

Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Anästhesiologie
Sektion Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung
Leiter: Prof. Dr. med. Peter Radermacher

**Effekte einer späten Beatmung mit reinem Sauerstoff
auf histomorphologische Parameter von Leber und Lunge
im Langzeitmodell des vollentwickelten septischen Schocks beim
Schwein**

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

vorgelegt von
Caroline Grupp
aus Aalen

2008

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus- Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Radermacher

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Möller

Tag der Promotion: 20. November 2008

Meinen Eltern und meiner Schwester

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	II
1 Einleitung	1
1.1 Das Krankheitsbild Sepsis	1
1.2 Hyperoxie und Antioxidantien	3
1.3 Apoptose	6
1.4 Fragestellung	7
2 Material und Methoden	8
2.1 Anästhesie und chirurgische Präparation	8
2.2 Versuchsdurchführung und Materialgewinnung	13
2.3 Auswertungsmethoden	15
2.4 Datenverarbeitung und Statistik	21
3 Ergebnisse	22
3.1 Allgemeine Erhebungsdaten	22
3.2 Histologische Ergebnisse	22
3.3 Aktivität der antioxidativen Enzyme SOD und Katalase	36
3.4 Mikrobiologische Ergebnisse	40
4 Diskussion	50
4.1 Charakteristika dieser Studie	50
4.2 Histologische Ergebnisse der Lunge und Leber	51
4.3 Aktivität der antioxidativen Enzyme SOD und Katalase in Lunge und Leber	58
4.4 Mikrobiologische Ergebnisse in den Blutproben und Abdominalabstrichen	60
4.5 Schlussfolgerung	61
5 Zusammenfassung	62
6 Literaturverzeichnis	64
7 Danksagung	78
8 Lebenslauf	79

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
α	Signifikantsniveau
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
A.	Arterie
A1/ Bfl- 1	Bcl- 2- Homolog (antiapoptotisches Gen)
ACCP	American College of Chest Physicians
ADP	Adenosindiphosphat
AEC	Aminoethylcarbazol
AIDS	erworbenes Immundefektsyndrom (Acquired Immune Deficiency Syndrome)
API	Analytischer- Profil- Index
APV	Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ARDS	Atemnotsyndrom des Erwachsenen/ Schocklunge/ akutes progressives Lungenversagen (acute respiratory distress syndrome)
ATP	Adenosintriphosphat
ATS	American Thoracic Society
Bcl- 2	B- Z(C)ell-Lymphom/ Leukämie- 2- Gen (steht für das Gen und das Genprodukt, in der Arbeit wird aus dem Kontext deutlich, was gemeint ist)
BSA	Bovines/ Rinder- Serumalbumin (bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CA	California
CD	Oberflächenmerkmal von Leukozyten (cluster of differentiation)
CH10/ 8 cm	Artikelnummer des Cystofix- Katheters (Lumengröße/ Länge)
cm H ₂ O	Zentimeter Wassersäule (Z(C)entimeter dihydrogen monoxide)
Corp.	Gesellschaft (Corporation)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid (carbon dioxide)
CRP	C- reaktives Protein

Abkürzungsverzeichnis

CuZn	K(C)upfer- Zink
dest.	destilliert
dig	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure (d eoxyribonucleic acid)
DTTX30	ein Thromboxanrezeptor- und - synthetaseantagonist
dUTP	2'- D eoxyuridin 5'- T riphosphat
E	E nterobakterien
E.	E scherichia
EC	extrazellulär (e xtra c ellular)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (e thylendiamine t etraacetic a cid)
EEG	E lektroenzephalogramm
EKG	E lektrokardiogramm
ESICM	E uropean S ociety of I ntensive C are M edicine
EtCO₂	endexpiratorischer Kohlenstoffdioxiddruck (e nd- t idal c arbon d ioxide)
Exp.	E xpiration
F	gibt verbunden mit einer Zahl die Lumengröße von Kathetern an
Fab	Fab - Fragment= Antigen- b indendes F ragment
Fas	Todesrezeptor zur Apoptoseinduktion (f ibroblast a ssociated s urface antigen (= CD 95))
FasL	Fas - L igand
FiO₂	inspiratorische Sauerstoffkonzentration (f raction of i nspired o xygen)
g= 10000	die Schleuderziffer beträgt 10000 (bei der Zentrifugation)
H₂O	Wasser (d i h ydrogen m onoxide)
H₂O₂	Wasserstoffperoxid (h ydrogen p eroxide)
HAES	H ydroxy a ethylstärke
HCl	Salzsäure (Chlorwasserstoff, h ydrogen c hloride)
HE	H ämatoxylin- E osin
Hg	Quecksilber (H ydrargyrum)
HIF	durch Hypoxie induzierbarer Faktor (h ypoxia i nducible f actor)
HPFs	hochauflösende Gesichtsfelder (h igh p ower f ields)
HZV	H erzzeitvolumen
I- κB	Hemmer von NF- κB (NF- κ B - inhibitor)
ICU	Intensivstation (i ntensive c are u nit)

Abkürzungsverzeichnis

IL	Interleukin
Inc.	Inkorporiert (I ncorporated)
Insp.	I nspiration
ITBV	intrathorakales B lutvolumen
JVC	japanischer Elektrokonzern (V ictor C ompany of J apan)
K	K ontrollgruppe
KCl	K aliumchlorid
kg	K ilogramm
M	M olar
M=	die molare Masse beträgt
mg	M illigramm
ml	M illiliter
mM	M illimolar
mm	M illimeter
mm Hg	Millimeter Quecksilbersäule (M illimeter H ydraryrum)
mmol	M illimol
Mn	M angan
MPAP	Mittlerer pulmonalerarterieller Druck (m ean p ulmonary a rtery pressure)
N	N ormalität
n	Anzahl der Versuchstiere
Na	N atrium
NaCl	N atriumchlorid
NE	Nicht E nterobakterien
NF- κB	nuklearer/ Kern- F aktor kappa B
NO	Stickstoffmonoxid (n itrogen monoxide)
NO₂	Stickstoffdioxid (n itrogen dioxide)
O₂	Sauerstoff (o xxygen)
¹O₂	Singulett- Sauerstoff
O₂⁻	Superoxid- Radikal
OH-	Hydroxyl-
OH⁻	Hydroxyl- Radikal
ONOO⁻	Peroxynitrit- Radikal
OP	O perationssaal

Abkürzungsverzeichnis

p	Überschreitungswahrscheinlichkeit
p53	Genomwächterprotein/ Tumorsuppressorgen (kann Apoptose freigeben)
PA	P ennsylvania
PAOP	pulmonalkapillärer Verschlussdruck (p ulmonary a rtery o ccclusion p ressure)
PAS	Perjodsäure- Schiff- Reagenz (P eriodic A cid S chiff)
pCO₂	partieller Kohlenstoffdioxiddruck (partial p ressure of c arbon d ioxide)
PEEP	positiver endexpiratorischer Druck (p ositive e nd e xpiratory p ressure)
pH	Kennzahl für den Säuregrad einer Flüssigkeit (p otentia h ydrogenii)
POD	P eroxidase
Prof.	Professor
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (r eactive o xxygen s pecies)
S.	Seite
SaO₂	Sauerstoffsättigung (s aturation of o xxygen)
SCCM	S ociety of C ritical C are M edicine
SepNet	Kompetenz netz S epsis
Ser. No.	Seriennummer (s erial n umber)
sH	späte H yperoxiegruppe
SIRS	S ystemisches i nflammatorisches R esponse- S yndrom (s ystemic i nflammatory r esponse s yndrome)
SIS	S urgical I nfection S ociety
SOD	S uperoxiddismutase
spp.	viele oder alle Arten einer Bakteriengattung (s pecies p luralis)
subsp.	S ubspezies
TBS	Tris- gepufferte Salzlösung (T ris b uffered s aline)
TdT	terminale D eoxynukleotidyltransferase
TNF	T umornekrose f aktor
Tris	T rishydroxymethylaminomethan
TUNEL	terminale Deoxynukleotidyltransferase vermitteltes dUTP Labeling (T dT- mediated dUTP- biotin n ick e nd l abeling)
TXA2	T hromboxan A 2

Abkürzungsverzeichnis

U	Unit(s)
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (United States of America)
V.	Vene
ZVD	Zentraler Venendruck
ZVK	Zentraler Venenkatheter

1 Einleitung

1.1 Das Krankheitsbild Sepsis

1.1.1 Epidemiologie, Definitionen, Richtlinien und Klinik

Die schwere Sepsis ist eine durch Infektion ausgelöste, generalisiert verlaufende Entzündungsreaktion des Körpers mit exzessiver Aktivierung von endogenen Entzündungs- und Gerinnungsmediatoren und Beeinträchtigung vitaler Parameter bis hin zum Multiorganversagen und der Notwendigkeit intensivmedizinischer Behandlung. Sollten diese Veränderungen ohne erkennbare Infektion bzw. ohne nachzuweisende Mikroorganismen auftreten, so spricht man von einem SIRS (= systemic inflammatory response syndrome). Mögliche Ursachen dafür können immunologische oder chemische Gründe wie zum Beispiel eine akute Pankreatitis, Schock, Verbrennung, große Operationen, vor allem Operationen mit extrakorporalem Kreislauf wie etwa große Herzoperationen, oder große Wundflächen, schwere Traumata oder verschiedene schwere Erkrankungen wie beispielsweise eine nekrotisierende Pankreatitis sein. In Deutschland erkranken jedes Jahr etwa 154.000 Menschen an Sepsis [17]. Kommt es zum septischen Schock, kann die Mortalitätsrate von 30 % auf über 50 % ansteigen [52]. Trotz Fortschritten in chirurgischen Techniken und unterstützender Betreuung bleiben Sepsis und septischer Schock die führende Ursache für Morbidität und Mortalität bei schwerst kranken Patienten [138]. All dies macht die Ernsthaftigkeit dieses Krankheitsbildes deutlich. In der „Consensus Conference“ wurden daher Definitionen, Klassifikationen und Diagnosekriterien für Sepsis und Organversagen sowie Richtlinien zur Nutzung von Therapien festgelegt und 1992 veröffentlicht [11]. 2003 und 2004 erfolgten aufgrund erneuter Konferenzen Veränderungen und Ergänzungen dieser Beschlüsse [33, 90].

Bei Sepsis kann es unter anderem zu Veränderungen der Körpertemperatur, der Herzfrequenz, der Atemfrequenz, der Leukozytenzahl, der Anzahl der unreifen neutrophilen Granulozyten, des CRPs und des Procalcitonins kommen. Von einer schweren Sepsis spricht man, wenn zusätzlich noch Organdysfunktion, Minderperfusion und Hypotension mit Verwirrtheit, Ödemen, Oligurie, Hyperglykämie und Laktatazidose auftreten. Wenn zusätzlich zu diesen Charakteristika die Hypotension der schweren Sepsis trotz adäquater Flüssigkeitssubstitution besteht und die Gabe von Vasopressoren nötig ist, um die Hypotension zu vermeiden, handelt es sich um einen septischen Schock. Es ist zu

beachten, dass es in der Frühphase auch zu einer hyperdynamen Verlaufsform des septischen Schocks kommen kann, bei der Blutdruck und ZVD normal oder leicht erniedrigt sind.

1.1.2 Pathophysiologie und Therapiesäulen

Im Falle einer Sepsis stoßen im Allgemeinen virulente Keime auf einen Organismus mit geschwächter Resistenz. Primäre Infektionsherde einer schweren Sepsis können eine Pneumonie, eine Peritonitis, Harnwegsinfekte, Wund-/ Weichteilinfekte oder Katheterinfekte sein. Entscheidend sind dabei die Invasion pathogener Keime und die Freisetzung toxischer bakterieller Keimprodukte ins Blut. Dadurch kommt es zur Aktivierung von Entzündungszellen wie Monozyten und Makrophagen [7, 157]. Eine Folge ist die Bildung sowie die Aktivierung und Freisetzung von humoralen und zellulären proinflammatorischen Mediatoren wie TNF- α und IL- 1 [109]. Durch die Wirkung dieser Mediatoren werden sekundäre Mediatoren wie Stickstoffmonoxid und Sauerstoffradikale exprimiert. Allgemein kommt es während einer septischen Erkrankung zu einem höheren Sauerstoffverbrauch, woraus die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und somit eine Erhöhung des oxidativen Stresses folgt [49]. Manche Mediatorsubstanzen wirken sowohl als Aktivatoren als auch als Effektoren. Als Ergebnis der Aktivierung der biologischen Kaskadensysteme entstehen aktivierte Komplementprodukte, aktivierte Gerinnungsprodukte mit Generation von Thrombin und Plasmin, aktivierte Kinine und Endorphine. Schädigungen unter anderem vermittelt durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind also Teil der Pathogenese von Sepsis und septischem Schock und den damit verbundenen Organschäden und so ein zentrales Element im Netzwerk der Entzündungsmediatoren [126, 152]. Diese schädlichen Effekte zeigen sich über Membranlipidperoxidation, DNA- und zelluläre Struktur- und Funktionsschäden in endothelialer, myokardialer, Lungen-, Nieren- und Leberdysfunktion [60]. Das Endothel spielt eine besondere und zentrale Rolle im generalisierten Entzündungsprozess. Die bakteriellen Endotoxine schädigen entweder direkt oder indirekt durch die Aktivierung der Mediator-kaskaden die Gefäßendothelien und damit auch die Endstrombahn, wobei auch die reaktiven Sauerstoffspezies eine Rolle spielen. Dies trägt zur Entstehung von Sepsis und septischem Schock bei. Bei Schweinen führte in einer Studie die Behandlung mit bakteriellen Lipopolysacchariden im Gefäßsystem zu einer höheren Produktionsrate an Superoxid- Anionen und daraus folgend an Peroxynitrit [74]. Dies deutet darauf hin, dass zusätzlich das Endothel selbst bei Sepsis in großen Mengen NO und Sauerstoffradikale

bildet. Es kommt zur Freisetzung dieser Mediatoren und auch zur Expression von Adhäsionsmolekülen, wodurch Granulozyten und Monozyten festgehalten werden. Die Folge ist der Verlust der Zellintegrität des Endothels mit Permeabilitätsstörungen, Ödembildung und Verlust der normalen Regulationsfähigkeit. Insgesamt kommt es pathophysiologisch gesehen zu einer Störung der peripheren Sauerstoffextraktion, einer Vasodilatation mit Herabsetzung des peripheren Widerstandes und Maldistribution des Blutflusses sowie eventuell zu einer Störung der myokardialen Pumpfunktion. Dies zieht die klinischen Manifestationen wie unter 1.1.1 aufgeführt nach sich, die eine intensive Therapie erfordern.

Die Therapie der Sepsis basiert auf mehreren Säulen, der kausalen, der supportiven und der adjunktiven. Die kausale impliziert die Sanierung des Infektionsherdes durch chirurgische Intervention und Entfernung potentiell infizierten Fremdmaterials und Gewebes sowie eine Abszessdrainageeinlage. Außerdem erfolgt eine empirische initiale Antibiotikatherapie und eine gezielte Antibiose nach Antibiotogramm. Zur supportiven Therapie gehören vor allem die hämodynamische Stabilisierung durch Volumen- und Katecholamintherapie, die Sicherung des Sauerstofftransportes durch Volumensubstitution und Transfusion, eine lungenprotektive Beatmungsstrategie, künstliche Ernährung, Thrombose- und Ulcusprophylaxe, Nierenersatzverfahren, Analgosedierung und metabolische Kontrolle. Die Substitutionstherapie mit Hydrocortison und die Modulation des Gerinnungs-Inflammations- Systems bilden die adjunktive Säule der Sepsistherapie [33, 109].

1.2 Hyperoxie und Antioxidantien

1.2.1 Sauerstofftherapie und reaktive Sauerstoffspezies

Die Beatmung mit Sauerstoff kann sowohl schädliche Effekte durch Beeinträchtigung der DNA und der mitochondrialen Funktion als auch protektive Wirkungen haben [88, 89], vor allem in Schockzuständen bzw. bei Sepsis [9, 10]. Derzeit ist allerdings nicht klar, in welchen Situationen die deletären bzw. die benefiziellen Effekte überwiegen [84, 92].

