufgeführt. Die hier erhobenen Werte lassen hingegen eine klare Tendenz erkennen.

4.2.1 Zyto- und Chemokine

Im Lungengewebe der CSE ko-Gruppe war ein signifikanter Anstieg der proinflammatorischen Zytokine IL-18 und IL-1 β , sowie des Chemokins KC zu erkennen, im Plasma von IL-6 sowie der Chemokine KC und MCP-1. Hervorzuheben ist dabei der durch den Knockout stark erhöhte Plasma-IL-6-Spiegel. Dieser Mediator bewirkt die Induktion mehrerer Akute-Phase-Proteine [22] und ist ein verlässlicher Marker für die Schwere eines Traumas [54]. Die gemessenen I κ B α -Werte unterstreichen diese Ergebnisse. Das Protein war in den CSE-defizienten Mäusen in deutlich geringerem Ausmaß nachweisbar, eine stärker ausgeprägte Aktivität von NF- κ B ist also denkbar (siehe Kapitel 2.8.2). Als zentraler Mediator der Immunantwort wird der Faktor beispielsweise von IL-18 und TNF- α induziert und fördert die Transkription, unter anderem der Gene von IL-6, MCP-1 und KC [102].

Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass H₂S durch Einflussnahme auf verschiedene Mediatoren die immunologische Antwort nach Thoraxtrauma moduliert. Darüber hinaus scheint sich dies im vorliegenden Fall hemmend auf die Inflammationsantwort auszuwirken. Dies deckt sich mit vorhergegangenen Funden der eigenen Arbeitsgruppe [146], sowie verschiedenen Untersuchungen, die einen protektiven Effekt des Gases bei Nieren- [87] und Lungenschädigung [36,37], hämorrhagischem Schock [47,91] und nach Ischämie und Reperfusion von Leber [13,66], Lunge [42] und Niere [14,56,138] beschrieben. Gegenteilige Beobachtungen wurden sowohl bei Sepsis als systemische, überschießende immunologische Antwort [77,159,160], als auch bei lokalen entzündlichen Prozessen, z.B. in Lunge [161] oder beim Hinterpfotenödem [10] gemacht. Teilweise wurden sogar dieselben Parameter untersucht (MCP-1 [134,158], IL-6, IL-1 β , TNF- α [158]). Ein Erklärungsansatz für den variierenden Effekt von H₂S ist seine antiinflammatorische Wirkung in niedrigen bis physiologischen

Konzentrationen bei proinflammatorischer Wirkung in hohen Konzentrationen. Eine Dosisabhängigkeit allein wird jedoch den beobachteten Zusammenhängen nicht gerecht. So wurden beispielsweise die untersuchte Spezies und unterschiedliche Organsysteme als Faktoren identifiziert, die Einfluss auf die Wirkung des Gases nehmen [148].

Wie in Kapitel 4.1 beschrieben, ist auch hier zu bedenken, dass aus diesen Daten keine sicheren Erkenntnisse zur Wirkung von H₂S gewonnen werden können. Sämtliche beobachteten Effekte können lediglich dem Knockout der CSE zugeschrieben werden.

Die Rolle der CSE bei entzündlichen Prozessen und Verletzungen der Lunge ist noch nicht ausführlich untersucht. Im Rattenmodell wirkte sie sich sowohl in einem Asthma-, als auch in einem COPD-Modell protektiv aus [26,27]. Seine pharmakologische Blockade hatte hingegen an der Ratte [12], wie an der Maus [134] protektiven Einfluss auf die begleitende Lungenschädigung im Rahmen einer ceruleininduzierten Pankreatitis. Die vorbeschriebenen Untersuchungen wurden jedoch ohne genetischen Knockout und nicht an einem realitätsnahen, beatmeten Modell erhoben. Unter Zuhilfenahme der MICU korrelierten höhere CSE-Konzentrationen bislang mit einer Abschwächung der Lungenschädigung [144,146].

Im vorliegenden Falle einer realitätsnahen intensivmedizinischen Betreuung wirkt sich die CSE inhibitorisch auf die Zytokinantwort aus, auf der lokalen wie auf der systemischen Ebene. Ob der Grund hierfür die Aufrechterhaltung der H₂S-Produktion ist, lässt sich nicht sicher beantworten.

4.2.2 Indikatoren für oxidativen und nitrosativen Stress

ROS und RNS (*reactive nitrogen species*, reaktive Stickstoffspezies) schädigen aufgrund ihrer starken, unspezifischen Reaktivität verschiedenste Biomoleküle und können auf entsprechend unterschiedliche Arten und Weisen nachgewiesen werden. Die immunhistochemisch ermittelte Konzentration von NT ergab keinen Hinweis auf vermehrte Bildung von Peroxynitrit in der Lunge; auch die gemessene VEGF-Expression unterschied sich nicht signifikant zwischen den Versuchsgruppen. Die im Western Blot untersuchte iNOS blieb ebenfalls unbeeinflusst, allerdings war eine signifikant höhere Konzentration der HO-1 im Lungengewebe der CSE ko-Gruppe auszumachen. In früheren Versuchen der Arbeitsgruppe wurde eine vermehrte Expression der HO-1 bei ähnlichem Versuchsaufbau [146] bzw. im Sepsismodell [147] beobachtet und in diesen Fällen durch appliziertes H₂S vermindert. Der Anstieg wurde jeweils der Stressantwort auf das Trauma zugeschrieben. Auch in der vorliegenden Untersuchung war ein traumavermittelter Anstieg der HO-1 zu erwarten [81], der größeren Ausprägung in der CSE ko-Gruppe liegt möglicherweise eine vermehrte Belastung durch oxidativen Stress zugrunde.

Ein weiteres Indiz für oxidativen [2] und nitrosativen [63] Stress ist der Comet Assay, der im Blut der genetisch veränderten Mäuse deutlich mehr DNS-Strangbrüche aufzeigte.

Schließlich wird auch die Expression von NF-κB – und somit von IκBα – durch oxidativen Stress beeinflusst, wie 1991 von Schreck et al. anhand von H₂O₂ erstmals beschrieben [115]. ROS induzieren sowohl die Translokation, als auch die Transkription von NF-κB [24] und setzen zudem diesbezüglich die Wirkung von Zytokinen außer Kraft [113]. Das durch Deletion der CSE erniedrigte IκBα kann also ebenfalls ein Indiz für eine antioxidative Wirkung von H₂S sein.

Es weisen also verschiedene veränderte Parameter auf erhöhten oxidativen Stress in der CSE ko-Gruppe hin; die primär nitrosativen Stress kennzeichnenden Faktoren ergaben hingegen keine signifikanten Ergebnisse. Die Aktivität der CSE scheint also die Wirkung von ROS stärker abgefangen zu haben. H₂S ist in der Lage, die Bildung von ROS zu vermindern, diese selbst zu neutralisieren und durch die Produktion von Glutathion ROS und RNS entgegenzuwirken [133].

Welche Kombination genannter Wirkweisen hier zum Tragen kam und ob für diesen protektiven Effekt überhaupt eine höhere H_2S -Konzentration ursächlich ist, ist mit den vorliegenden Daten jedoch nicht zu ermitteln (siehe Abschnitt 4.1).