Zahlreiche klinische und experimentelle Studien dokumentieren die günstige Wirkung der Beatmung mit 100 % Sauerstoff. In einer großen Multicenterstudie, die 500 Patienten einschloß, konnten Greif und Kollegen durch eine perioperative Beatmung mit hyperoxischen Gasgemischen eine signifikante Reduktion von Komplikationen und Morbidität nachweisen. Es kam zu einer geringeren Rate an chirurgischen Wundinfektionen und zu einer Reduzierung bakteriellen Nachweises [59]. Daher waren

auch im Zuge einer eventuellen antibiotischen Sauerstoffwirkung in unserer Studie mikrobiologische Daten von Interesse, die anhand von Blutproben und Abstrichen aus der Abdominalhöhle gewonnen und ausgewertet wurden. Eine Vorbehandlung mit Hyperoxie verbesserte die myokardiale Toleranz gegen Ischämie-/Reperfusionsschäden in isolierten Langendorff-Organpräparaten [140] im Sinne einer Präkonditionierung mit Sauerstoffradikalen [145]. In Schockmodellen in vivo (Hämorrhagie, Ischämie-Reperfusion) konnte die kreislaufstabilisierende Wirkung einer Hyperoxie aufgezeigt werden [8, 139, 153]. Darüber hinaus verbesserte die Beatmung mit reinem Sauerstoff die Überlebensrate von Versuchstieren, die einer Hämodilution auf Werte unterhalb des so genannten kritischen Hämatokrits ausgesetzt wurden [104]. Klinische Daten zeigten zudem, dass eine transitorische Hyperoxie in der Tat aufgrund einer Vasokonstriktion stabilisierend auf den Blutdruck wirken kann [120, 121], wobei allerdings diese Vasokonstriktion auf mikrozirkulatorischer Ebene potentiell auch zu Perfusionsminderungen führen kann [142, 144]. Eine Bedeutung hat auch der Zeitpunkt der Beatmung mit 100 % Sauerstoff. Der prophylaktische Einsatz einer Sauerstoffbeatmung im Sinne einer Präkonditionierung vor bzw. der gleichzeitige Beginn mit Entstehung des Schockbildes bringt die beschriebenen Vorteile. Im Gegensatz dazu ist denkbar, dass eine späte, therapeutische Anwendung der Hyperoxie, d.h. nach Vollentwicklung des septischen Schocks, diesen Benefit nicht bestätigt, sondern möglicherweise zu mehr Nachteilen und Schädigungen führt. Daher wurden in unserer Studie die Effekte einer späten Beatmung mit reinem Sauerstoff auf Histomorphologie und Apoptoserate untersucht.

Das Toxizitätspotential von Sauerstoff ist bereits seit längerer Zeit bekannt. So wird schon seit ca. einem Jahrhundert berichtet, dass die Atmung reinen Sauerstoffs über längere Zeit zu Organschäden und letztlich zum Tod führt [12, 41, 58, 136]. Dies führte zur Formulierung des Paradigmas der „Sauerstofftoxizität“ [19, 24]. Auch 1952 war die Rede von genotoxischen Effekten des Sauerstoffs auf Zellen [25]. Die Ähnlichkeit der histopathologischen Befunde mit den Folgen einer Bestrahlung [56] legen nahe, dass die Hyperoxie- bedingten Schäden auf mitochondrialer [129, 163] bzw. DNA- Ebene [150], vermittelt durch freie Sauerstoffradikale [75], lokalisiert sind, wobei letztere als DNA-Einzelstrangbrüche imponieren [150]. Darüber hinaus war der Reanimationserfolg asphyktischer Kinder nach Sauerstoffatmung deutlich schlechter [127, 128]. Weiterhin kann Hyperoxie zu Endorganschädigungen der Lunge führen wie zu Atelektase, einem ARDS, einem nichtkardialen Lungenödem oder zu bronchopulmonaler Dysplasie, was

beispielsweise auch bei verlängerter hyperoxischer Beatmung von Neugeborenen auftritt [116]. Auch wenn schon mehrere Studien bezüglich der Sauerstoffatmung und deren Auswirkungen auf gesunde Organismen durchgeführt wurden, so existieren noch wenige Erkenntnisse über diese im Zusammenspiel mit dem Krankheitsbild der Sepsis, was in unserer Studie untersucht wurde.

Es ist bekannt, dass freie Sauerstoffradikale in höheren Konzentrationen durch die Interaktion mit vielen verschiedenen Molekülen und Zellkomponenten wie z.B. der DNA [75] für die zellulären Schädigungen verantwortlich sind, die mit Sauerstofftoxizität in Verbindung gebracht werden [51, 75]. Zu einer vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) können unter anderem Hyperoxie [164], Sepsis [49] sowie ionisierende Strahlung und Medikamente [48] beitragen. Die Radikale Superoxid und Wasserstoffperoxid sind die bekanntesten Vertreter der ROS. Superoxid- Radikale und Wasserstoffperoxide können zusammen reagieren und Hydroxyl- Radikale ($\text{OH}^\cdot$), ein weiteres Mitglied der ROS- Familie, bilden. Das Hydroxyl-Radikal ist sehr reaktiv, reagiert sofort mit Molekülen in der Umgebung und soll neben H_2O_2 und $\text{O}_2^\cdot$ vor allem für Lipidperoxidation verantwortlich sein. H_2O_2 und $\text{O}_2^\cdot$ sind weniger reaktiv und können so leichter diffundieren [62, 73]. Auch Singulett- Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) kann Lipidperoxidation stimulieren und zu oxidativem Stress und oxidativem Lungenschaden beitragen [62, 77, 80]. $^1\text{O}_2$ kann aus Wasserstoffperoxid oder durch spontane Dismutation aus Superoxid entstehen. Die Lipidperoxidation hat ihrerseits wiederum die Bildung von weiteren reaktiven Produkten zur Folge, die zur Hemmung von zellulären Enzymen und zur Schädigung von Proteinen und intrazellulären Membranen führen können. Auch Stickstoffmonoxid (NO), das zur Familie der reaktiven Stickstoffspezies gehört, kann zu Gewebeschäden unter anderem auch der Leber führen [100]. Stickstoffmonoxid und Superoxid können miteinander reagieren und dann in der Bildung des Radikals Peroxynitrit ($\text{ONOO}^\cdot$) resultieren [101].

1.2.2 Antioxidative Systeme

Zu den Verteidigungsmechanismen zur Minimierung schädlicher Effekte der $\text{O}_2^\cdot$ - Radikale nicht nur bei Hyperoxie an sich sondern auch bei pathologischen Bedingungen wie Sepsis und Schock gehören verschiedene kleine Molekülfänger und eine Reihe antioxidativer Enzyme wie die SOD und Katalase [69, 123], die den ROS- Metabolismus begünstigen. Die SOD wird als ein antioxidatives Verteidigungssystem der ersten Linie angesehen [43, 48]. Sie sorgt für die Dismutation des Superoxid- Radikals, wobei Wasserstoffperoxid und

molekularer Sauerstoff entsteht. Die Katalase katalysiert direkt die Reduktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser und molekularem Sauerstoff. Antioxidative Enzyme können also den Organismus vor den deletären Einwirkungen von freien Sauerstoffradikalen schützen [48, 51, 97]. Während einer Narkose führte beispielsweise Hyperoxie zu einer Erhöhung der Plasmaspiegel von Parametern des „oxidativen Stresses“ [81] und bei Probanden kam es zum Abfall des Blutdrucks, was durch Antioxidantien verhindert werden konnte [94, 95]. Interessant ist, dass Hyperoxie selbst zu einer Aktivitätserhöhung z.B. der SOD führen [28] und in einem gewissen Schutz vor Schäden durch nachfolgende 100 %- ige Sauerstoffatmung resultieren kann [27, 29, 82]. Daher wurde in unserer Studie auch das Verhalten von SOD und Katalase untersucht, um im Zuge dessen einen möglichen schützenden Effekt nachzuweisen.

Die antioxidativen Systeme können allerdings auch inadäquat werden, wenn die O₂-Radikale durch Hyperoxie oder auch bei Sepsis eine gewisse Grenze überschreiten [75]. Während einer hyperoxischen Beatmung von Säugetieren kann in den Lungen die Bildung von Sauerstoffradikalen proportional zum erhöhten Sauerstoffgehalt ansteigen, was eventuell zur Überwältigung der zellulären Kapazität antioxidativer Verteidigungsmechanismen und zu folgenden Lungenschädigungen führen kann [48].

1.3 Apoptose

1.3.1 Bedeutung von Apoptose

Der Vorgang der Apoptose spielt sowohl bei physiologischen als auch bei pathologischen Zuständen eine Rolle [65, 119, 122] und wird auch als programmierter Zelltod bezeichnet. Apoptose ist unter physiologischen Bedingungen für die Entwicklung und Homöostase multizellulärer Organismen nötig [108, 156], z.B. um ungebrauchte Zellen zu entfernen, und bei Sepsis kann es durch extensive Apoptose von Lymphozyten zur Herunterregulierung der begleitenden Entzündungsreaktion kommen [70]. Neben diesen positiven Aspekten kann Apoptose allerdings ebenso mit zahlreichen Nachteilen einhergehen. Da eine Steigerung der zellulären Absterberate immer auch ein Verlust an Gewebe bedeutet, ist es nachzuvollziehen, dass geringere Apoptosezahlen mit einem Überlebensvorteil einhergehen [26]. Vor allem, wenn Apoptose vermehrt und beschleunigt auftritt, spielt sie in der Pathologie eine wichtige Rolle [65, 119, 122]. Sie ist in der Pathogenese von Lungenschäden von großer Bedeutung [40] und kann auch in der Leber zu ausschlaggebender Schädigung führen [111]. Zudem tritt Apoptose bei Ischämie-

Reperusionsmodellen auf [125] und deren Fehlregulierung steht in Zusammenhang mit zahlreichen Erkrankungen, darunter AIDS, neurodegenerative und Autoimmunkrankheiten sowie Karzinome [65, 110, 122].

1.3.2 Apoptose, Nekrose und Hyperoxie

Apoptose ist histologisch gekennzeichnet durch Schrumpfung und Kernveränderungen wie Karyopyknosis und Karyorrhesis der abgestorbenen Zellen ohne reaktive Begleitentzündung. Daneben können Zellen auch durch Nekrose sterben [93]. Im Gegensatz zur Apoptose zeigen sich hierbei ein frühzeitiger Verlust der Membranintegrität, eine Zell- und Organellschwellung sowie eine begleitende Entzündungsreaktion [71]. Bei der Initiierung von Apoptose spielen vor allem reaktive Sauerstoffspezies, die durch Hyperoxie stark erhöht sein können, über verschiedene Wege, unter anderem über den Mitochondrienweg und über eine DNA- Schädigung, eine wichtige Rolle [48, 49, 124]. Apoptose wird als die vorherrschende Art der Zelltodmöglichkeiten und als hervorstechende Komponente bei oxidativen Insulten und Hyperoxie- bedingten Organschädigungen angesehen [96, 97, 135]. In unserer Studie wurde daher untersucht, wie sich eine Beatmung mit 100 % Sauerstoff nach Vollentwicklung eines septischen Schocks im Gegensatz zu einer Beatmung mit Luft auf die Apoptoserate in Lunge und Leber auswirkt.

1.4 Fragestellung

In der vorliegenden Studie, in einem hyperdynamen, durch fäkale Peritonitis induzierten Langzeitmodell des vollentwickelten septischen Schocks beim Schwein, wurden folgende Fragen untersucht:

- 1.) Welche Effekte hat die Beatmung mit reinem Sauerstoff nach Vollentwicklung des septischen Schocks auf histomorphologische Parameter, darunter die Apoptoserate im Gegensatz zu einer kontinuierlichen Beatmung mit Raumluft ?
- 2.) Welche Rolle spielen dabei die Antioxidantien SOD und Katalase sowie die Mikrobiologie ?

2 Material und Methoden

2.1 Anästhesie und chirurgische Präparation

2.1.1 Allgemeines

Die Versuche wurden nach den Richtlinien „Umgang mit Labortieren“ des „Bundesinstituts für Gesundheit“ durchgeführt. Das Versuchsprotokoll wurde sowohl von dem Tierschutzbeauftragten der Universität Ulm als auch vom Regierungspräsidium Tübingen, Baden-Württemberg, genehmigt.

Insgesamt wurden für die Studie 20 deutsche sowohl männliche als auch weibliche Hausschweine aus dem Tierforschungszentrum der Universität Ulm mit einem medianen Gewicht von 50,0 kg eingesetzt. Ein weiteres Schwein starb während der Durchführung der Studie vor Versuchsende, so dass es nicht mit in die eigentliche Studie bzw. in die Auswertung aufgenommen werden konnte. Vor Studienbeginn war durch Vorversuche die notwendige Menge autologer Faeces zur Auslösung des polymikrobiellen septischen Schocks durch fäkale Peritonitis etabliert worden. Dazu existieren zwar mehrere Berichte in der Literatur [22, 79, 98, 137], die Angaben bezüglich der verwendeten Menge autologer Faeces konnten jedoch nicht unmittelbar auf diese Studie übertragen werden, da teilweise z.B. andere Schweinerassen wie Yucatan Minipig bzw. deutlich kleinere und erheblich jüngere Tiere verwendet wurden. Außerdem sollten die Vorversuche Aufschluss über die Durchführbarkeit der chirurgischen Präparation und des Versuchsprotokolls geben.

Die Versuchsdauer betrug jeweils ungefähr 36 Stunden. Diese teilte sich auf in 4 Stunden Präparationszeit, 8 Stunden Ruhe- und Erholungsphase von dem chirurgischen Trauma, 12 Stunden Initialisieren des hyperdynamen septischen Schocks durch fäkale Peritonitis und 12 Stunden Beobachtungszeitraum bzw. Therapiephase.

2.1.2 Vorbereitungsphase

Vor Versuchsbeginn wurde den Tieren im Tierforschungszentrum für 18 Stunden das Futter entzogen. Wasser stand ihnen in diesem Zeitraum ad libitum zur Verfügung. Die Schweine erhielten 1 Stunde vor der Narkose eine intramuskuläre Prämedikation mit Azaperon (5 mg/kg; Stresnil®, Janssen, Neuss, Deutschland) und Atropin (2,5 mg; Atropinsulfat®, Braun, Melsungen, Deutschland). Anschließend wurden die Tiere in einer

Transportkiste schlafend in den speziell für diesen Zweck ausgerüsteten Tier- OP der Sektion „Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung“ (APV; Parkstraße 11, 89073 Ulm) der Universität Ulm transportiert.

2.1.3 Narkose

Zunächst erfolgte das Anlegen eines intravenösen Zuganges über eine Ohrvene. Zur Einleitung wurde pulsoxymetrisch die Sauerstoffsättigung über einen Fingerclip am Ohr überwacht (Datex Capnomac Ultima[®] ULT-S-3301, Datex Instrumentarium Corp., Helsinki, Finnland) und unter Sauerstoffgabe die Narkose über den intravenösen Zugang der Ohrvene mit Pentobarbital (6-10 mg/kg; Narkodorm[®], Alvetra, Neumünster, Deutschland) und Ketamin (1-2 mg/kg; Ketavet[®], Pharmacia & Upjohn, Erlangen, Deutschland) eingeleitet. Nach einer Rückenlagerung der Schweine erfolgten die orotracheale Intubation und die kontrollierte maschinelle Beatmung (Servo 900C[®], Siemens, Erlangen, Deutschland). Für die kontinuierliche EKG- und EEG- Überwachung wurden Nadelelektroden gelegt. Während der operativen Instrumentierung wurde eine Standard- Respiratoreinstellung gewählt. Diese bestand aus einem Tidalvolumen von 8 ml/kg, einem positiven endexpiratorischen Druck (PEEP) von 5 cm H₂O, einem Inspirations-/Expirationsverhältnis von 1:2 und einer Atemfrequenz, die so eingestellt wurde, dass der arterielle pCO₂, bestimmt mit einem automatischen Blutgasanalysator, im Zielbereich von 35- 40 mm Hg lag. Um der durch die Peritonitis zu erwartenden Verschlechterung der Lungenmechanik Rechnung zu tragen, erfolgte mit Beginn der postoperativen Ruhephase für die restliche Versuchsdauer eine Modifikation der Respiratoreinstellung. Das Tidalvolumen betrug dann 10 ml/kg, der PEEP 10 cm H₂O und das Inspirations-/Expirationsverhältnis 1:1,5. Die Atemfrequenz richtete sich weiterhin nach dem arteriellen pCO₂, der nach wie vor im Zielbereich von 35- 40 mm Hg liegen sollte. Zur Überwachung der Beatmung wurde kontinuierlich die expiratorische CO₂-Konzentration gemessen. Die Sauerstoffsättigung, gemessen am Pulsoxymeter, wurde im Bereich von über 90 % gehalten. Die Beatmung erfolgte entweder mit Luft oder reinem Sauerstoff, je nach Gruppeneinteilung (*siehe unten unter 2.2. Versuchsdurchführung und Materialgewinnung*). Die Narkose wurde mit einer Dauerinfusion von Pentobarbital (6-12 mg/kg/h) und Buprenorphin (Temgesic[®], Boehringer, Mannheim, Deutschland) als Bolus je nach Wirkung und EEG-Monitoring

(EEG- Gerät NeurotracTM, Interspec Inc., Ambler, PA, USA) aufrechterhalten. Zusätzlich wurde bei den Schweinen mit einer Alcuronium- Infusion (10-15 mg/h; Alloferin[®], Hoffmann- La Roche, Basel, Schweiz) die Relaxation erreicht.

2.1.4 Operative Eingriffe

Zur Entlastung des Magens erhielten die Tiere eine Magensonde mit Oesophagus- Ballon, deren Positionierung anhand der charakteristischen Druckkurve mit kardialen Oszillationen kontrolliert wurde. Es erfolgte die Freilegung und Kanülierung der linken und rechten A. femoralis mit Einlage je eines Katheters (4 F, Multipurpose[®] A1, Cordis, Roden, Niederlande) über eine Katheterschleuse (4 F Introducer-Set, PV3240, Pulsion, München, Deutschland). Nach der Präparation der rechten V. submandibularis sowie der rechten und linken V. jugularis interna wurde in jedes Gefäß über eine Katheterschleuse (8,5 F, SI-09880, Arrow International, Reading, PA, USA) je ein Katheter (8,5 F, Multipurpose[®] A1, Cordis, Roden, Niederlande) sowie ein zentraler Venenkatheter (ZVK) eingelegt. Durch die seitliche Bauchwand wurden zwei Drainagen eingebracht. Die bereits zuvor im Stall gewonnenen autologen Faeces (ca. 2g/kg) wurden in 400 ml warmer NaCl- Lösung (isotone Kochsalzlösung 0,9 % NaCl, Braun, Melsungen, Deutschland) gelöst. Nach einer medianen Laparotomie wurde ein Ileostoma angelegt (Stoma- Beutel Stomadres plus[®], Bristol- Myers, Baar, Schweiz) und eine Ileum- Tonometriesonde zur Messung des intramukosalen pCO₂ angelegt. Es erfolgte ein dreischichtiger Verschluss der Bauchdecke. Als Pulmonalarterienkatheter wurde ein Thermodilutionskatheter (7F 93A754; Baxter Healthcare, Irvine, CA, USA) ebenfalls zur Überwachung des zentralen Venendrucks (ZVD), des mittleren pulmonalarteriellen Drucks (MPAP), des pulmonalkapillären Verschlussdrucks (PAOP) und des Herzzeitvolumens (HZV) über ein liegendes Einführungsbesteck in der V. jugularis eingeschwenkt. Zusätzlich wurde ein Katheter in die Vena portae eingelegt. Sämtliche Katheter wurden auf gute Fluss- und Aspirationsverhältnisse überprüft. Zur Urinableitung wurde den Tieren ein Cystofix- Katheter (Freka[®] Cyst Standard CH10/ 8 cm, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) angelegt.

Auf den nächsten beiden Seiten ist eine Gesamtübersicht und eine Skizze des Versuchsaufbaus zu sehen (Abbildungen 1 und 2).

An die operativen Eingriffe schloss sich eine achtstündige Ruhe- und Erholungsphase an.

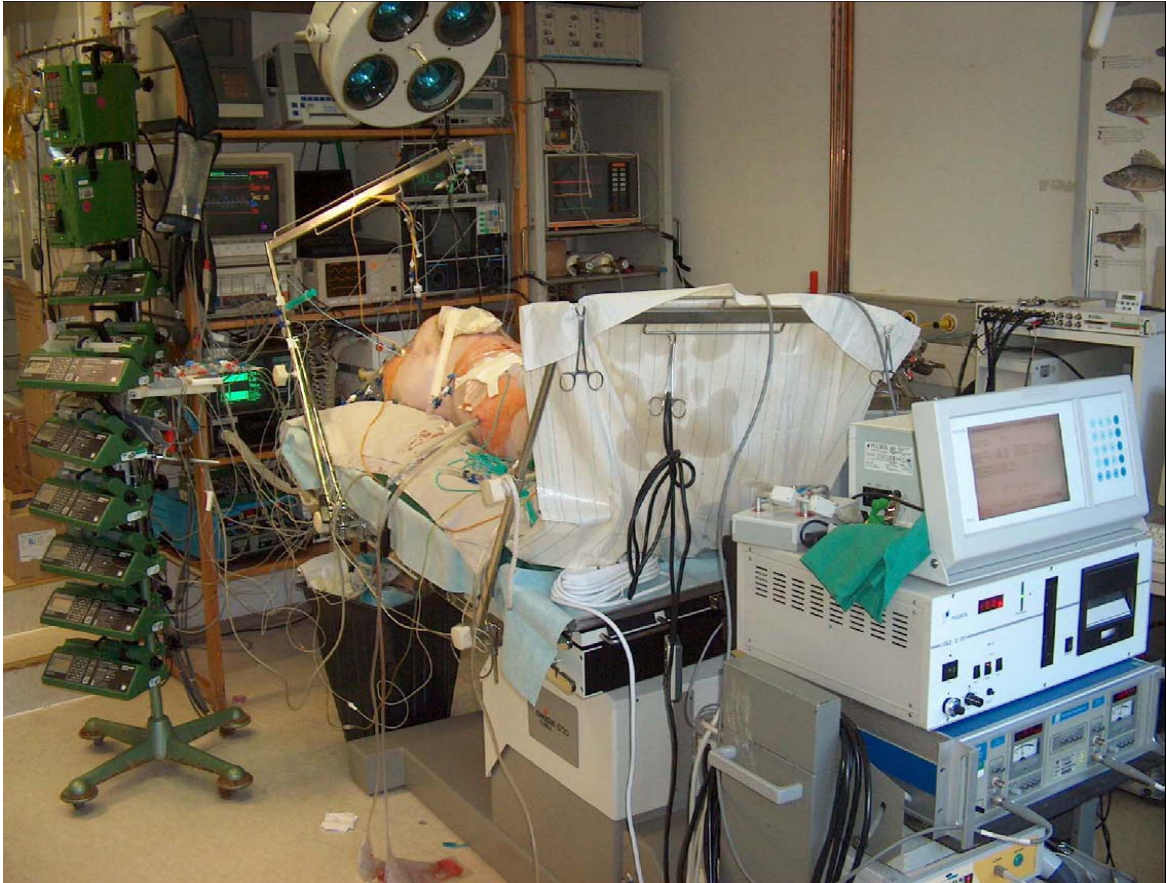


Abbildung 1:
Gesamtübersicht des Versuchsaufbaus.

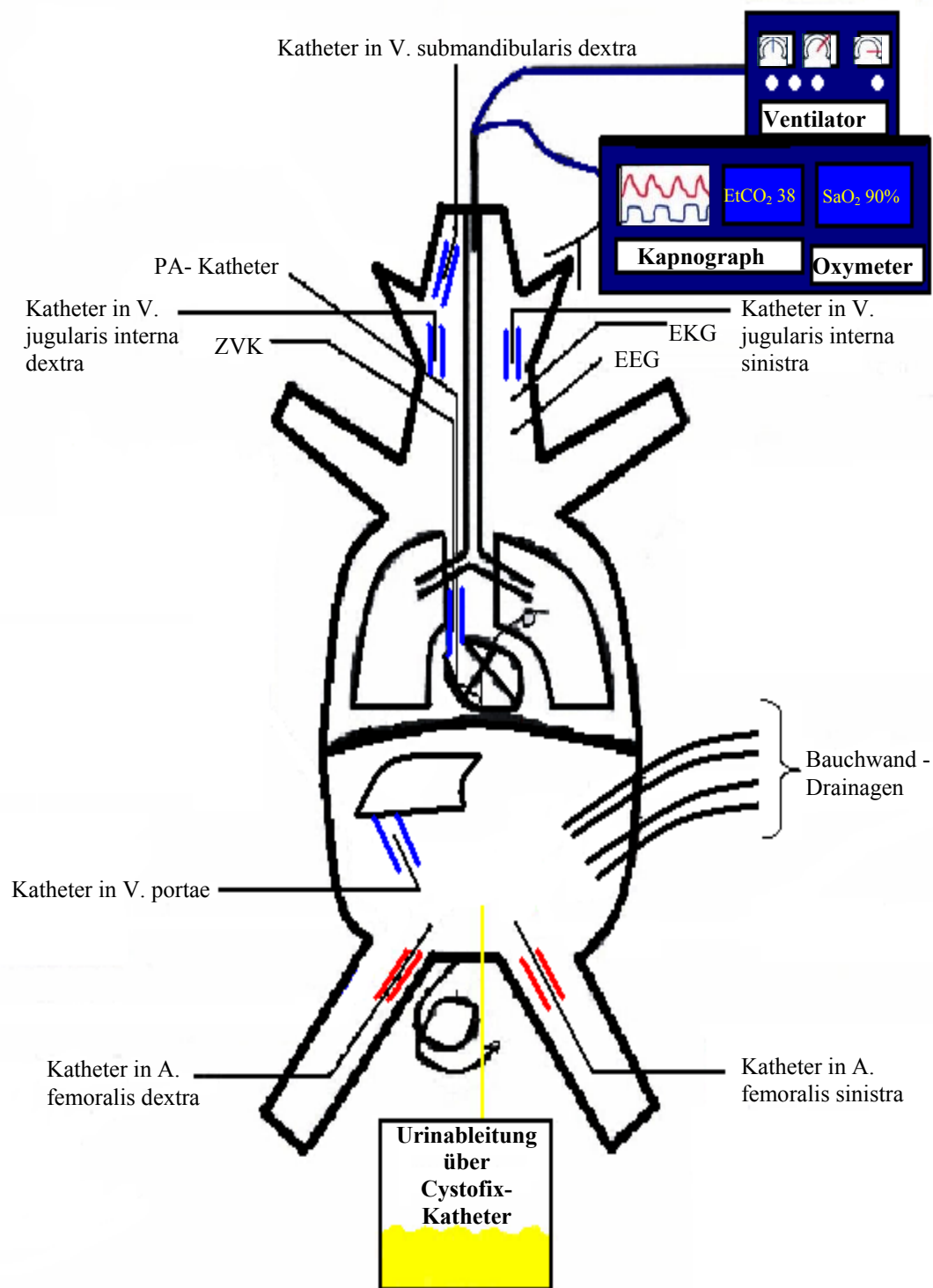


Abbildung 2:

Skizzierung des Versuchsaufbaus.

V.= Vena, A.= Arteria, PA= Pulmonalarterie, ZVK= Zentraler Venenkatheter,

EKG= Elektrokardiogramm, EEG= Elektroenzephalogramm, SaO_2 = Sauerstoffsättigung,

EtCO_2 = endexpiratorischer Kohlenstoffdioxidpartialdruck (in mm Hg).

2.2 Versuchsdurchführung und Materialgewinnung

Im Anschluss an die Ruhephase erfolgte die Auslösung der fäkalen Peritonitis. Dazu wurde die auf 38 °C erwärmte Faeces- Suspension über die abdominellen Drainagen in die Bauchhöhle injiziert. Während der folgenden 12 Stunden entwickelte sich dann eine Peritonitis bzw. konsekutiv ein septischer Schock, wie es auch in der Literatur zu finden ist [57, 67, 79, 86]. Als Flüssigkeitszufuhr erhielten die Schweine bis zum Ende der Präparationsphase eine Ringer- Lösung (Fresenius®, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) mit einer Dosierung von 10 ml/kg/h. Anschließend betrug die Erhaltungsdosis der Ringer- Lösung 7,5 ml/kg/h. Zur Kreislaufstabilisierung wurde Hydroxyethylstärke (10 ml/kg/h; HAES- steril® 6 % 200/0,5, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland; ITBV maximal 30- 35 ml/kg; ITBV= intrathorakales Blutvolumen) appliziert. War es durch die Volumensubstitution allein nicht möglich, den arteriellen Mitteldruck, der mit Hilfe der Aufzeichnungen eines Hewlett- Packard- Patientenmonitors (66 S™- Monitor, Hewlett- Packard, Palo Alto, CA, USA), der Beobachtung der Hämodynamik dienend, verfolgt werden konnte, über 70 mm Hg zu halten, wurde zusätzlich Noradrenalin (Arterenol® 25 ml, Sanofi- Aventis GmbH, Frankfurt, Deutschland) mit einer Infusionsrate nach Bedarf infundiert. Während des Versuchs wurde auch die Körpertemperatur überwacht und mit Hilfe einer Heizmatte oder durch externe Kühlung im für Schweine diesen Alters physiologischen Bereich von 37,5 - 38,5 °C gehalten. Es erfolgte eine randomisierte Behandlung der Tiere entsprechend der mit Beginn der operativen Instrumentierung durchgeführten Gruppeneinteilung. So wurden die Schweine der Kontrollgruppe weiterhin wie bisher mit Raumluft beatmet bzw. erfolgte eine Anpassung des FiO₂, um die Sauerstoffsättigung über 90 % zu halten. Die Tiere der späten Hyperoxiegruppe hatten zunächst die gleiche Beatmung wie die Kontrollgruppe erhalten. 12 Stunden nach Induktion der Peritonitis, also nach Vollentwicklung des septischen Schocks, erfolgte dann in dieser Versuchsgruppe eine Beatmung mit reinem Sauerstoff. Kurz vor Versuchsende wurden zwei venöse Blutproben entnommen und für die Mikrobiologie eine aerobe und eine anaerobe Blutkultur angelegt (Bactec®- Flaschen). Am Ende des Versuchs erfolgte die Tötung der Tiere in tiefer Narkose durch einen Pentobarbital- Bolus und eine nachfolgende Injektion von Kaliumchlorid (20 ml= 20 mmol; KCl- Lösung Fresenius, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland). Daraufhin wurde sofort ein Abdominalabstrich für die Mikrobiologie und Gewebeproben von Lunge und Leber entnommen. Ein Teil der Gewebeproben wurde nach der Entnahme post mortem direkt in flüssigem Stickstoff fixiert und danach bei – 80 °C bis zur weiteren

Verarbeitung gelagert. Der andere Teil der Gewebeproben wurde sofort für die histologische Aufarbeitung in Formalin (6 %) fixiert. In der sich anschließenden Abbildung ist der gesamte Versuchsablauf graphisch dargestellt (Abbildung 3).