4.2.3 Indikatoren für systemische und lokale Hypoxie

Kapitel 3.1 ist zwar zu entnehmen, dass sich der Gasaustausch (PaO_2 und PaO_2/FiO_2) in der WT Gruppe im Verlauf des Versuchs verbesserte, allerdings wiesen beide Gruppen weder Anzeichen einer Hypoxämie auf, noch unterschieden sie sich signifikant voneinander.

Da Lungenkontusionen häufig Gewebseinrisse und -blutungen, Ödeme und somit Atelektasenbildung verursachen [114], muss eine örtlich beschränkte alveoläre Hypoxie im Lungengewebe in Betracht gezogen werden. Auf der lokalen Ebene führte die verminderte CSE-Expression zu einer deutlich erhöhten Expression von HO-1. Zusammen mit der bereits diskutierten supprimierten $I\kappa B\alpha$ -Konzentration als Korrelat einer vermehrten NF- κB -Aktivität kann dies ein Hinweis auf eine in der Knockoutgruppe ausgeprägtere lokale Hypoxie sein. Allerdings ist hierbei zu beachten, dass beide Parameter wenig spezifisch sind, so könnte die vorliegende Konstellation auch Resultat der stärkeren Zytokinantwort sein.

Im Gegensatz dazu wurden in der CSE ko-Gruppe signifikant niedrigere Werte für HIF-1 α gemessen. Der Transkriptionsfaktor gilt als zentraler transkriptionaler Regulator der Adaptionsantwort auf Hypoxie [149]. Durch die Kombination des Knockouts mit einem Thoraxtrauma waren möglicherweise die Kapazitäten der Regulierung durch HIF-1 α erschöpft. Hierdurch kann es zur gemessenen niedrigen Konzentration gekommen sein, was wiederum für den fehlenden VEGF-Ausschlag in der Knockoutgruppe verantwortlich war. Die beiden Faktoren werden unter hypoxischen Bedingungen regelhaft gemeinsam aktiviert [116].

Da HO-1 und NF- κB durch diverse Mechanismen aktiviert werden können, können die niedrigen HIF-1 α -Werte in der Knockoutgruppe jedoch auch Hinweis darauf sein, dass hier keine vermehrte lokale Hypoxie vorlag. In diesem Fall ist die Expression der HO-1 und von NF- κB , wie oben beschrieben, dem oxidativem Stress oder der vermehrten Zytokinausschüttung zuzuschreiben.

4.2.4 Endotheliale Barrierestörung und Gefäßneubildung

In den gemessenen Werten für Albumin und VEGF ergaben sich keine deutlichen Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen, also wurde im vorliegenden Fall weder eine vaskuläre Wachstumsreaktion, noch die Gefäßpermeabilität durch den Knockout nennenswert beeinflusst. Lediglich die Expression von Angiopoietin-1 war in der gesamten Wildtypgruppe unter der Nachweisgrenze und somit in den CSE ko-Tieren erhöht.

Angiopoietin-1 bindet an den in Endothelzellen vorhandenen Tie2-Rezeptor, dessen Aktivierung die Endothelzellhomöostase aufrechterhält und seine Apoptose verhindert [39]. Via Blockade von NF- κ B macht es einen antiinflammatorischen Effekt geltend [65] und schützt zugleich die Endothelbarriere [136]. Als Gegenspieler hierzu wird Angiopoietin-2 durch Entzündung aktiviert [82] und verbessert die Endotheladhäsion sowie dessen Reaktivität auf Zytokine [40]. Es wurde daher lange Zeit als der dynamische und in Akutsituationen relevantere der beiden Parameter gesehen. Jeansson et al. entdeckten allerdings 2011 mittels Knockout, dass Ang-1 bei der Heilung von Geweben nach Verletzung eine tragende Rolle zukommt [64]. Weiterhin stellten Ong et al. fest, dass ALI-Patienten mit höherem Ang-1/Ang-2 Quotienten eher überleben [97].

Ob die vermehrte Proteinexpression von Ang-1 für die ausbleibende Barrierestörung trotz stärkerer Entzündungsaktivität in der CSE ko-Gruppe verantwortlich ist, ist nicht sicher zu beantworten. Eventuelle – durch H₂S-Mangel hervorgerufene – Unregelmäßigkeiten in der Funktion des Endothels konnten im vorliegenden Modell also kompensiert werden, oder kamen überhaupt nicht zustande.

4.2.5 Apoptose

Mit Bcl-XL und Cas-3 wurden zwei Gegenspieler der Apoptoseregulation gemessen. Für keinen der beiden wurden zwischen den Versuchsgruppen signifikante Unterschiede festgestellt.

Die Apoptose ist im Gegensatz zur Nekrose ein kontrollierter Prozess, der auch „programmierter Zelltod“ genannt wird. Sie verläuft nach einem histologisch identifizierbaren, geordneten Muster bei dem die Integrität der Zellmembran erhalten bleibt damit die Bestandteile der Zelle anderen Prozessen zugeführt werden können [71]. Ein Thoraxtrauma, wie hier den Tieren beider Versuchsgruppen zugefügt, führt durch die Zerstörung der Gewebsstruktur zu einer Steigerung der Apoptoserate [78]. Wie in Kapitel 4 erwähnt, ist die Quellenlage bezüglich des Einflusses von Schwefelwasserstoff auf diesen Mechanismus unklar. Eine Dosisabhängigkeit allein ist hierbei als Ursache der Ungewissheit nicht ausreichend; so wurden bei physiologischen (0,1-0,5 mM) [110,153] und bei höheren (5mM Na₂S, 3,66 mM HS⁻) [31,109] H₂S-Konzentrationen pro- [31,153], wie antiapoptotische [109,110] Wirkungen beschrieben. Zu möglichen Wirkmechanismen gibt es ebenfalls unterschiedliche Beobachtungen an verschiedenen Zelltypen. Beispielsweise wurden apoptosehemmende Effekte von Schwefelwasserstoff auf eine Hemmung der Cas-3-Spaltung und der Phosphorylierung der p38-mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK) [109], Bindung an die p65-Untereinheit von NF-κB [117], Aktivierung des Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B- (PI3K/Akt) und extrazellulären signalregulierten Kinase-Pfads (ERK 1/2) [20] und Hemmung der Öffnung von mitochondrialen Permeabilitätstransitionsporen (mPTP), sowie Stabilisierung des Bcl-2-assoziiertes X Protein/B-cell lymphoma 2-Verhältnisses (Bax/Bcl-2) [152] zurückgeführt.

In einem vergleichbaren klinisch relevanten Modell senkte infundiertes Na₂S die Apoptoserate unter das Niveau ohne Thoraxtrauma [146]. Dieser Effekt konnte im vorliegenden Modell eines CSE ko nicht reproduziert werden. Hier ist zudem abermals anzumerken, dass der genetische Knockout nicht gleichbedeutend ist mit dem Fehlen von H₂S, wie bereits in Kapitel 4.1 erläutert.

4.3 Interpretation histomorphologischer Befunde

Die histologische Untersuchung der Lungenpräparate ergab ein signifikant erhöhtes Vorkommen von Dystelektase und Makrophagen bei vorliegendem CSE ko, sowie einen deutlich höheren „Gesamt-Score“ für histologische Schädigung.