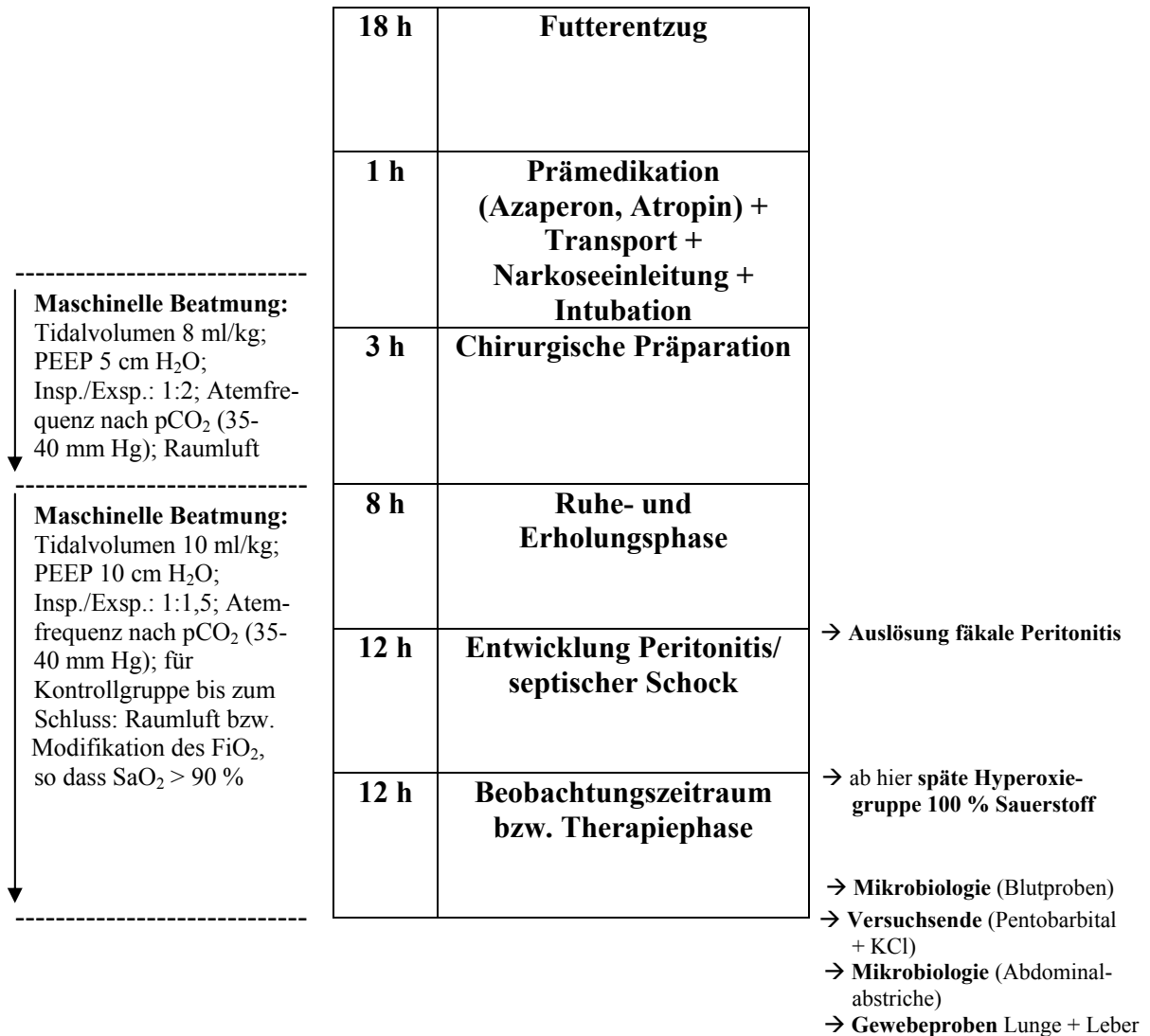


Abbildung 3:

Graphische Darstellung des gesamten Versuchsablaufs.

Insp.= Inspiration, Exsp.= Expiration, PEEP= positive endexpiratory pressure= positiver endexpiratorischer Druck, pCO₂= partieller Kohlenstoffdioxiddruck, FiO₂= inspiratorische Sauerstoffkonzentration, KCl= Kaliumchlorid, h= Stunde/Stunden, SaO₂= Sauerstoffsättigung.

2.3 Auswertungsmethoden

2.3.1 Histologische Aufarbeitung und Auswertung

2.3.1.1 Herstellung der histologischen Gewebeschnitte

Für die Herstellung der histologischen Gewebeschnitte wurde der Teil der Gewebeproben von Lunge und Leber verwendet, der nach der Entnahme nach Tötung der Tiere sofort in Formalin (6%) fixiert wurde (siehe unter 2.2 Versuchsdurchführung und Materialgewinnung). Es erfolgte die Entwässerung der Gewebebiopsien und das Einlegen in Paraffin. Für das weitere Vorgehen, das heißt für die Durchführung der verschiedenen Färbemethoden, wurden durch das Schneiden an einem Mikrotom (Leica Mikrotom 2030 Mot) 5- µm dünne Paraffinschnitte hergestellt.

2.3.1.2 Hämatoxylin- Eosin- Färbung (HE- Färbung)

Für die morphologische Beurteilung des Lungen- und Lebergewebes wurde eine Standard-HE- Färbung angefertigt. Hierfür wurden die hergestellten Gewebeschnitte in einem HE-Automat (Tissue Tek II, Färbeautomat, Histo Tek) angefärbt.

2.3.1.3 Perjodsäure- Schiff- Reagenz- Färbung (PAS- Färbung)

Zur Erweiterung der morphologischen Auswertung, vor allem zum Nachweis für das eventuelle Vorkommen von hyalinen Membranen, erfolgte für das Lungengewebe zusätzlich die Anfertigung einer PAS- Färbung. Hierfür wurden die Lungen-Gewebeschnitte in vier verschiedenen Xylolbädern entparaffiniert, mit Hilfe einer absteigenden Alkoholkonzentrationsreihe hydratisiert und gut in Aqua dest. gewaschen. Nach Entnahme aus dem destillierten Wasser erfolgte für 5 Minuten die Oxidation der Proben in einer 1 %- igen Perjodsäure (Firma Merck, Bestell- Nr.: 524) und danach das Spülen in Aqua dest.. Die Gewebeschnitte wurden für 10 Minuten in einer Schiff'schen Lösung (Firma Sigma, Bestell- Nr.: 394- 2- 016) platziert und danach zweimal für jeweils 5 Minuten in eine Waschlösung gestellt. Diese war zuvor aus einer 10 %- igen Natriumbisulfitlösung (5 ml; Natriumbisulfit, Firma Merck, Bestell- Nr.: 6512) sowie aus Salzsäure der Normalität 1 (5 ml; HCl 1 N, Firma Merk, Bestell- Nr.: 9057) und Aqua dest. (100 ml) hergestellt worden. Nach 5 Minuten Spülung in Leitungswasser erfolgte das Gegenfärben in Hämatoxylin (Harris Hämatoxylin, Firma Merck, Bestell- Nr.: 9253) für 1 Minute. Dieses wurde mit Hilfe von fließendem Leitungswasser 10 Minuten lang ausgewaschen. Durch eine Alkoholreihe in aufsteigenden Konzentrationen erfolgte die

Dehydrierung und nach abschließenden vier verschiedenen Xylolbädern zur Reinigung die Eindeckelung der Gewebeschnitte mit Glyceringelatine (Kaisers Glyceringelatine, 100g, Firma Merck, Bestell- Nr.: 1.09242.0100).

2.3.1.4 Beurteilung der HE/PAS- Färbungen

Die gefärbten Gewebeschnitte wurden mit Unterstützung von Frau Dr. C. Hasel (Abteilung Pathologie, Universität Ulm) verblindet ausgewertet. Um eine so hohe Aussagekraft wie möglich zu erreichen, wurden dazu mit einem Lichtmikroskop (Routine- Mikroskop, Model BX41TF, SN 5A16172, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) alle Schnitte in verschiedenen Vergrößerungen (Okular: 10x + Objektiv: 5x, 10x, 20x, 40x) komplett auf histomorphologische Gesichtspunkte hin betrachtet. Bei der Leber wurden zur qualitativen Bewertung jeweils die zu beobachtenden Veränderungen in den HE- Färbungen der Proben geschildert und dann die beiden Versuchsgruppen verglichen. Bei den Lungengewebeschnitten war es möglich, eine semiquantitative Auswertung durchzuführen. Es erfolgte ebenfalls jeweils anhand der HE- und PAS- Färbungen die qualitative Beschreibung der verschiedenen histomorphologischen Eigenschaften. Die beobachteten Veränderungen konnten dann in vier verschiedene Schweregrade eingeteilt werden (*siehe im Ergebnisteil unter Kapitel 3.2.1.1*) und jedem Schnitt wurde dann ein Schweregrad zugeordnet. Nach Vergabe des Schweregrades pro Gewebeprobe wurden die Kontrollgruppe und die späte Hyperoxiegruppe auf einen möglichen Unterschied hin verglichen. Um die Dicke der Lungenalveolarsepten zu messen, die bei der Vergabe des Schweregrades mit eine Rolle spielte, und um die insgesamt Histomorphologie visuell in verschiedenen Vergrößerungen festzuhalten, wurde eine Anordnung bestehend aus einem Mikroskop (Photomikroskop Axiophot Nr.: 451887, Carl Zeiss, Okular 10x + Objektiv 5x, 10x, 20x), einer Kamera (JVC®, 3CCD Digital Camera, KY- F75U, Ser. No.: 09850163, Victor Company of Japan, limited made in Japan) und einem Computer mit einem speziellen Programm (DISKUS, 4,5 Fire Wire, Programm zur mikroskopischen Diskussion, Bildaufnahme und – dokumentation) verwendet.

2.3.1.5 TUNEL- Färbung und Beurteilung

Das Markieren von DNA- Strangbrüchen über terminale Deoxynukleotidyltransferase vermitteltes dUTP Labeling (TUNEL) ermöglicht den Nachweis von apoptotischen Zellen im Gewebe. Es werden apoptotische Nuclei angefärbt. Die Markierung wurde an den bereits vorher hergestellten Paraffingewebeschnitten (*vergleiche 2.3.1.1*) durchgeführt. Diese Färbemethode beruht auf dem Anbau von biotinylierten dUTPs an 3'-

Hydroxylenden doppel- oder einzelsträngiger DNA nach einem Bruch des Strangs. Der Anbau der dUTPs wird durch das Enzym terminale Deoxynukleotidyltransferase (TdT) kanalisiert. Die Detektion erfolgt nach Zugabe von Antikörpern mit dem chromogenen Substrat AEC. Als Negativkontrolle wurde je ein Schnitt ohne TdT inkubiert, als Positivkontrolle diente ein Lymphknotengewebeschnitt. Zunächst erfolgte die Entparaffinierung der Gewebeschnitte. Dazu kamen für jeweils 5 Minuten vier verschiedene Xylolbäder zum Einsatz und nach zweimaligem Spülen durch kurzes Eintauchen in 100 %-iges Ethanol wurden die Schnitte für je 10 Minuten in verschiedene Alkoholbäder (Ethanol) absteigender Konzentration (100 %, 70 %, 40 %) gestellt. Ab diesem Zeitpunkt wurde darauf geachtet, dass die Schnitte nicht mehr austrocknen konnten. Danach wurden die Proben zweimal gut in Aqua dest. gewaschen. Die histologischen Schnitte wurden für 5 Minuten mit Tris- Puffer (10 mM, pH= 8,0) behandelt und mit einem Fettstift genau umrandet. Nach zeitgenauer Auftragung im Abstand von 10 Sekunden auf alle Schnitte von 200 µl Proteinase K (Firma Roth, Bestell-Nr.: 7528.1) pro Schnitt, die zuvor von 20 mg/1 ml Aqua dest. mit Tris- Puffer auf 20 µg/ml verdünnt worden war, erfolgte die Andauung der Histologien für exakt 15 Minuten in einer Feuchtkammer bei 37 °C. Nach Abtropfenlassen der Proteinase K, was erneut zeitgenau in der gleichen Reihenfolge im Abstand von 10 Sekunden durchgeführt wurde, wurden die Schnitte in Aqua dest. verbracht. Nach zweimaligem Spülen in Aqua dest. und einmaligem Waschen in TBS- Puffer (50 mM, pH= 7,6, 0,9 % NaCl) wurden die Proben für 30 Minuten in 0,1 %-iges Wasserstoffperoxid, verdünnt mit TBS- Puffer, gestellt. Dies diente der Inaktivierung der endogenen Peroxidase und somit konnte unterbunden werden, dass diese angefärbt wird. Nach Spülung in TBS- Puffer wurde jeder Schnitt für 5 Minuten mit 100 µl TdT- Spülpuffer bestückt. Dieser Spülpuffer hat einen pH- Wert von 7,2 und enthält Tris (30 mM, Firma Merck, Bestell- Nr.: 1.08382.2500, M= 121,14 g/mol), Na-Cacodylat (140 mM, Firma Serva, Bestell- Nr.: 15540, M= 214 g/mol), Cobaltchlorid (1 mM, Firma Sigma, Bestell- Nr.: C- 8661, M= 237,9 g/mol) und Bovines Serum Albumin Fraktion V (BSA, 0,25 %, Firma Serva, Bestell- Nr.: 11930). Anschließend wurde von den Positivkontrollen der TdT- Spülpuffer abgekippt und stattdessen auf jeden Positivschnitt 50 µl Inkubationslösung aufgetragen. Diese besteht, auf 50 µl bezogen, aus 0,5 µl terminaler Deoxynukleotidyltransferase (TdT 15 U, Firma Promega, Bestell- Nr.: M1871), 2,0 µl Digoxigenin- 11- dUTP (dig dUTP, Firma Roche, Bestell- Nr. 1093088), was vorher mit Aqua dest. auf 1:20 verdünnt wurde, und 47,5 µl fünffachem TdT- Puffer (Firma Promega, Bestell- Nr.: M189A), ebenfalls zuvor verdünnt mit Aqua dest.. Alle

Gewebeschnitte wurden dann für 2 Stunden erneut in einer Feuchtkammer bei 37 ° C im Brutschrank inkubiert. Die Lösungen wurden in TBS- Puffer abgewaschen und die Proben im Anschluss für 5 Minuten in 2 %- iges Pferdeserum, verdünnt mit TBS- Puffer, gestellt. Nachdem pro Gewebeschnitt das Auftragen von 100 µl Anti- Dig- Antikörper (anti- Dig Fab Schaf, Firma Roche, Bestell- Nr.: 1214667), zuvor verdünnt auf 1:200 mit 2 %- igem Pferdeserum, erfolgt war, verweilten die Proben für eine Stunde in der Feuchtkammer außerhalb des Brutschrankes, das heißt bei Zimmertemperatur. Daraufhin wurden die Proben einmal in TBS- Puffer gespült. Nachdem ein Peroxidase- Anti- Schaf- Antikörper (anti- Schaf POD, Firma Dianova, Bestell- Nr.: 713- 036- 147) mit 2 %- igem Pferdeserum auf 1:200 verdünnt worden war, wurden davon auf jeden Schnitt 100 µl aufpipettiert und alle Proben dann so bestückt für eine Stunde in einer Feuchtkammer außerhalb des Brutschrankes belassen. Nach einem weiteren Spülvorgang mit TBS- Puffer erfolgte pro Schnitt das Auftragen von 100 µl einer Detektionslösung. Diese bestand aus 3- Amino- 9- Ethyl- Carbazol (AEC, Firma Sigma, Bestell- Nr.: A- 5754), Dimethylformamid, Essigsäure, Natriumacetatlösung und Wasserstoffperoxid. Der Farbumschlag wurde lichtmikroskopisch festgestellt und die Reaktion in Leitungswasser abgestoppt. Bei der Farbreaktion von AEC katalysiert die Peroxidase die Oxidation von AEC, wobei Wasserstoffperoxid zu Wasser reduziert wird. Dabei entsteht aus AEC ein Radikalkation, das zu einem rot gefärbten Polymer abreagiert. Nach ungefähr einer Minute schwacher Gegenfärbung mit Hämalaun wurde dieses für 10 Minuten wiederum mit Leitungswasser ausgewaschen. Anschließend erfolgte das Eindeckeln der Gewebeschnitte mit Glyceringelatine (Kaisers Glyceringelatine, 100g, Firma Merck, Bestell- Nr.: 1.09242.0100).

Mit der Unterstützung von Frau Dr. C. Hasel (Abteilung Pathologie, Universität Ulm) wurden die Präparate lichtmikroskopisch (Routine- Mikroskop, Model BX41TF, SN 5A16172, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) analysiert und bewertet. Dies erfolgte verblindet bei einer 400- fachen Vergrößerung (Okular 10x + Objektiv 40x). Um ein Maximum an Validität und Kompatibilität zu gewährleisten, wurde in 25 hochauflösenden Gesichtsfeldern (HPFs= **high power fields**) die Anzahl der Apoptosen ausgezählt. Bei der Auszählung wurden nur die eindeutig rot bzw. dunkelrot gefärbten Nuclei berücksichtigt, die auch morphologisch mit dem Ablauf einer Apoptose übereinstimmten. Die Anzahlen der Apoptosen pro 25 HPFs wurden dann zwischen der Kontrollgruppe und der späten Hyperoxiegruppe verglichen.

2.3.2 Aktivitätsbestimmung der antioxidativen Enzyme Superoxiddismutase (SOD) und Katalase und Auswertung

2.3.2.1 Gewebeaufbereitung

Für die Enzymaktivitätsbestimmung der SOD und Katalase in Lunge und Leber wurden die Gewebeproben benutzt, die bei – 80 °C gelagert waren (siehe Kapitel 2.2). Alle folgenden Angaben zur Gewebeaufbereitung beziehen sich auf 100 mg Gewebe. Zunächst wurde das Gewebe mit einer Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %) gewaschen, um soviel Blut wie möglich zu entfernen. Anschließend wurde es mit Papiertüchern getrocknet und sein Gewicht gemessen. Hinzugefügt wurde dann ein Saccharosepuffer (400- 900 µl; 0,25 M Saccharose, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH = 7,4) und danach wurde die ganze Probe homogenisiert. Es erfolgte die Zentrifugation der homogenisierten Probe für 15 Minuten bei $g = 10000$ und 4 °C und die Verbringung des Überstandes in ein neues Röhrchen. Um die Probelösung des Gewebes vorzubereiten, wurde der Überstand mit destilliertem Wasser verdünnt. Diese Probelösung wurde dann für die weiteren Bestimmungen verwendet.

2.3.2.2 Bestimmung des Proteingehalts

Die Proteinmenge im Lungen- und Lebergewebe wurde spektrophotometrisch mit einem im Handel erhältlichen Kit gemessen (Bio- Rad DC Protein Assay, Kit- Katalognummer: 500- 0116, Bio- Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) und in der Einheit mg/ml angegeben.

2.3.2.3 Bestimmung der SOD- Aktivität und Auswertung

Die SOD- Aktivität in der Leber und Lunge in der Einheit U/ml wurde spektrophotometrisch mit einem kommerziell erhältlichen Kit (SOD Assay Kit- WST, Product Code 311, Dojindo Molecular Technologies, Inc., Japan) bestimmt. Diese Werte wurden dann zum vorher bestimmten Proteingehalt ins Verhältnis gesetzt, so dass sich dann die endgültige SOD- Aktivität in U/mg Protein ergab. Zur Auswertung wurden dann die Werte in der Kontrollgruppe mit denen in der späten Hyperoxiegruppe verglichen.

2.3.2.4 Bestimmung der Katalase- Aktivität und Auswertung

Die Bestimmung der Katalase- Aktivität im Lungen- und Lebergewebe wurde spektrophotometrisch mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits (Katalase Assay Kit, Katalognummer: 219263, Calbiochem) durchgeführt. Die Angabe erfolgte zunächst in

U/ml. Um die letztendliche Aktivitätsangabe der Katalase in U/mg Protein zu erhalten, wurden die Ergebnisse mit der zuvor gemessenen Proteinmenge verrechnet. Für die Auswertung erfolgte der Vergleich zwischen den Aktivitäten der beiden Versuchsgruppen.

2.3.3 Mikrobiologische Auswertung

2.3.3.1 Erregernachweis in den Blutproben und Abdominalabstrichen

Die Blutproben in den Blutkulturfläschchen (aerob und anaerob) und die Abdominalabstriche (*vergleiche Kapitel 2.2 Versuchsdurchführung und Materialgewinnung*) wurden an den Laborbereich Mikrobiologie und Pathologie des Tierforschungszentrums der Universität Ulm geschickt (Albert- Einstein- Allee 11, 89081 Ulm). Beim Nachweis der Erreger kamen konventionelle Methoden der mikrobiologischen Diagnostik zum Einsatz. Es wurden neben Mueller- Hinton- Blutagarplatten auch Selektivnährböden, vor allem MacConkey- Nährböden, insbesondere zum Nachweis der Enterobakterien verwendet. Zur Speziesdifferenzierung wurde die Bunte Reihe für Enterobakterien oder ein API 20 E- Testsystem (ein miniaturisiertes System zur Identifizierung von Enterobakterien und anderer gramnegativer Stäbchen mit Hilfe von 23 standardisierten biochemischen Reaktionen; API= Analytischer- Profil- Index; E= Enterobakterien) sowie auch andere API- Systeme von BioMérieux (BioMérieux GmbH, Nürtingen, Deutschland) wie das API 20 NE- Testsystem (NE= Nicht Enterobakterien) eingesetzt. Bei der Identifizierung von Staphylokokken und Streptokokken kam nach der Anzucht ein Differenzierungsschema speziell für diese Erreger zum Einsatz. Die Einteilung der Streptokokken in Serogruppen, z.B. C oder D, erfolgte mittels Latexagglutination.

2.3.3.2 Zuordnung der Erreger in verschiedene Gruppen

Nach Bestimmung der Erreger wurde jeweils getrennt für Blutproben und Abdominalabstriche ausgezählt, wie häufig welche der einzelnen Erreger sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der späten Hyperoxiegruppe insgesamt nachgewiesen worden waren. Mit Unterstützung von Frau Dr. med. vet. Petra Kirsch (Laborbereich Mikrobiologie und Pathologie, Tierforschungszentrum Universität Ulm) wurden den Erregern Eigenschaften bezüglich ihrer Virulenz und ihres Sauerstoffbedarfs zugeordnet. Dabei wurde berücksichtigt, dass es sich bei manchen Keimen um Bakterien handelt, die sowohl mit definierten Krankheitsbildern bei immunkompetenten Personen oder Tieren in Zusammenhang stehen als auch Erkrankungen bei Abwehrgeschwächten hervorrufen.

Ebenso kamen Bakterien vor, bei denen es nur wenige Berichte zu Erkrankungen in der Literatur gibt, was auch beachtet wurde. Um eine sinnvolle Einteilung und Auswertung sowie einen geeigneten Vergleich zwischen den Versuchsgruppen zu gewährleisten und einen eventuellen Unterschied bezüglich der Mikrobiologie zwischen der Kontrollgruppe und der späten Hyperoxiegruppe festzustellen, wurden die nachgewiesenen Erreger in den Blutproben und in den Abdominalabstrichen bezüglich ihrer Pathogenität und ihrem Sauerstoffbedarf in jeweils zwei Gruppen eingeteilt. So ergaben sich die Gruppen „pathogen“ und „apathogen“ sowie „aerob“ und „anaerob“, in die die Zuordnung der ausgezählten absoluten Häufigkeiten der jeweiligen Bakterien in der Kontroll- und späten Hyperoxiegruppe erfolgte. Dabei wurden die Erreger, bei denen wenig Krankheitsberichte existieren, der apathogenen Gruppe und solche mit fakultativ pathogenen Eigenschaften der pathogenen Gruppe zugeordnet. Die fakultativ anaeroben Erreger wurden der anaeroben Gruppe subsumiert. Negative Blutproben wurden bei der Auswertung ebenfalls berücksichtigt.

2.4 Datenverarbeitung und Statistik

Zur Dokumentation der Daten und zur Durchführung der deskriptiven Statistik wurde das Programm Microsoft Office Excel 2003 verwendet. Außer bei den mikrobiologischen Ergebnissen, bei denen es sich um absolute Häufigkeiten handelt, wurden für die Ergebnisse der beiden Versuchsgruppen der Median, Minimal- und Maximalwert berechnet. Diese Werte werden im laufenden Text oder in Abbildungen aufgeführt. Des Weiteren wurde das 1. und 3. Quartil (entspricht dem 25 %- und dem 75 %- Quantil) berechnet. Für das Erstellen der Diagramme kam das Programm Sigma Plot für Windows Version 10.0 zum Einsatz. In den Box- and- Whisker- Plots sind als Begrenzung der Box das 1. und 3. Quartil und in der Mitte der Median dargestellt. Die Minimal- und Maximalwerte sind durch Punkte gekennzeichnet. Die Whiskers begrenzen zusätzlich das 10 %- und das 90 %- Quantil. Die statistische Berechnung und Auswertung erfolgte mit dem Programm Sigma Stat für Windows Version 3.5. Es kamen zwei statistische Testverfahren zum Einsatz. Für die mikrobiologischen Ergebnisse der beiden Versuchsgruppen wurde der Fisher's exact Test angewendet, zum Vergleich der anderen Ergebnisse der Kontroll- und späten Hyperoxiegruppe erfolgte die Durchführung des Mann- Whitney Rangsummentests. Das Signifikanzniveau wurde bei beiden auf $\alpha = 0,05$ festgelegt. Der p- Wert bezeichnet die Überschreitungswahrscheinlichkeit.

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeine Erhebungsdaten

Für die Studie kamen 20 deutsche Hausschweine beiderlei Geschlechts zur Verwendung. Ein weiteres Tier verstarb frühzeitig vor Versuchsende und konnte so nicht mit in die Studie aufgenommen werden. In jeder Versuchsgruppe, d.h. sowohl in der Kontroll- als auch in der späten Hyperoxiegruppe, wurden jeweils 10 Schweine verwendet. In der Kontrollgruppe hatten die Tiere ein medianes Gewicht von 51,0 kg (46,0- 58,5 kg). Das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Schweinen war 7:3. In der späten Hyperoxiegruppe lag das Gewicht der Tiere im Median bei 48,5 kg (41,0- 54,0 kg). Das Verhältnis der Geschlechter konnte in dieser Versuchsgruppe mit männlich 4 zu weiblich 6 angegeben werden.

3.2 Histologische Ergebnisse

3.2.1 HE- und PAS- Färbungen der Lunge

3.2.1.1 Histomorphologische Veränderungen

Die festzustellenden histomorphologischen Veränderungen der Lungengewebeschnitte anhand der HE- und PAS- Färbungen entsprachen denen, wie sie bei der formalen Pathogenese eines diffusen Alveolarschadensyndroms in der Lunge zu beobachten sind. Sie konnten, wie bereits im Teil Material und Methoden erläutert (*siehe Kapitel 2.3.1.4*), in vier Schweregrade eingeteilt werden und jeder Lungenprobe wurde ein solcher zugeordnet. Im Folgenden sind als histomorphologisches Ergebnis zunächst die Charakteristika der einzelnen Schweregrade dargelegt.

Ergebnisse

Schweregrad 1 – „Noch weitgehend normal“:

Die Schnitte diesen Schweregrades (siehe sich anschließende Abbildungen 4 und 5) zeigten dünne, bindegewebige Alveolarsepten (Alveolarseptendicke durchschnittlich $< 7 \mu\text{m}$) mit keinem oder nur geringem Ödem sowie auch kein interstitielles Ödem. Es konnten weder hyaline Membranen noch fibröse Veränderungen festgestellt werden. Entzündungszellen waren überwiegend keine zu sehen, nur teilweise wurden wenige identifiziert.

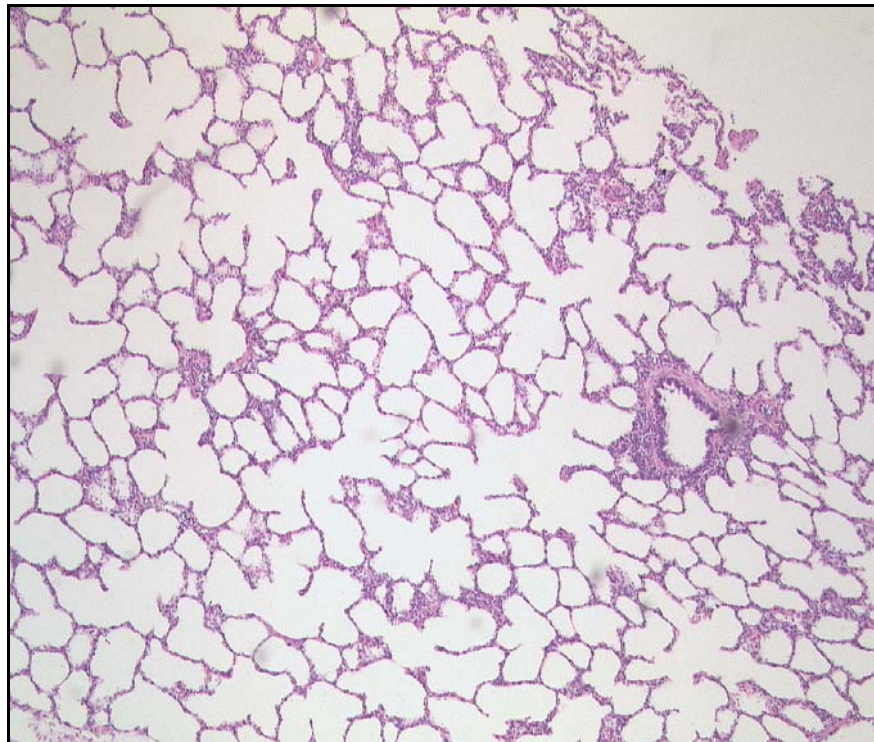


Abbildung 4:

Beispiel einer HE- Färbung in der Übersicht mit dem Schweregrad 1. Es handelt sich um eine 50-fache Vergrößerung (Okular 10x + Objektiv 5x). Es sind die dünnen Alveolarsepten und nahezu fast überall fehlende Ödeme zu erkennen.

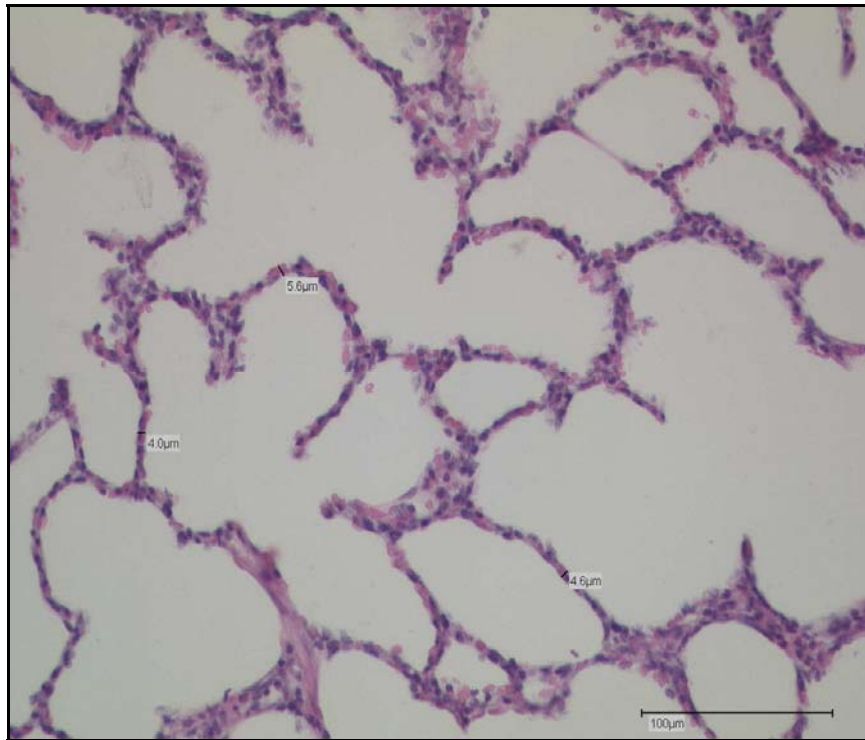


Abbildung 5:

Die Abbildung zeigt eine HE- Färbung im Detail mit dem Schweregrad 1. Die Vergrößerung beträgt 200x, das heißt Okular 10x und Objektiv 20x. Die Messungen zeigen, dass sich die Alveolarseptendicke durchschnittlich unterhalb von 7 μm befand.