Die nach Knockout vermehrte Präsenz von Makrophagen passt sich gut in das Gefüge der in Kapitel 3.2 dargestellten Ergebnisse der Zytokinanalyse ein. Neben ihrer Rolle als Phagozyten kommt Makrophagen in der Entzündungsantwort auch eine Rolle als Signalvermittler zu [43]. So werden sie durch Zytokine wie MCP-1 rekrutiert und aktiviert, setzen aber auch selbst z.B. IL-1, IL-6, TNF- α , MCP-1 frei, wodurch sie ihrerseits die Entzündungsantwort steuern [23]. Eingewanderte Makrophagen sind also als morphologisches Korrelat der in CSE-defizienten Tieren verstärkten Entzündungsaktivität zu werten. Für die – gleichermaßen in die Entzündung eingebundenen – Lymphozyten lässt sich die gleiche Tendenz erkennen, allerdings ohne statistische Signifikanz.

Die erhöhte Dystelektaserate stellt ein weiteres gewebestrukturelles Spiegelbild der untersuchten biochemischen Parameter dar. Stumpfe Thoraxtraumata können A- und Dystelektasen zu Folge haben, die im Fall von Raghavendrants Rattenmodell 24 Stunden nach Trauma am stärksten ausgeprägt waren [107]. Parenchymrisse führen zu Mikrohämmorrhagien, die Entzündungsreaktion zu vermehrter Schleimproduktion. Diese beiden Arten von Gewebeerverdichtung können im Kollaps von Alveolen enden bis hin zum kompletten Ausschluss einzelner Lungenareale vom Gasaustausch – sogenannten Atelektasen [114].

Der weitaus höhere „Gesamt-Score“ in der CSE ko-Gruppe weist zusätzlich kriterienübergreifend auf eine stärkere gewebestrukturelle Veränderung in dieser Gruppe hin. Die Kontrolle der Entzündungsantwort durch die CSE ist somit offenbar lichtmikroskopisch erkennbar, auch wenn der pulmonale Gasaustausch nicht erheblich beeinträchtigt war.

4.4 Reaktion alternativer H₂S-Produktionswege

Wie in Abschnitt 1.2 beschrieben, wird Schwefelwasserstoff endogen durch die drei Enzyme CSE, CBS und 3-MST produziert. CSE und CBS verwenden für diesen Prozess dasselbe Substrat. Das wirft die Frage auf, ob das ohne CSE vermehrt vorliegende Cystein die CBS-Aktivität beeinflusst. Überdies wurde für CBS eine ROS-abhängige Regulation festgestellt [80], was im vorliegenden Modell eine Veränderung bewirken könnte. Es wurde hier allerdings kein Einfluss des CSE ko auf die CBS-Konzentration ersichtlich; eine reaktive Hochregulation des alternativen Produktionsenzym im Lungengewebe blieb also aus. Die Expression sowohl der CSE, als auch der CBS wurde als Teil der zellulären Stressantwort identifiziert [146], für eine Kommunikation untereinander bieten die erhobenen Daten jedoch keinen Anhalt.

4.5 Grenzen der Studie

Auf die generellen Limitationen von Tierstudien am Mausmodell wurde in Kapitel 1.4 eingegangen. Zusätzlich unterliegt unser Ansatz folgenden Einschränkungen.

Da in dieser Studie lediglich ein Zeitraum von bis zu vier Stunden nach Unfallereignis überwacht wurde, kann ein direkter Zusammenhang zwischen hier beobachteten akuten Veränderungen der Entzündungsreaktion und jenen, die mittelfristig zum Multiorganversagen führen, nicht bewiesen werden. Wie in Abschnitt 1.1 beschrieben, kommen die Folgen der Entzündungsreaktion als Todesursache erst ab dem zweiten oder dritten Tag nach Unfallereignis zum Tragen [52]. Dass diese Reaktion dieselbe ist, wie sie hier beobachtet und durch den Knockout beeinflusst wurde, kann mit den vorliegenden Daten nicht belegt werden. Dafür spricht allerdings eine Untersuchung an einem fast identischen Modell, die eine vergleichbare Immunantwort mit nach zwölf Stunden maximaler und anschließend nachlassender Ausprägung feststellte [50].

Auch wenn Maßnahmen wie das induzierte Trauma und die MICU eine weitgehende Realitätsnähe des Studienmodells ermöglichen, ist der zeitliche Ablauf nicht dem eines tatsächlichen Unfallereignisses gleichzusetzen. Eine vorangehende Analgosedierung wird bei Traumapatienten nie möglich sein, ist jedoch am Tiermodell aus ethischen Gründen geboten. So besteht die Möglichkeit, dass die frühe maschinelle Beatmung und Anästhesie kompensatorische Mechanismen der Versuchstiere unterstützt oder beeinträchtigt hat, wie z.B. von Bracht et al. am Schweinemodell beobachtet [16].

Auch wenn der CSE ko nachweislich zu einer geringeren H₂S-Konzentration im Serum führt [154], können seine beobachteten Effekte nicht eindeutig auf variierende Verfügbarkeiten des Gases zurückgeführt werden. Es sei aber erwähnt, dass bislang keine verlässliche Messmethode existiert, um diesen Zusammenhang nachzuweisen [87]. Zudem könnten eventuelle andere Wirkungen der CSE oder ihres Knockouts die Ergebnisse beeinflusst haben. Unter Berücksichtigung der in Abschnitt 1.2 beschriebenen Störvariablen anderer Methoden erscheint die Verwendung des Knockouts für die vorliegende Untersuchung jedoch sinnvoll.

4.6 Schlussfolgerungen aus der Arbeit

Lungenfunktion und Gasaustausch blieben durch den Knockout unbeeinträchtigt. Er verstärkte aber die Entzündung – sowohl auf lokaler, als auch auf systemischer Ebene. Dies drückte sich durch vermehrte Zytokinproduktion, verringerte I κ B α -Expression sowie erhöhten oxidativen Stress aus. Es wurden weder eine auf Entzündungsprozesse hinweisende endotheliale Barrierestörung, noch eine erhöhte Apoptoserate festgestellt.

Hieraus wird erkennbar, dass der CSE auch unter klinisch relevanten Bedingungen eine erhebliche Rolle in der entzündlichen Stressantwort zukommen dürfte. Maßgeblich sollte dabei ihr inhibitorischer Einfluss auf die Immunantwort sein. Das könnte sie folglich neben dem Bereich akuter Traumata auch für die Forschung an Krankheiten wie COPD oder Sepsis interessant machen, für deren Heilung die Entzündungshemmung von Bedeutung ist. Wenn auch bislang mit H₂S-abgebenden Mitteln wie GYY4137 und AP39 keine ausreichend wirksame Applikationsform gefunden wurde, bietet das Gas weiterhin Potential für weiterführende Untersuchungen.

Zudem konnte nach genetischem Knockout der CSE ein Effekt auf die Blutglukose beobachtet werden. Dies wird zukünftig bei Erwägung möglicher pharmakologischer Angriffspunkte rund um das Gas beachtet werden müssen, wenn auch die zugrundeliegenden Mechanismen mit den vorliegenden Daten nicht ermittelt werden können.

5 Zusammenfassung

Thoraxtraumata können vor allem im Rahmen von Polytraumata akut lebensbedrohlich sein – oder mittelfristig durch eine überschießende systemische Entzündungsreaktion Organschäden verursachen. Der Gasotransmitter Schwefelwasserstoff (H_2S) nimmt Einfluss auf diese Immunantwort, seine Rolle nach Thoraxtrauma ist jedoch in der Literatur bislang umstritten. Zudem gestaltet sich die Untersuchung seiner Wirkung schwierig, da die Messung seiner Konzentration im Blut bislang unzuverlässig ist und bei seiner externen Zugabe bzw. medikamentösen Blockade Nebenwirkungen in Kauf genommen werden müssen. In der vorliegenden Versuchsanordnung wird daher durch Verwendung eines genetischen Knockouts die Bedeutung des H_2S -produzierenden Enzyms Cystathionin- γ -Lyase (CSE) – als wichtigstes Enzym der endogenen H_2S -Produktion in der Lunge – nach Thoraxtrauma am Mausmodell untersucht.

Hierzu wurden acht C57Bl6/J Wildtyp-Mäuse der gleichen Anzahl Mäuse mit genetisch deaktivierter CSE gegenübergestellt. Beide Gruppen wurden einem Thoraxtrauma unterzogen und für vier Stunden unter intensivstationären Bedingungen versorgt. Anschließend erfolgten Organentnahme und biochemische, labortechnische und histologische Untersuchung des gewonnenen Organmaterials.

Anhand von (Immun-) Histologie, Zytokinanalysen und Indikatoren für oxidativen und nitrosativen Stress konnte ein entzündungshemmender Einfluss der CSE festgestellt werden – sowohl lokal durch Gewebsuntersuchungen der Lunge, als auch systemisch durch Blutanalysen. Der genetische Knockout führte zudem zu niedrigeren Blutglukosewerten, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen aufgrund des anderweitig gesetzten Studienschwerpunkts offenbleiben müssen. Lungenfunktion und Gasaustausch hingegen blieben im Wesentlichen unbeeinflusst, auch ergab sich kein Anhalt für signifikante Auswirkungen auf Endothelfunktion und Apoptoserate. Die Expression der Cystathionin- β -Synthase als alternatives Produktionsenzym von H_2S blieb unverändert.

Diese Ergebnisse bestätigen die Bedeutung der CSE für die akute Stressreaktion nach Thoraxtrauma unter klinisch relevanten Bedingungen. Sie kommt damit als Stellschraube zur Kontrolle der Inflammationsantwort bei akuten wie chronischen Entzündungsprozessen in Frage.

6 Literaturverzeichnis

1. Abe K, Kimura H: The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 16: 1066-1071 (1996)
2. Anderson D, Yu T, Schmezer P: An investigation of the DNA-damaging ability of benzene and its metabolites in human lymphocytes, using the comet assay. *Environmental and molecular mutagenesis*, 26: 305-314 (1995)
3. Ang S F, Moochhala S M, Bhatia M: Hydrogen sulfide promotes transient receptor potential vanilloid 1-mediated neurogenic inflammation in polymicrobial sepsis. *Critical Care Medicine*, 38: 619-628 (2010)
4. Ang S F, Sio S W, Moochhala S M, MacAry P A, Bhatia M: Hydrogen sulfide upregulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E metabolite in sepsis-evoked acute lung injury via transient receptor potential vanilloid type 1 channel activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 187: 4778-4787 (2011)
5. Arnold I M, Dufresne R M, Alleyne B C, Stuart P J: Health implication of occupational exposures to hydrogen sulfide. *Journal of occupational medicine.: official publication of the Industrial Medical Association*, 27: 373-376 (1985)
6. Aslami H, Heinen A, Roelofs J J, Zuurbier C J, Schultz M J, Juffermans N P: Suspended animation inducer hydrogen sulfide is protective in an in vivo model of ventilator-induced lung injury. *Intensive care medicine*, 36: 1946-1952 (2010)
7. Barkett M, Gilmore T D: Control of apoptosis by Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene*, 18: 6910-6924 (1999)
8. Baskar R, Li L, Moore P K: Hydrogen sulfide-induces DNA damage and changes in apoptotic gene expression in human lung fibroblast cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21: 247-255 (2007)
9. Bernard C: *Lecons sur les Phenomenes de la Vie Communs aux Animaux et aux Vegetaux*. JB Bailliere et fils, S. 21-140 (1878)
10. Bhatia M, Sidhapuriwala J, Moochhala S M, Moore P K: Hydrogen sulphide is a mediator of carrageenan-induced hindpaw oedema in the rat. *British journal of pharmacology*, 145: 141-144 (2005)
11. Bhatia M: Hydrogen sulfide as a vasodilator. *IUBMB life*, 57: 603-606 (2005)
12. Bhatia M, Wong F L, Fu D, Lau H Y, Moochhala S M, Moore P K: Role of hydrogen sulfide in acute pancreatitis and associated lung injury. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19: 623-625 (2005)

13. Bos E M, Snijder P M, Jekel H, Weij M, Leemans J C, van Dijk M C, Hillebrands J, Lisman T, van Goor H, Leuvenink H G: Beneficial effects of gaseous hydrogen sulfide in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Transplant International*, 25: 897-908 (2012)
14. Bos E M, Leuvenink H G, Snijder P M, Kloosterhuis N J, Hillebrands J L, Leemans J C, Florquin S, van Goor H: Hydrogen sulfide-induced hypometabolism prevents renal ischemia/reperfusion injury. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20: 1901-1905 (2009)
15. Bos E M, Wang R, Snijder P M, Boersema M, Damman J, Fu M, Moser J, Hillebrands J L, Ploeg R J, Yang G, Leuvenink H G, van Goor H: Cystathionine gamma-lyase protects against renal ischemia/reperfusion by modulating oxidative stress. *Journal of the American Society of Nephrology*, 24: 759-770 (2013)
16. Bracht H, Scheuerle A, Groger M, Hauser B, Matallo J, McCook O, Seifritz A, Wachter U, Vogt J A, Asfar P, Matejovic M, Moller P, Calzia E, Szabo C, Stahl W, Hoppe K, Stahl B, Lampl L, Georgieff M, Wagner F, Radermacher P, Simon F: Effects of intravenous sulfide during resuscitated porcine hemorrhagic shock*. *Critical Care Medicine*, 40: 2157-2167 (2012)
17. Brismar B, Hedenstierna G, Lundquist H, Strandberg A, Svensson L, Tokics L: Pulmonary densities during anesthesia with muscular relaxation--a proposal of atelectasis. *Anesthesiology*, 62: 422-428 (1985)
18. Brown R, Woolcock A J, Vincent N J, Macklem P T: Physiological effects of experimental airway obstruction with beads. *Journal of applied physiology*, 27: 328-335 (1969)
19. Burnett G, Marcotte P, Walsh C: Mechanism-based inactivation of pig heart L-alanine transaminase by L-propargylglycine. Half-site reactivity. *The Journal of biological chemistry*, 255: 3487-3491 (1980)
20. Cai W, Wang M, Ju L, Wang C, Zhu Y: Hydrogen sulfide induces human colon cancer cell proliferation: role of Akt, ERK and p21. *Cell biology international*, 34: 565-572 (2010)
21. Cao Y, Adhikari S, Ang A D, Moore P K, Bhatia M: Mechanism of induction of pancreatic acinar cell apoptosis by hydrogen sulfide. *American journal of physiology. Cell physiology*, 291: C503-C510 (2006)
22. Castell J V, Gómez-Lechón M J, David M, Hirano T, Kishimoto T, Heinrich P C: Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. *FEBS letters*, 232: 347-350 (1988)
23. Cavillon J: Cytokines and macrophages. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 48: 445-453 (1994)
24. Cazals V, Nabeyrat E, Corroyer S, de Keyzer Y, Clement A: Role for NF- κ B in mediating the effects of hyperoxia on IGF-binding protein 2 promoter activity in