Schweregrad 2 – „Serös- exudative Alveolitis“:

Bei diesem Schweregrad kommt es zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren und einer serösen Exudationsreaktion. In den Gewebeproben (siehe sich anschließende Abbildungen 6 und 7) war ein leichtes septales Ödem zu erkennen, das zu leicht verbreiterten Alveolarsepten führte. Die Alveolarseptendicke betrug durchschnittlich zwischen 7 und 14 μm. Es zeigte sich ebenfalls ein leichtes interstitielles Ödem. Dies äußerte sich durch gestaute Gefäße sowie durch mäßig zu beobachtende Entzündungszellen und wenige Stellen verdichteten Gewebes. Es konnten nur teilweise ganz geringe Atelektasen aufgrund der Ödeme, allerdings weder hyaline Membranen noch Anzeichen einer Fibrose festgestellt werden.

Ergebnisse

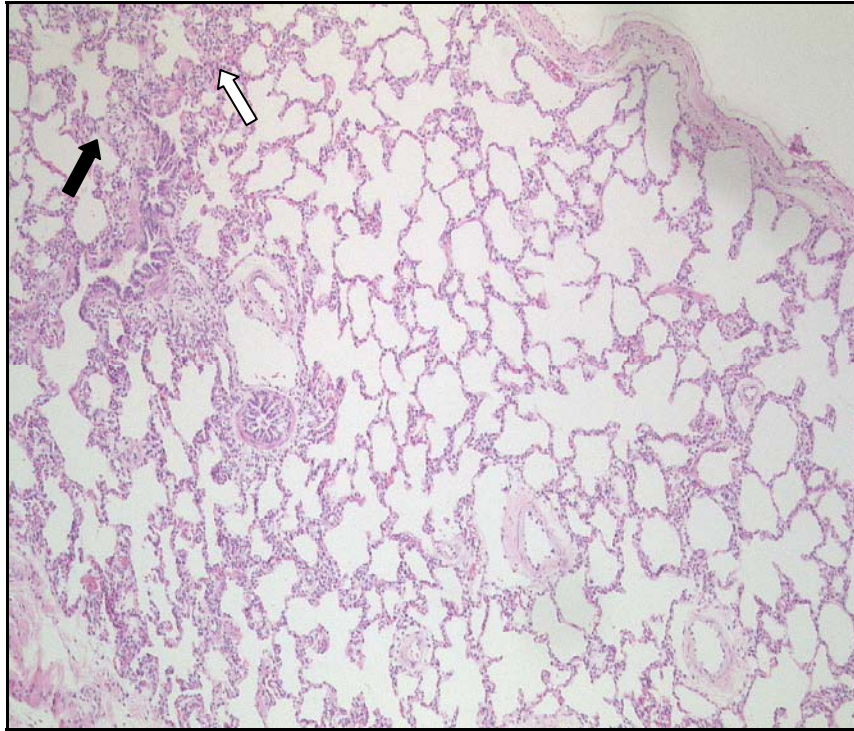


Abbildung 6:

Zu sehen ist eine HE- Färbung mit histomorphologischen Veränderungen dem Schweregrad 2 entsprechend. Es handelt sich um eine Übersicht in 50- facher Vergrößerung (Okular 10x und Objektiv 5x). Man erkennt die leicht verbreiterten Alveolarsepten durch das septale Ödem sowie das leichte interstitielle Ödem, das sich unter anderem in leicht gestauten Gefäßen (schwarzer Pfeil) und in leicht verdichtetem Gewebe (weißer Pfeil) an wenigen Stellen äußerte. (Die Markierungen in der Abbildung sind beispielhaft gewählt).

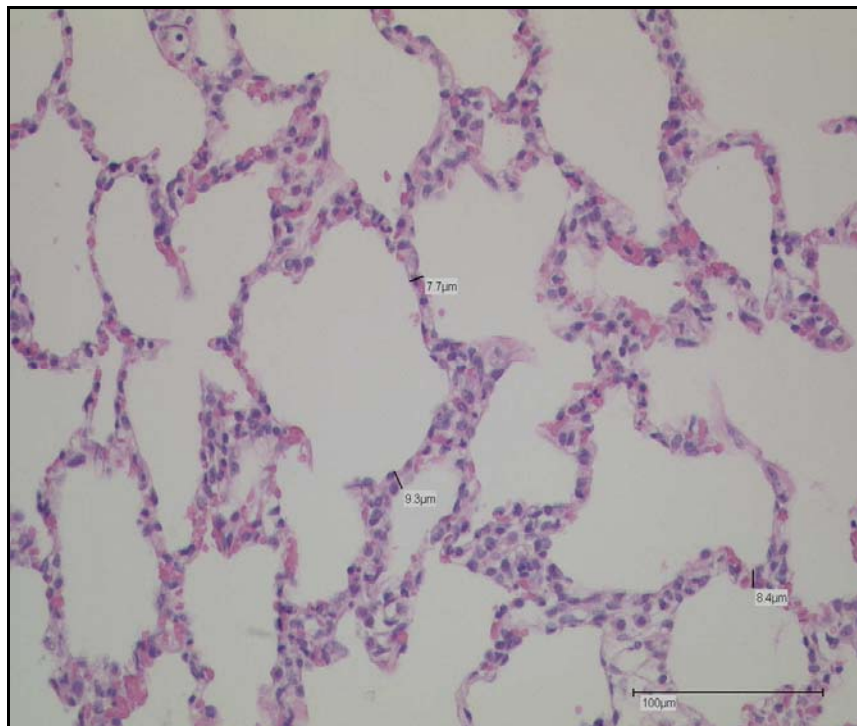


Abbildung 7:

Beispiel einer HE- Färbung der Gewebeproben mit dem Schweregrad 2 im Detail (200- fache Vergrößerung, die sich aus Okular 10x und Objektiv 20x zusammensetzt). Die Messungen weisen auf eine durchschnittliche Alveolarseptendicke zwischen 7 und 14 µm hin.

Schweregrad 3 – „Fibrinexudation und hyaline Membranen“:

Die Lungengewebeschnitte, denen dieser Schweregrad zugeordnet wurde (siehe sich anschließende Abbildungen 8, 9 und 10), zeigten massiv septale Ödeme und dementsprechend dicke Alveolarsepten ($> 14 \mu\text{m}$). Auch interstitielle Ödeme waren mäßig vorhanden, vor allem durch die serofibrinöse Exudationsreaktion. Es konnten teilweise vermehrt Entzündungszellen sowie mäßig atelektatische Areale, mäßig gestaute Gefäße und Stellen mäßig verdichteten Gewebes festgestellt werden. Im Gegensatz zu fibrösen Veränderungen wurden hyaline Membranen und Fibrinablagerungen beobachtet.

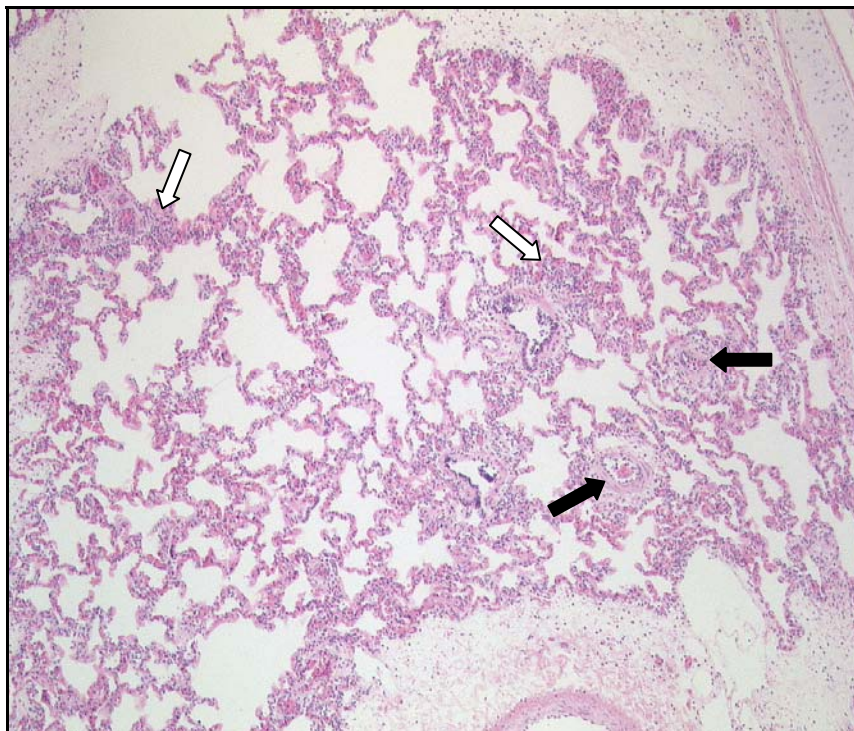


Abbildung 8:

Die Abbildung zeigt den Schweregrad 3 anhand einer HE- Übersichts- Färbung in einer Vergrößerung von 50x (Okular 10x + Objektiv 5x). Zu sehen sind die dicken Alveolarsepten durch das septale Ödem sowie mäßig gestaute Gefäße (schwarze Pfeile) und mäßig verdichtete Gewebeareale (weiße Pfeile) durch das interstitielle Ödem. (Die Markierungen in der Abbildung sind beispielhaft gewählt).

Ergebnisse

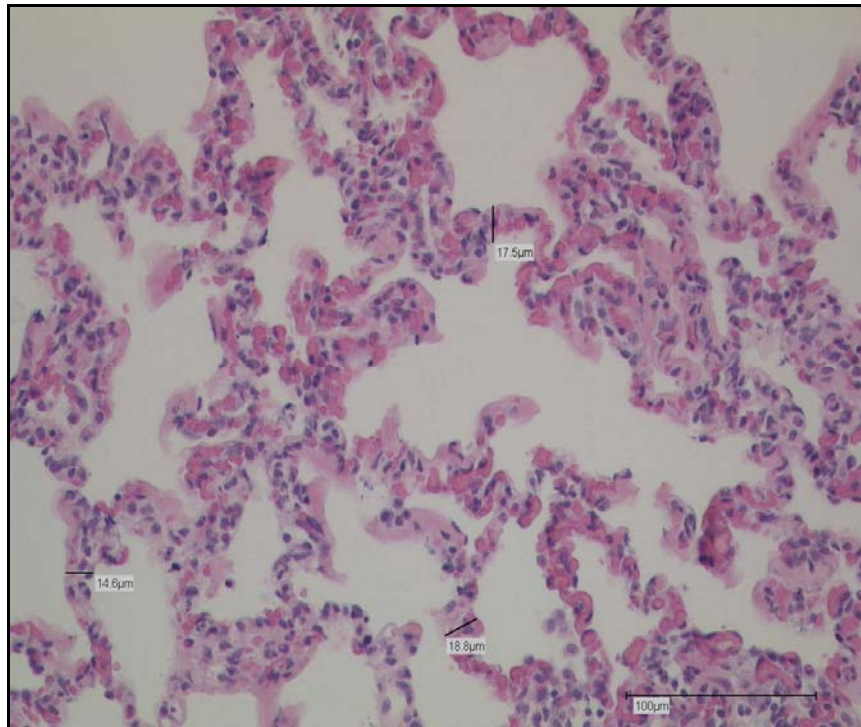


Abbildung 9:

Es ist eine HE- Färbung des Schweregrades 3 in Detailvergrößerung (200x; Okular 10x und Objektiv 20x) mit drei beispielhaften Messungen der Alveolarseptendicke zu sehen. Diese lag durchschnittlich bei mehr als 14 µm.

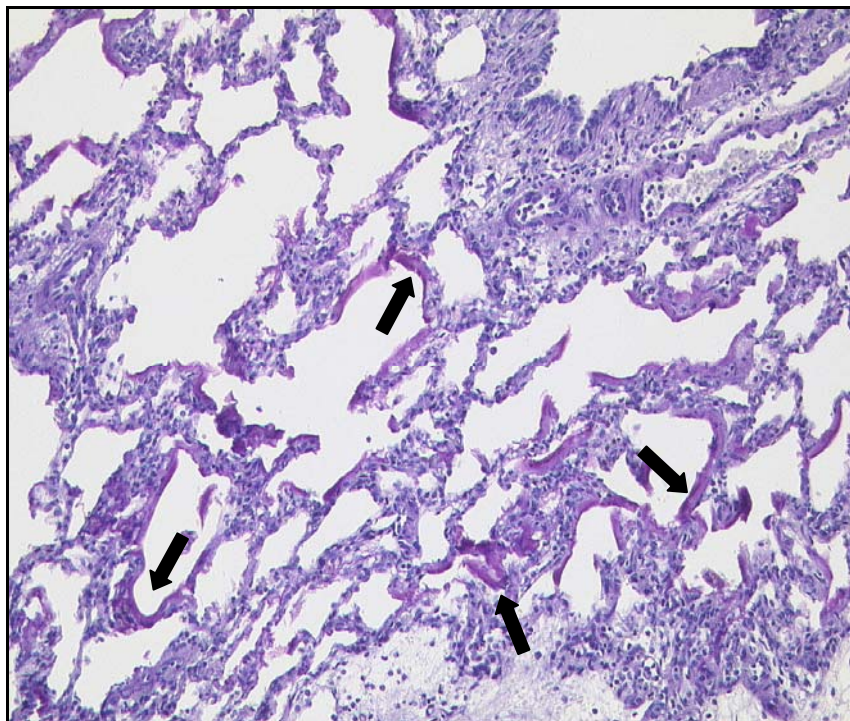


Abbildung 10:

Beispiel einer PAS- Färbung in 50- facher Vergrößerung (Okular 10x + Objektiv 5x). Es sind hyaline Membranen als amorphes PAS- positives Material (schwarze Pfeile) zu erkennen, die charakteristisch für den Schweregrad 3 waren. (Die Markierungen in der Abbildung sind beispielhaft gewählt).

Schweregrad 4 – „Fokale interstitielle Fibrose und Beginn der Organisation (sklerosierende Alveolitis)“:

Bei den Lungengewebeschnitten diesen Schweregrades (siehe sich anschließende Abbildungen 11 und 12) konnten wie bei Schweregrad 3 ebenfalls septale und interstitielle Ödeme mit dicken Alveolarsepten sowie verdichtetes Gewebe und Entzündungszellen festgestellt werden. Teilweise konnten Mikroatelektasen und ein subpleurales Ödem erkannt werden. Charakteristisch waren das Fehlen von hyalinen Membranen, die in diesem Stadium wieder verschwinden, und das Vorhandensein von fokaler interstitieller Fibrose, teilweise sehr zellreich (unter anderem Schaumzellen), mit Beginn der Organisation, das heißt Beginn der Exudatresorption, der kubischen Alveolarepitheltransformation und des fehlgeneratorischen Umbaus der Alveolarwände durch proliferierende Lungenfibroblasten.