- lung alveolar epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1448: 349-362 (1999)
25. Chen K Y, Morris J C: Kinetics of oxidation of aqueous sulfide by oxygen. *Environmental science & technology*, 6: 529-537 (1972)
26. Chen Y, Wang P, Wang X, He Y, Yao W, Qi Y, Tang C: Involvement of endogenous hydrogen sulfide in cigarette smoke-induced changes in airway responsiveness and inflammation of rat lung. *Cytokine*, 53: 334-341 (2011)
27. Chen Y, Wu R, Geng B, Qi Y, Wang P, Yao W, Tang C: Endogenous hydrogen sulfide reduces airway inflammation and remodeling in a rat model of asthma. *Cytokine*, 45: 117-123 (2009)
28. Cheng E H, Levine B, Boise L H, Thompson C B, Hardwick J M: Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-XL. *Nature*, 379: 554-556 (1996)
29. Cheng Y, Ndisang J F, Tang G, Cao K, Wang R: Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 287: H2316-H2323 (2004)
30. Crawhall J C: A review of the clinical presentation and laboratory findings in two uncommon hereditary disorders of sulfur amino acid metabolism, beta-mercaptolactate cysteine disulfideuria and sulfite oxidase deficiency. *Clinical biochemistry*, 18: 139-142 (1985)
31. Deplancke B, Gaskins H R: Hydrogen sulfide induces serum-independent cell cycle entry in nontransformed rat intestinal epithelial cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17: 1310-1312 (2003)
32. Elrod J W, Calvert J W, Morrison J, Doeller J E, Kraus D W, Tao L, Jiao X, Scalia R, Kiss L, Szabo C, Kimura H, Chow C W, Lefer D J: Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 15560-15565 (2007)
33. Eltzschig H K, Carmeliet P: Hypoxia and inflammation. *The New England journal of medicine*, 364: 656-665 (2011)
34. Endemann D H, Schiffrin E L: Endothelial dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15: 1983-1992 (2004)
35. Esechie A, Enkhbaatar P, Traber D L, Jonkam C, Lange M, Hamahata A, Djukom C, Whorton E B, Hawkins H K, Traber L D: Beneficial effect of a hydrogen sulphide donor (sodium sulphide) in an ovine model of burn-and smoke-induced acute lung injury. *British journal of pharmacology*, 158: 1442-1453 (2009)
36. Esechie A, Kiss L, Olah G, Horvath E M, Hawkins H, Szabo C, Traber D L: Protective effect of hydrogen sulfide in a murine model of acute lung injury induced

- by combined burn and smoke inhalation. *Clinical science (London, England : 1979)*, 115: 91-97 (2008)
37. Faller S, Ryter S W, Choi A M, Loop T, Schmidt R, Hoetzel A: Inhaled hydrogen sulfide protects against ventilator-induced lung injury. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 113: 104-115 (2010)
38. Faller S, Zimmermann K K, Strosing K M, Engelstaedter H, Buerkle H, Schmidt R, Spassov S G, Hoetzel A: Inhaled hydrogen sulfide protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Medical gas research*, 2: 26 (2012)
39. Fiedler U, Augustin H G: Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation. *Trends in immunology*, 27: 552-558 (2006)
40. Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, Grunow V, Koidl S, Thurston G, Gale N W, Witzenrath M, Rosseau S, Suttorp N: Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF- α and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nature medicine*, 12: 235-239 (2006)
41. Francis R C, Vaporidi K, Bloch K D, Ichinose F, Zapol W M: Protective and detrimental effects of sodium sulfide and hydrogen sulfide in murine ventilator-induced lung injury. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 115: 1012-1021 (2011)
42. Fu Z, Liu X, Geng B, Fang L, Tang C: Hydrogen sulfide protects rat lung from ischemia-reperfusion injury. *Life Sciences*, 82: 1196-1202 (2008)
43. Fujiwara N, Kobayashi K: Macrophages in inflammation. *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy*, 4: 281-286 (2005)
44. Fukuyama N, Takebayashi Y, Hida M, Ishida H, Ichimori K, Nakazawa H: Clinical evidence of peroxynitrite formation in chronic renal failure patients with septic shock. *Free Radical Biology and Medicine*, 22: 771-774 (1997)
45. Furne J, Saeed A, Levitt M D: Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 295: R1479-R1485 (2008)
46. Gaillard M, HervÉ C, Mandin L, Raynaud P: Mortality prognostic factors in chest injury. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 30: 93-96 (1990)
47. Ganster F, Burban M, de la Bourdonnaye M, Fizanne L, Douay O, Loufrani L, Mercat A, Cales P, Radermacher P, Henrion D, Asfar P, Meziani F: Effects of hydrogen sulfide on hemodynamics, inflammatory response and oxidative stress during resuscitated hemorrhagic shock in rats. *Critical Care (London, England)*, 14: R165 (2010)

48. Guan Q, Liu W, Liu Y, Fan Y, Wang X, Yu C, Zhang Y, Wang S, Liu J, Zhao J: High glucose induces the release of endothelin-1 through the inhibition of hydrogen sulfide production in HUVECs. *International journal of molecular medicine*, 35: 810-814 (2015)
49. Gwilz. Vector diagram of mouse lying on its back:
[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vector diagram of mouse lying on its back.svg?uselang=de](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vector_diagram_of_mouse_lying_on_its_back.svg?uselang=de) (23.07.2019)
50. 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 (Augusta, Ga.)*, 43: 140-147 (2015)
51. Hartmann C, Hafner S, Scheuerle A, Möller P, Huber-Lang M, Jung B, Nußbaum B, McCook O, Gröger M, Wagner F: The role of cystathionine- γ -lyase in blunt chest trauma in cigarette smoke exposed mice. *Shock: Injury, Inflammation, and Sepsis: Laboratory and Clinical Approaches*, 47: 491-499 (2017)
52. Heckbert S R, Vedder N B, Hoffman W, Winn R K, Hudson L D, Jurkovich G J, Copass M K, Harlan J M, Rice C L, Maier R V: Outcome after hemorrhagic shock in trauma patients. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 45: 545-549 (1998)
53. Henry T D, Annex B H, McKendall G R, Azrin M A, Lopez J J, Giordano F J, Shah P K, Willerson J T, Benza R L, Berman D S, Gibson C M, Bajamonde A, Rundle A C, Fine J, McCluskey E R, VIVA Investigators: The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation*, 107: 1359-1365 (2003)
54. Hoch R C, Rodriguez R, Manning T, Bishop M, Mead P, Shoemaker W C, Abraham E: Effects of accidental trauma on cytokine and endotoxin production. *Critical Care Medicine*, 21: 839-845 (1993)
55. Hoff S J, Shotts S D, Eddy V A, Morris J A, Jr: Outcome of isolated pulmonary contusion in blunt trauma patients. *The American Surgeon*, 60: 138-142 (1994)
56. Hosgood S, Nicholson M: Hydrogen sulphide ameliorates ischaemia–reperfusion injury in an experimental model of non-heart-beating donor kidney transplantation. *British Journal of Surgery*, 97: 202-209 (2010)
57. Hosoki R, Matsuki N, Kimura H: The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochemical and biophysical research communications*, 237: 527-531 (1997)
58. Hu L F, Lu M, Wu Z Y, Wong P T, Bian J S: Hydrogen sulfide inhibits rotenone-induced apoptosis via preservation of mitochondrial function. *Molecular pharmacology*, 75: 27-34 (2009)