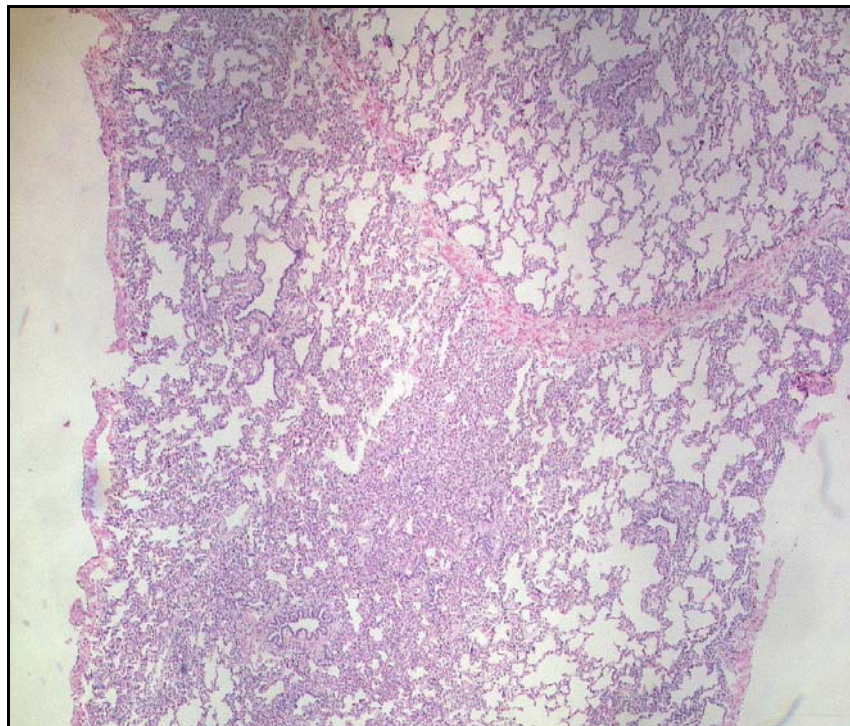


Abbildung 11:

Die oben stehende Abbildung ist ein Beispiel für eine HE- Färbung eines Lungengewebeschnittes des Schweregrades 4. Es handelt sich um eine 25- fache Vergrößerung (Okular 10x + Objektiv 2,5x). Zu sehen sind die septalen und interstitiellen Ödeme und stark verdichtetes Gewebe sowie die fokalen interstitiellen Fibrosen und somit der Beginn der Organisation.

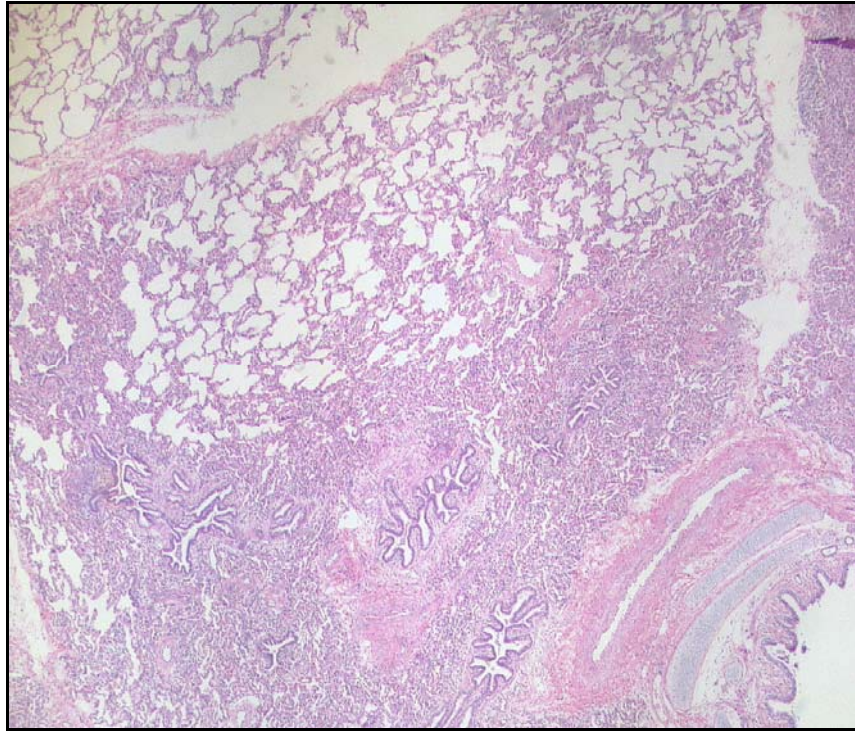


Abbildung 12:

Die oben stehende Abbildung ist ein weiteres Beispiel für eine HE- Färbung eines Lungengewebeschnittes des Schweregrades 4. Es handelt sich um eine 25- fache Vergrößerung (Okular 10x + Objektiv 2,5x). Zu sehen sind ebenso die septalen und interstitiellen Ödeme und stark verdichtetes Gewebe sowie die fokalen interstitiellen Fibrosen und somit der Beginn der Organisation.

3.2.1.2 Vergleich der beiden Versuchsgruppen

In der späten Hyperoxiegruppe konnte, wie Abbildung 13 zeigt, die histomorphologischen Schäden in den Lungengewebeschnitten betreffend, eine ganz leichte Tendenz zu den höheren Schweregraden festgestellt werden, im Gegensatz zur Kontrollgruppe, die eher niedrigere Schweregrade aufwies. Statistisch gesehen konnte aber kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen bezüglich des Schweregrades der histomorphologischen Veränderungen nachgewiesen werden (p- Wert= 0,496 im Mann-Whitney Rangsummentest).

Ergebnisse

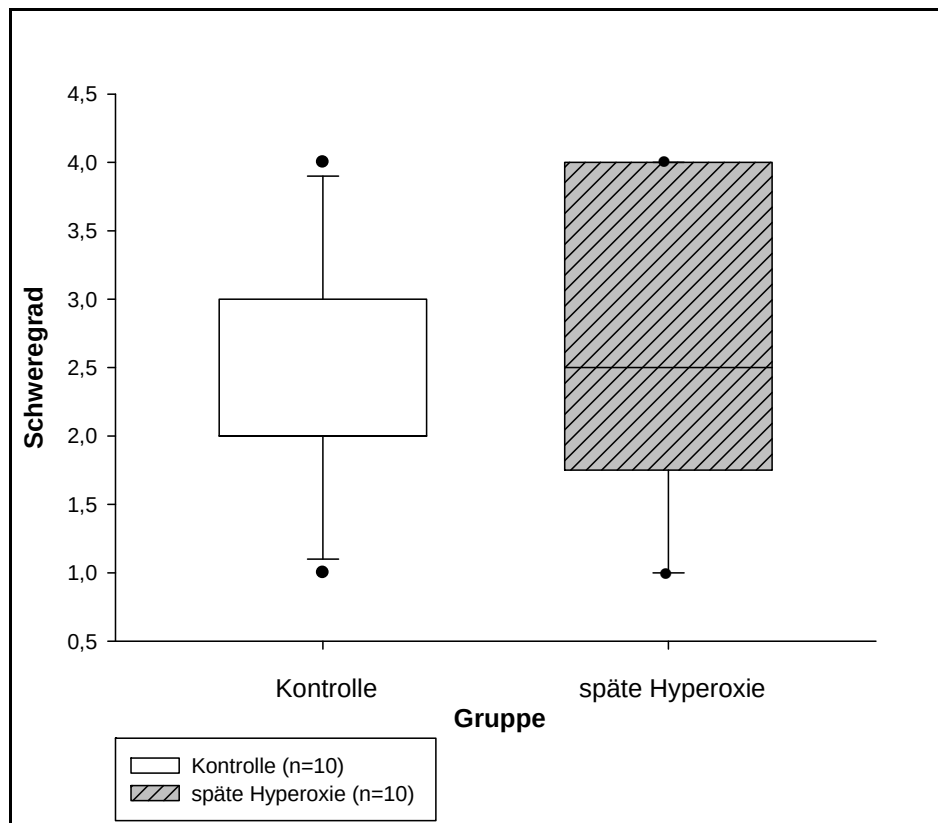


Abbildung 13:

Darstellung des Schweregrades der histomorphologischen Lungenveränderungen in der Kontroll- und späten Hyperoxiegruppe. Dargestellt sind jeweils der Median, das 1. und 3. Quartil, das 10 %- und 90 %- Quantil und das vorher bekannte Minimum und Maximum. n= Anzahl der Tiere. p-Wert= 0,496 => kein signifikanter Unterschied (p= Überschreitungswahrscheinlichkeit).

Um den nicht signifikanten Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen noch deutlicher zu machen, sind im Folgenden im Vergleich sowohl für die Kontroll- als auch für die späte Hyperoxiegruppe die absoluten Häufigkeiten der einzelnen Schweregrade bezüglich der histomorphologischen Veränderungen in den Lungengewebeschnitten dargestellt (siehe nachstehende Abbildung 14).

Ergebnisse

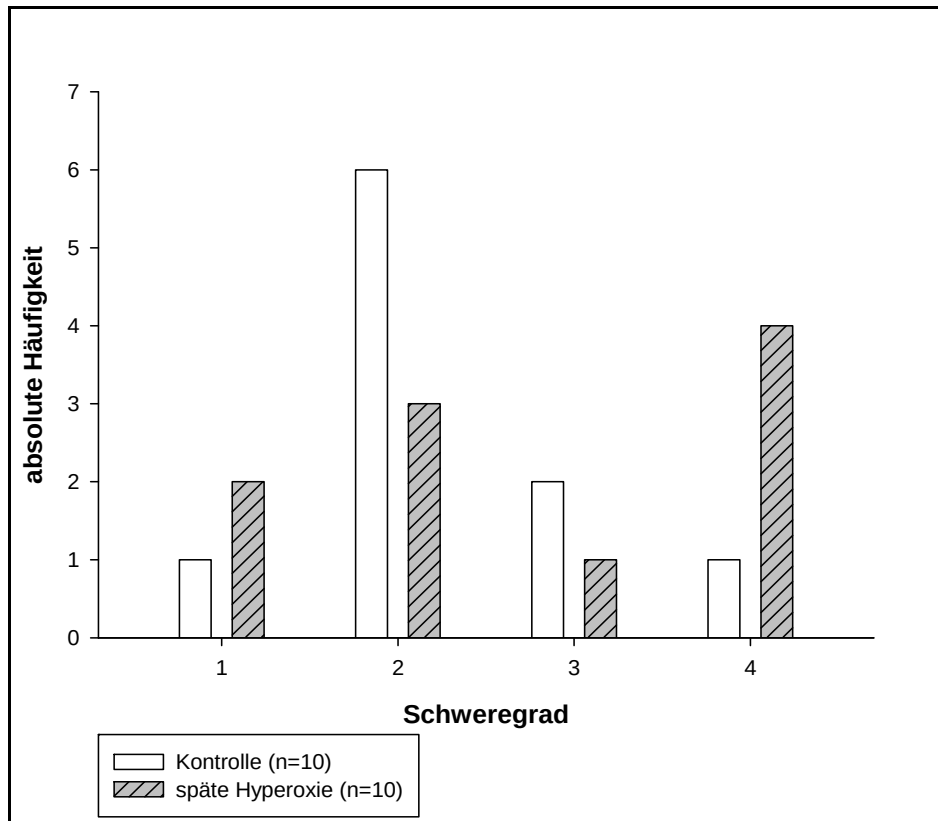


Abbildung 14:

Der Abbildung sind, was die histomorphologischen Veränderungen der Lunge anbelangt, die absoluten Häufigkeiten der einzelnen Schweregrade sowohl für die Kontroll- als auch für die späte Hyperoxiegruppe im Vergleich zu entnehmen. n= Anzahl der Tiere.

3.2.2 HE- Färbungen der Leber

Bei der morphologischen Begutachtung der gesamten HE- Färbungen der Leber war eine quantitative Beurteilung nicht möglich. Es erfolgte eine qualitative Auswertung der Lebergewebeschnitte und somit ein qualitativer Vergleich der späten Hyperoxiegruppe und der Kontrollgruppe. Es zeichneten sich keine auffälligen Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen ab. In jeder Versuchsgruppe zeigten die Lebergewebeschnitte das Bild einer minimalen akuten Stauung. Bereits makroskopisch, das heißt bevor die Leberproben zu histologischen Schnitten verarbeitet wurden, waren auf der Schnittfläche der Leberproben wenige rote, punktförmige eingesunkene Bezirke aufgefallen. Sie entsprechen den blutreichen Zentralvenen und den erweiterten läppchenzentralen Sinusoiden, was mit einer minimalen akuten Stauung korreliert. Im Folgenden wird beschrieben, was histologisch in den HE- Färbungen der Leber festzustellen war.

Wie bereits angedeutet, entsprach auch das histologische Bild einer minimalen akuten Stauung. Die Zentralvenen und die Sinusoide der Zone 3 zeigten sich geringgradig dilatiert, was auch als perivenuläre Sinusdilatation bezeichnet werden kann und sich als

Ergebnisse

zentrale Stauungsstraßen zeigt. Dies führt an diesen Stellen zu einem leichten Eindrücken der Leberzellplatten und somit zu einer geringgradigen Atrophie der läppchenzentralen Hepatozyten. Die Hepatozytenbalkchen imponierten daher in diesen Bereichen als leicht verschmälert und dissoziiert. Durch eine teilweise geringe Ödembildung konnte an manchen Stellen läppchenzentral der Disse- Raum gesehen werden. Ansonsten zeigte sich insgesamt in den Schnitten ein regelrecht aufgebautes läppchenartig strukturiertes Lebergewebe mit in Gestalt und Anzahl regelrechten Portalfeldern. Die Gallengänge stellten sich mit erhaltener Basalmembran dar. Es konnte keine Vaskulitis, keine Cholangitis, keine Grenzzonenhepatitis, keine Aktivierung des Sternzellsystems und auch keine wesentliche Fibrose festgestellt werden. Außer den bereits oben beschriebenen Veränderungen zeigten die Hepatozyten sonst ein ruhiges Kernbild sowie eine einschichtige trabekuläre Anordnung. Die folgenden Abbildungen 15 und 16 zeigen die beschriebenen histomorphologischen Merkmale der Leber.

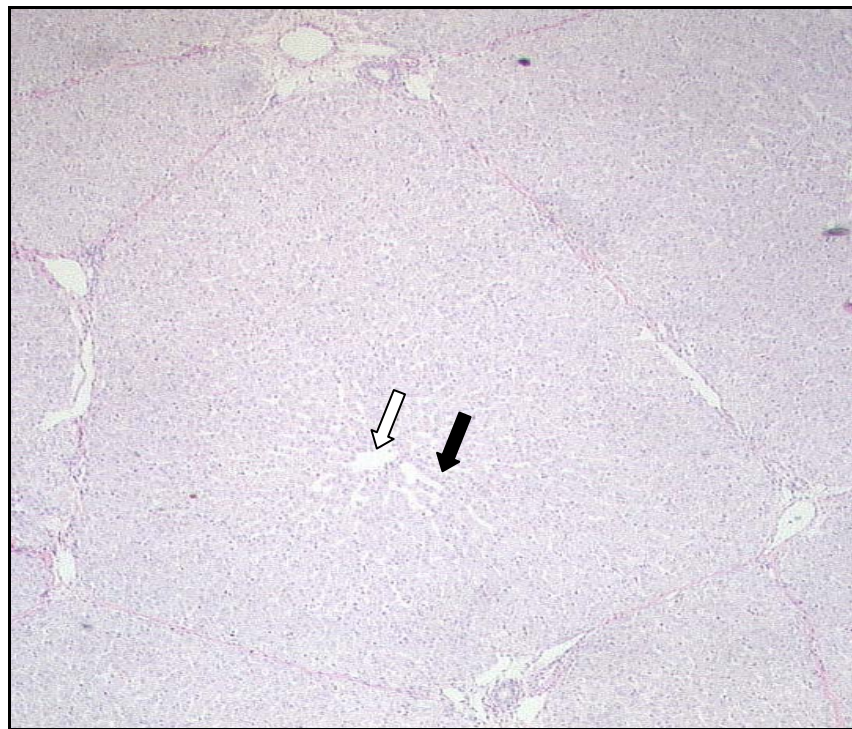


Abbildung 15:

HE- Färbung der Leber mit Darstellung der histomorphologischen Veränderungen. Es handelt sich um eine 25- fache Vergrößerung (Okular 10x + Objektiv 2,5x). Zu sehen ist ein Zentralvenen-Läppchen. Es lässt sich die geringgradig gestaute Zentralvene (weißer Pfeil) sowie um diese herum die geringgradig dilatierten Sinusoide (schwarzer Pfeil) der Zone 3 mit den dortigen leicht eingedrückten Leberzellplatten erkennen. (Die Markierungen in der Abbildung sind beispielhaft gewählt).