59. Huang Y Q, Sauthoff H, Herscovici P, Pipiya T, Cheng J, Heitner S, Szentirmai O, Carter B, Hay J G: Angiopoietin-1 increases survival and reduces the development of lung edema induced by endotoxin administration in a murine model of acute lung injury. *Critical Care Medicine*, 36: 262-267 (2008)
60. Hughes M N, Centelles M N, Moore K P: Making and working with hydrogen sulfide: the chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: a review. *Free Radical Biology and Medicine*, 47: 1346-1353 (2009)
61. Inthorn D, Huf R: Das Thoraxtrauma beim Mehrfachverletzten. *AINS-Anästhesiologie · Intensivmedizin · Notfallmedizin · Schmerztherapie*, 27: 498-501 (1992)
62. Ishii I, Akahoshi N, Yu X N, Kobayashi Y, Namekata K, Komaki G, Kimura H: Murine cystathionine gamma-lyase: complete cDNA and genomic sequences, promoter activity, tissue distribution and developmental expression. *The Biochemical journal*, 381: 113-123 (2004)
63. Jaiswal M, LaRusso N F, Burgart L J, Gores G J: Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. *Cancer research*, 60: 184-190 (2000)
64. Jeansson M, Gawlik A, Anderson G, Li C, Kerjaschki D, Henkelman M, Quaggin S E: Angiopoietin-1 is essential in mouse vasculature during development and in response to injury. *The Journal of clinical investigation*, 121: 2278-2289 (2011)
65. Jeon B H, Khanday F, Deshpande S, Haile A, Ozaki M, Irani K: Tie-ing the antiinflammatory effect of angiopoietin-1 to inhibition of NF-kappaB. *Circulation research*, 92: 586-588 (2003)
66. Jha S, Calvert J W, Duranski M R, Ramachandran A, Lefer D J: Hydrogen sulfide attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury: role of antioxidant and antiapoptotic signaling. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 295: H801-H806 (2008)
67. Kaltschmidt B, Kaltschmidt C, Hofmann T G, Hehner S P, Dröge W, Schmitz M L: The pro-or anti-apoptotic function of NF-κB is determined by the nature of the apoptotic stimulus. *The FEBS Journal*, 267: 3828-3835 (2000)
68. Kimura H: Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor. *Biochemical and biophysical research communications*, 267: 129-133 (2000)
69. Knöferl M W, Liener U C, Seitz D H, Perl M, Brückner 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)

70. Kohn H: Zur Histologie der indurierenden fibrinösen Pneumonie. Munch Med Woch, 3: 42-45 (1893)
71. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN: Cell Injury, Cell Death, and Adaptations. In: Saunders Elsevier (Hrsg) Robbins Basic Pathology 8th Edition, S. 6-7 (2007)
72. Laemmli U K: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685 (1970)
73. Lavrik I N, Golks A, Krammer P H: Caspases: pharmacological manipulation of cell death. The Journal of clinical investigation, 115: 2665-2672 (2005)
74. Lefer D J: A new gaseous signaling molecule emerges: cardioprotective role of hydrogen sulfide. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104: 17907-17908 (2007)
75. Li L, Salto-Tellez M, Tan C, Whiteman M, Moore P K: GYY4137, a novel hydrogen sulfide-releasing molecule, protects against endotoxic shock in the rat. Free Radical Biology and Medicine, 47: 103-113 (2009)
76. Li T, Zhao B, Wang C, Wang H, Liu Z, Li W, Jin H, Tang C, Du J: Regulatory effects of hydrogen sulfide on IL-6, IL-8 and IL-10 levels in the plasma and pulmonary tissue of rats with acute lung injury. Experimental biology and medicine, 233: 1081-1087 (2008)
77. Li L, Bhatia M, Zhu Y Z, Zhu Y C, Ramnath R D, Wang Z J, Anuar F B, Whiteman M, Salto-Tellez M, Moore P K: Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 19: 1196-1198 (2005)
78. Liener U C, Knöferl M W, Sträter J, Barth T F, Pauser E, Nüssler A K, Kinzl L, Brückner U B, Gebhard F: Induction of apoptosis following blunt chest trauma. Shock, 20: 511-516 (2003)
79. Liu F, Chen D D, Sun X, Xie H H, Yuan H, Jia W, Chen A F: Hydrogen sulfide improves wound healing via restoration of endothelial progenitor cell functions and activation of angiotensin-1 in type 2 diabetes. Diabetes, 63: 1763-1778 (2014)
80. Maclean K N, Janošik M, Kraus E, Kožich V, Allen R H, Raab B K, Kraus J P: Cystathionine β -synthase is coordinately regulated with proliferation through a redox-sensitive mechanism in cultured human cells and *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of cellular physiology, 192: 81-92 (2002)
81. Maines M D: Heme oxygenase: clinical applications and functions. CRC Press, S. 156-159 (1992)

82. Mandriota S J, Pepper M S: Regulation of angiopoietin-2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia. *Circulation research*, 83: 852-859 (1998)
83. Marcotte P, Walsh C: Vinylglycine and propargylglycine: complementary suicide substrates for L-amino acid oxidase and D-amino acid oxidase. *Biochemistry*, 15: 3070-3076 (1976)
84. Mariggio M, Minunno V, Riccardi S, Santacroce R, Rinaldis P D, Fumarulo R: Sulfide enhancement of PMN apoptosis. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 20: 399-408 (1998)
85. Marik P E, Bellomo R: Stress hyperglycemia: an essential survival response! *Critical care*, 17: 305 (2013)
86. Matute-Bello G, Downey G, Moore B B, Groshong S D, Matthay M A, Slutsky A S, Kuebler W M: An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 44: 725-738 (2011)
87. McCook O, Radermacher P, Volani C, Asfar P, Ignatius A, Kemmler J, Moller P, Szabo C, Whiteman M, Wood M E, Wang R, Georgieff M, Wachter U: H₂S during circulatory shock: some unresolved questions. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*, 41: 48-61 (2014)
88. Merz T, Vogt J A, Wachter U, Calzia E, Szabo C, Wang R, Radermacher P, McCook O: Impact of hyperglycemia on cystathionine- γ -lyase expression during resuscitated murine septic shock. *Intensive care medicine experimental*, 5: 30 (2017)
89. Minamishima S, Bougaki M, Sips P Y, Yu J D, Minamishima Y A, Elrod J W, Lefer D J, Bloch K D, Ichinose F: Hydrogen sulfide improves survival after cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation via a nitric oxide synthase 3-dependent mechanism in mice. *Circulation*, 120: 888-896 (2009)
90. Mok Y P, Atan M, Bin M S, Ping C Y, Jing W Z, Bhatia M, Mochhala S, Moore P K: Role of hydrogen sulphide in haemorrhagic shock in the rat: protective effect of inhibitors of hydrogen sulphide biosynthesis. *British journal of pharmacology*, 143: 881-889 (2004)
91. Morrison M L, Blackwood J E, Lockett S L, Iwata A, Winn R K, Roth M B: Surviving blood loss using hydrogen sulfide. *The Journal of trauma*, 65: 183-188 (2008)
92. Nagahara N, Ito T, Kitamura H, Nishino T: Tissue and subcellular distribution of mercaptopyruvate sulfurtransferase in the rat: confocal laser fluorescence and immunoelectron microscopic studies combined with biochemical analysis. *Histochemistry and cell biology*, 110: 243-250 (1998)

93. Namati E, Thiesse J, de Ryk J, McLennan G: Alveolar dynamics during respiration: are the pores of Kohn a pathway to recruitment? *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 38: 572-578 (2008)
94. Nathan C: Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *The Journal of clinical investigation*, 100: 2417-2423 (1997)
95. Obertacke U, Redl H, Schlag G, Schmit-Neuerburg K: Lokale und systemische Reaktionen nach Lungenkontusion - Eine experimentelle und klinische Studie. Berlin; New York: Springer-Verlag, S. 65-67 (1994)
96. O'Donnell D E, Laveneziana P: The clinical importance of dynamic lung hyperinflation in COPD. *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 3: 219-232 (2006)
97. Ong T, McClintock D E, Kallet R H, Ware L B, Matthay M A, Liu K D: Ratio of angiopoietin-2 to angiopoietin-1 as a predictor of mortality in acute lung injury patients. *Critical Care Medicine*, 38: 1845-1851 (2010)
98. Ostling O, Johanson K J: Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 123: 291-298 (1984)
99. Ostroukhova M, Goplen N, Karim M Z, Michalec L, Guo L, Liang Q, Alam R: The role of low-level lactate production in airway inflammation in asthma. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 302: L300-L307 (2011)
100. Otterbein L E, Soares M P, Yamashita K, Bach F H: Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends in immunology*, 24: 449-455 (2003)
101. Pacher P, Obrosova I G, Mabley J G, Szabó C: Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications. Emerging new therapeutical strategies. *Current medicinal chemistry*, 12: 267-275 (2005)
102. Pahl H L: Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene*, 18: 6853 (1999)
103. Pan Z, Wang H, Liu Y, Yu C, Zhang Y, Chen J, Wang X, Guan Q: Involvement of CSE/H 2 S in high glucose induced aberrant secretion of adipokines in 3T3-L1 adipocytes. *Lipids in health and disease*, 13: 155 (2014)
104. Papapetropoulos A, Pyriochou A, Altaany Z, Yang G, Marazioti A, Zhou Z, Jeschke M G, Branski L K, Herndon D N, Wang R, Szabo C: Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 21972-21977 (2009)
105. Pinilla J: Acute respiratory failure in severe blunt chest trauma. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 22: 221-226 (1982)

106. Porokhya M, Abramochkin D, Abramov A, Kuzmin V, Sukhova G: Inotropic effects of gaseous transmitters in isolated rat heart preparation. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 153: 856-858 (2012)
107. Raghavendran K, Davidson B A, Helinski J D, Marschke C J, Manderscheid P, Woytash J A, Notter R H, Knight P R: A rat model for isolated bilateral lung contusion from blunt chest trauma. *Anesthesia and Analgesia*, 101: 1482-1489 (2005)
108. Richardson J D, Adams L, Flint L M: Selective management of flail chest and pulmonary contusion. *Annals of Surgery*, 196: 481-487 (1982)
109. Rinaldi L, Gobbi G, Pambianco M, Micheloni C, Mirandola P, Vitale M: Hydrogen sulfide prevents apoptosis of human PMN via inhibition of p38 and caspase 3. *Laboratory investigation*, 86: 391-397 (2006)
110. Rose P, Moore P K, Ming S H, Nam O C, Armstrong J S, Whiteman M: Hydrogen sulfide protects colon cancer cells from chemopreventative agent beta-phenylethyl isothiocyanate induced apoptosis. *World journal of gastroenterology*, 11: 3990-3997 (2005)
111. Saito J, Zhang Q, Hui C, Macedo P, Gibeon D, Menzies-Gow A, Bhavsar P K, Chung K F: Sputum hydrogen sulfide as a novel biomarker of obstructive neutrophilic asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 131: 232-234 (2013)
112. Salvesen G S: Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows. *Cell death and differentiation*, 9: 3-5 (2002)
113. Sappey C, Legrand-Poels S, Best-Belpomme M, Favier A, Rentier B, Piette J: Stimulation of glutathione peroxidase activity decreases HIV type 1 activation after oxidative stress. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 10: 1451-1461 (1994)
114. Sattler S, Maier R V: Pulmonary contusion. *Thoracic Trauma and Critical Care*, Springer, S. 235-245 (2002)
115. Schreck R, Rieber P, Baeuerle P A: Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *The EMBO journal*, 10: 2247-2258 (1991)
116. Semenza G L: Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 15: 551-578 (1999)
117. Sen N, Paul B D, Gadalla M M, Mustafa A K, Sen T, Xu R, Kim S, Snyder S H: Hydrogen sulfide-linked sulfhydration of NF- κ B mediates its antiapoptotic actions. *Molecular cell*, 45: 13-24 (2012)
118. Shah C V, Localio A R, Lanken P N, Kahn J M, Bellamy S, Gallop R, Finkel B, Gracias V H, Fuchs B D, Christie J D: The impact of development of acute lung

- injury on hospital mortality in critically ill trauma patients. *Critical Care Medicine*, 36: 2309-2315 (2008)
119. Shibuya N, Mikami Y, Kimura Y, Nagahara N, Kimura H: Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide. *Journal of Biochemistry*, 146: 623-626 (2009)
120. Shibuya N, Tanaka M, Yoshida M, Ogasawara Y, Togawa T, Ishii K, Kimura H: 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxidants & redox signaling*, 11: 703-714 (2009)
121. 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)
122. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E: Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 359: 843-845 (1992)
123. Sidhapuriwala J N, Ng S W, Bhatia M: Effects of hydrogen sulfide on inflammation in caerulein-induced acute pancreatitis. *Journal of inflammation*, 6: 35 (2009)
124. Singh N P, McCoy M T, Tice R R, Schneider E L: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, 175: 184-191 (1988)
125. Singh S, Padovani D, Leslie R A, Chiku T, Banerjee R: Relative contributions of cystathionine beta-synthase and gamma-cystathionase to H₂S biogenesis via alternative trans-sulfuration reactions. *The Journal of biological chemistry*, 284: 22457-22466 (2009)
126. Song Z J, Ng M Y, Lee Z, Dai W, Hagen T, Moore P K, Huang D, Deng L, Tan C: Hydrogen sulfide donors in research and drug development. *MedChemComm*, 5: 557-570 (2014)
127. Speit G, Hartmann A: The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. *Methods in Molecular Biology*, 291: 85-95 (2005)
128. Statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland: <https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400157004.pdf> (06.03.2018)
129. Stellin G: Survival in trauma victims with pulmonary contusion. *The American Surgeon*, 57: 780-784 (1991)
130. Suki B, Ito S, Stamenovic D, Lutchen K R, Ingenito E P: Biomechanics of the lung parenchyma: critical roles of collagen and mechanical forces. *Journal of applied physiology*, 98: 1892-1899 (2005)

131. Swan K W, Song B M, Chen A L, Chen T J, Chan R A, Guidry B T, Katakam P V G, Kerut E K, Giles T D, Kadowitz P J: Analysis of decreases in systemic arterial pressure and heart rate in response to the hydrogen sulfide donor sodium sulfide. *American journal of physiology.Heart and circulatory physiology*, 313: H732-H743 (2017)
132. Szabo C: Gaseotransmitters: new frontiers for translational science. *Science translational medicine*, 2: 59ps54 (2010)
133. Szabo C: Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nature reviews. Drug discovery*, 6: 917-935 (2007)
134. Tamizhselvi R, Moore P K, Bhatia M: Inhibition of hydrogen sulfide synthesis attenuates chemokine production and protects mice against acute pancreatitis and associated lung injury. *Pancreas*, 36: e24-e31 (2008)
135. Tanizawa K: Production of H₂S by 3-mercaptopyruvate sulphurtransferase. *Journal of Biochemistry*, 149: 357-359 (2011)
136. Thurston G, Rudge J S, Ioffe E, Zhou H, Ross L, Croll S D, Glazer N, Holash J, McDonald D M, Yancopoulos G D: Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nature medicine*, 6: 460-463 (2000)
137. Tokuda K, Kida K, Marutani E, Crimi E, Bougaki M, Khatri A, Kimura H, Ichinose F: Inhaled hydrogen sulfide prevents endotoxin-induced systemic inflammation and improves survival by altering sulfide metabolism in mice. *Antioxidants & redox signaling*, 17: 11-21 (2012)
138. Tripatara P, Patel N S, Collino M, Gallicchio M, Kieswich J, Castiglia S, Benetti E, Stewart K N, Brown P A, Yaqoob M M: Generation of endogenous hydrogen sulfide by cystathionine γ -lyase limits renal ischemia/reperfusion injury and dysfunction. *Laboratory investigation*, 88: 1038-1048 (2008)
139. Trupka A, Nast-Kolb D, Schweiberer L: Blunt chest trauma. *Der Unfallchirurg*, 101: 244-258 (1998)
140. Ulbricht J: Hypoxemic Fatty Liver in Overloading of the Right Heart, especially by Pulmonary Emphysema. *Acta Hepato-Splenologica*, 11: 231-240 (1964)
141. Untereiner A, Wu L: Hydrogen sulfide and glucose homeostasis: a tale of sweet and the stink. *Antioxidants & Redox Signaling*, 28: 1463-1482 (2017)
142. Vohra P K, Hoepfner L H, Sagar G, Dutta S K, Misra S, Hubmayr R D, Mukhopadhyay D: Dopamine inhibits pulmonary edema through the VEGF-VEGFR2 axis in a murine model of acute lung injury. *American journal of physiology.Lung cellular and molecular physiology*, 302: L185-L192 (2012)

143. Volpato G P, Searles R, Yu B, Scherrer-Crosbie M, Bloch K D, Ichinose F, Zapol W M: Inhaled hydrogen sulfide: a rapidly reversible inhibitor of cardiac and metabolic function in the mouse. *Anesthesiology*, 108: 659-668 (2008)
144. Wagner K, Gröger M, McCook O, Scheuerle A, Asfar P, Stahl B, Huber-Lang M, Ignatius A, Jung B, Duechs M: Blunt chest trauma in mice after cigarette smoke-exposure: effects of mechanical ventilation with 100% O₂. *PloS one*, 10: e0132810 (2015)
145. Wagner F, Asfar P, Calzia E, Radermacher P, Szabo C: Bench-to-bedside review: Hydrogen sulfide--the third gaseous transmitter: applications for critical care. *Critical Care (London, England)*, 13: 213 (2009)
146. Wagner F, Scheuerle A, Weber S, Stahl B, McCook O, 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 Na₂S after blunt chest trauma-induced lung contusion in mice. *The Journal of trauma*, 71: 1659-1667 (2011)
147. Wagner F, Wagner K, Weber S, Stahl B, Knoferl M W, Huber-Lang M, Seitz D H, Asfar P, Calzia E, Senftleben U, Gebhard F, Georgieff M, Radermacher P, Hysa V: Inflammatory effects of hypothermia and inhaled H₂S during resuscitated, hyperdynamic murine septic shock. *Shock (Augusta, Ga.)*, 35: 396-402 (2011)
148. Wang R: Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiological Reviews*, 92: 791-896 (2012)
149. Wang G L, Jiang B H, Rue E A, Semenza G L: Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 5510-5514 (1995)
150. Waydhas C, Nast-Kolb D, Trupka A, Jochum M, Schweiberer L: Die Bedeutung des haemorrhagisch-traumatischen Schocks und der Thoraxverletzung fuer die Prognose nach Polytrauma. *Hefte zur Unfallheilkunde*, 212: 104 (1990)
151. Wurm S, Röse M, von Rüden C, Woltmann A, Bühren V: Das schwere Polytrauma mit einem ISS \geq 50. *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie*, 150: 296-301 (2012)
152. Yang L, Lin J, Zhao X, Yao L, Ding Q, Chai W: Exogenous hydrogen sulfide restores cardiac function after trauma-hemorrhagic shock by inhibiting mitochondrial apoptosis. *Int J Clin Exp Med*, 9: 5563-5573 (2016)
153. Yang G, Sun X, Wang R: Hydrogen sulfide-induced apoptosis of human aorta smooth muscle cells via the activation of mitogen-activated protein kinases and caspase-3. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18: 1782-1784 (2004)

154. Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, Meng Q, Mustafa A K, Mu W, Zhang S, Snyder S H, Wang R: H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science (New York, N.Y.)*, 322: 587-590 (2008)
155. Zanardo R C, Brancaleone V, Distrutti E, Fiorucci S, Cirino G, Wallace J L: Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20: 2118-2120 (2006)
156. Zhang C Y, Du J B, Yan H, Tang C S: Effect of a new gasotransmitter, hydrogen sulfide, on collagen remodeling of pulmonary artery under hypoxia. *Zhonghua jie he he hu xi za zhi = Zhonghua jiehe he huxi zazhi = Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases*, 28: 448-452 (2005)
157. Zhang H, Mochhala S M, Bhatia M: Endogenous hydrogen sulfide regulates inflammatory response by activating the ERK pathway in polymicrobial sepsis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 181: 4320-4331 (2008)
158. Zhang H, Zhi L, Mochhala S, Moore P K, Bhatia M: Hydrogen sulfide acts as an inflammatory mediator in cecal ligation and puncture-induced sepsis in mice by upregulating the production of cytokines and chemokines via NF-kappaB. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 292: L960-L971 (2007)
159. Zhang H, Zhi L, Mochhala S M, Moore P K, Bhatia M: Endogenous hydrogen sulfide regulates leukocyte trafficking in cecal ligation and puncture-induced sepsis. *Journal of leukocyte biology*, 82: 894-905 (2007)
160. Zhang H, Zhi L, Moore P K, Bhatia M: Role of hydrogen sulfide in cecal ligation and puncture-induced sepsis in the mouse. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 290: L1193-L1201 (2006)
161. Zhang J, Sio S W, Mochhala S, Bhatia M: Role of hydrogen sulfide in severe burn injury-induced inflammation in mice. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 16: 417-424 (2010)
162. Zhang L, Yang G, Untereiner A, Ju Y, Wu L, Wang R: Hydrogen sulfide impairs glucose utilization and increases gluconeogenesis in hepatocytes. *Endocrinology*, 154: 114-126 (2013)
163. Zhao W, Wang R: H₂S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 283: H474-H480 (2002)
164. Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R: The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *The EMBO journal*, 20: 6008-6016 (2001)

7 Danksagung

Der Inhalt dieser Seite wurde
aus Gründen des Datenschutzes entfernt

8 Lebenslauf

Der Inhalt dieser Seite wurde
aus Gründen des Datenschutzes entfernt

Der Inhalt dieser Seite wurde
aus Gründen des Datenschutzes entfernt