Abbildung 16:

Ein weiteres Beispiel einer HE- Färbung der Leber mit Darstellung der histomorphologischen Veränderungen. Die Vergrößerung beträgt 50 x (Okular 10x + Objektiv 5x). Zu sehen ist ein Zentralvenen- Läppchen. Es lässt sich die geringgradig gestaute Zentralvene (weißer Pfeil) sowie um diese herum die geringgradig dilatierten Sinusoide (schwarzer Pfeil) der Zone 3 mit den dortigen leicht eingedrückten Leberzellplatten erkennen. (Die Markierungen in der Abbildung sind beispielhaft gewählt).

3.2.3 TUNEL- Färbung der Lunge

Beim Vergleich der Anzahl apoptotischer Zellen pro 25 hochauflösenden Gesichtsfeldern (HPFs= **high power fields**) in den beiden Versuchsgruppen ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied, wie die untenstehende Abbildung 17 zeigt. Die Biopsien der Kontrollgruppe zeigten deutlich höhere Apoptosezahlen als die der späten Hyperoxiegruppe (p- Wert< 0,001 im Mann- Whitney Rangsummentest). Abbildung 18 auf der nächsten Seite veranschaulicht ein Beispiel einer TUNEL- Färbung der Lunge.

Ergebnisse

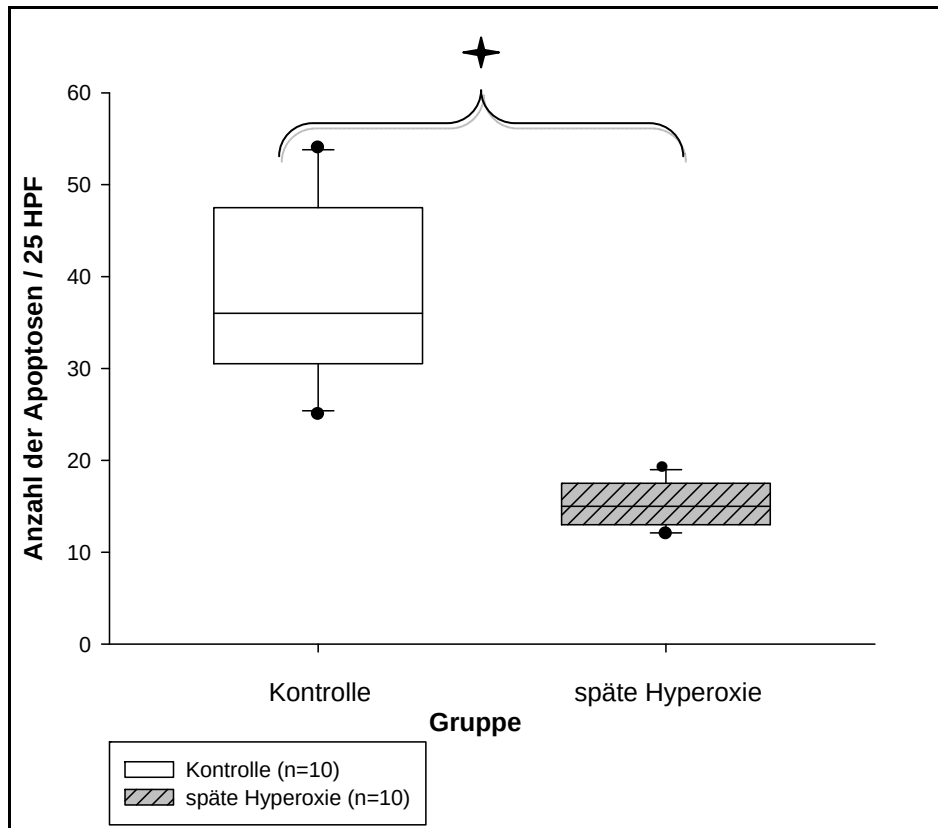


Abbildung 17:

Es wird zum Vergleich sowohl für die Kontrollgruppe als auch für die späte Hyperoxiegruppe jeweils die Anzahl der Apoptosen pro 25 HPFs (high power fields) gezeigt. Dargestellt sind jeweils der Median, das 1. und 3. Quartil, das 10 %- und 90 %- Quantil sowie das Minimum und Maximum. n= Anzahl der Tiere. * => p- Wert < 0,001 => signifikanter Unterschied (p= Überschreitungswahrscheinlichkeit).

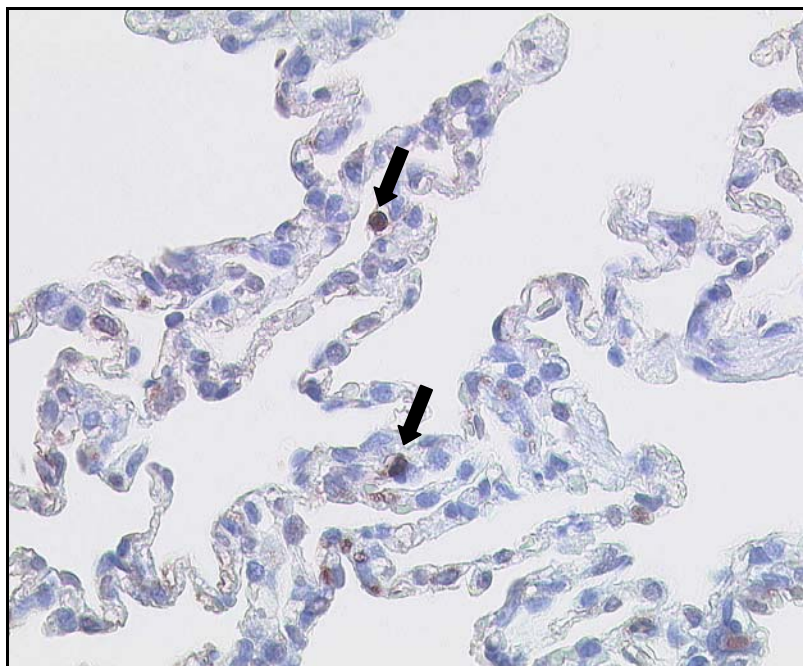


Abbildung 18:

Beispiel einer TUNEL- Färbung der Lunge. Dunkelrot angefärbt zeigen sich die Nuclei (Pfeile), die eine Apoptose durchlaufen. Es handelt sich um eine 400- fache Vergrößerung (Okular 10x und Objektiv 40x).

3.2.4 TUNEL- Färbung der Leber

Die Lebergewebeschnitte der Kontrollgruppe wiesen in der TUNEL- Färbung höhere Anzahlen an Apoptosen pro 25 hochauflösenden Gesichtsfeldern (HPFs= **h**igh **p**ower **f**ields) auf als die Leberproben der späten Hyperoxiegruppe. Dennoch erreichte dieser Unterschied knapp keine statistische Signifikanz im durchgeführten Mann- Whitney- Rangsummentest (p- Wert= 0,066) (siehe Abbildung 19). Die Abbildung 20 zeigt ein Beispiel einer TUNEL- Färbung der Leber.

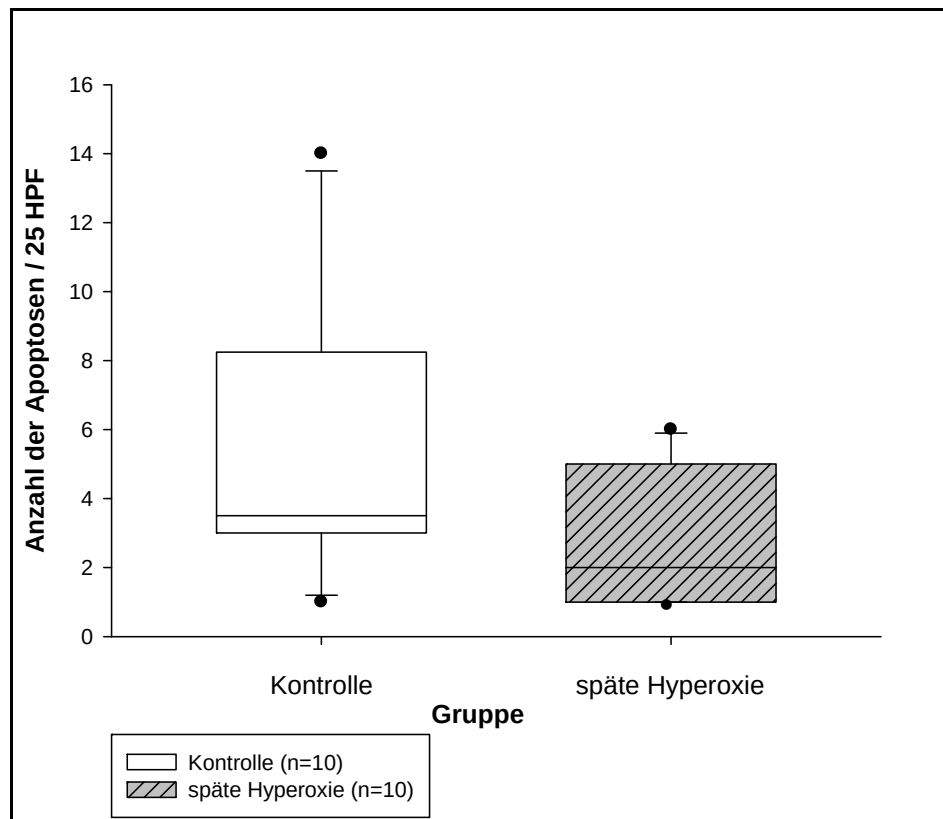


Abbildung 19:

Darstellung der Anzahl angefärbter Zellkerne pro 25 HPFs (= high power fields) in der TUNEL- Färbung für die Lebergewebeschnitte der Kontroll- und der späten Hyperoxiegruppe. Dargestellt sind jeweils der Median, das 1. und 3. Quartil, das 10 %- und 90 %- Quantil sowie der Minimal- und Maximalwert. n= Anzahl der Tiere. p- Wert= 0,066 => kein signifikanter Unterschied (p= Überschreitungswahrscheinlichkeit).

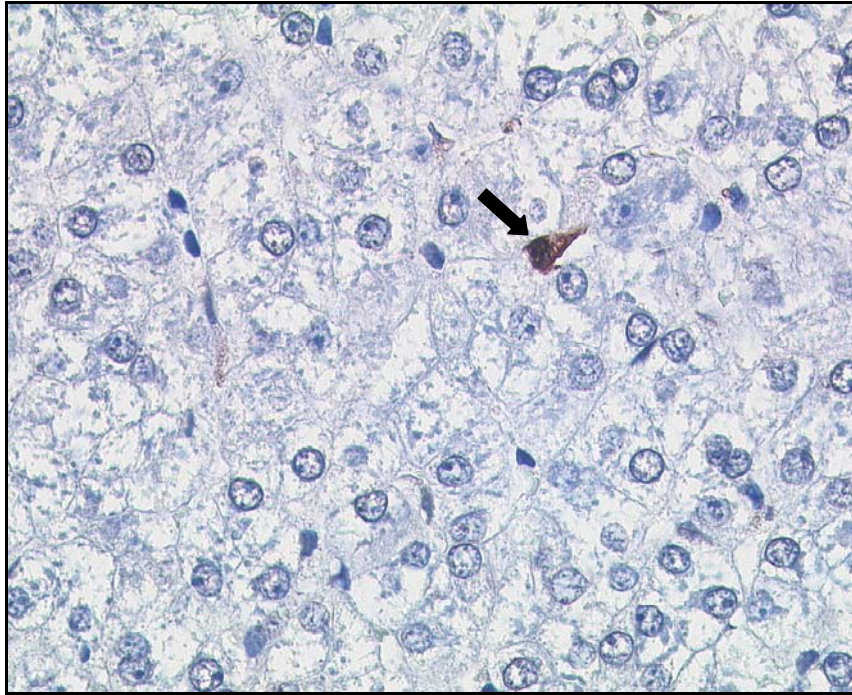


Abbildung 20:

Die Abbildung zeigt ein Beispiel einer TUNEL- Färbung eines Lebergewebeschnittes. Zu sehen ist ein dunkelrot angefärbter apoptotischer Nucleus (Pfeil). Die Vergrößerung beträgt 400x, zusammengesetzt aus Okular 10x und Objektiv 40x.

3.3 Aktivität der antioxidativen Enzyme SOD und Katalase

3.3.1 Aktivität der SOD in der Lunge

In der späten Hyperoxiegruppe zeigten sich, wie in Abbildung 21 zu sehen, leicht höhere Werte bezüglich der SOD- Aktivität [U/mg Protein] als in der Kontrollgruppe. Es konnte aber kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen nachgewiesen werden (p-Wert= 0.079 im Mann- Whitney Rangsummentest; p steht für „Überschreitungswahrscheinlichkeit“).

Ergebnisse

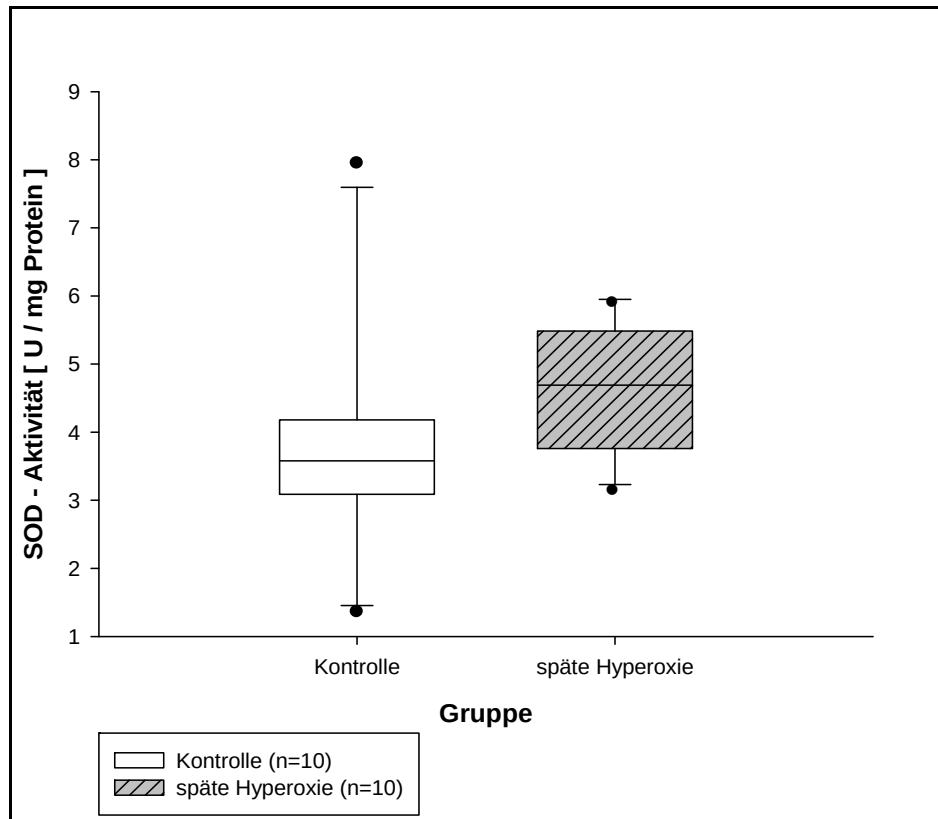


Abbildung 21:

Darstellung der SOD- Aktivität der Lunge in U/mg Protein in der Kontroll- und späten Hyperoxiegruppe. Dargestellt sind jeweils der Median, das 1. und 3. Quartil, das 10 %- und 90 %-Quantil sowie das Minimum und das Maximum. n= Anzahl der Tiere. p- Wert= 0,079 => kein signifikanter Unterschied (p= Überschreitungswahrscheinlichkeit).

3.3.2 Aktivität der SOD in der Leber

Zwischen der bestimmten SOD- Aktivität [U/mg Protein] der Leber in den beiden Versuchsgruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied, auch wenn die mediane Aktivität in der späten Hyperoxiegruppe ein wenig höher war als in der Kontrollgruppe und die Werte der Kontrollgruppe etwas verstreuter lagen als in der späten Hyperoxiegruppe (p- Wert= 0,903 im Mann- Whitney Rangsummentest). Dies zeigt die nachstehende Abbildung.

Ergebnisse

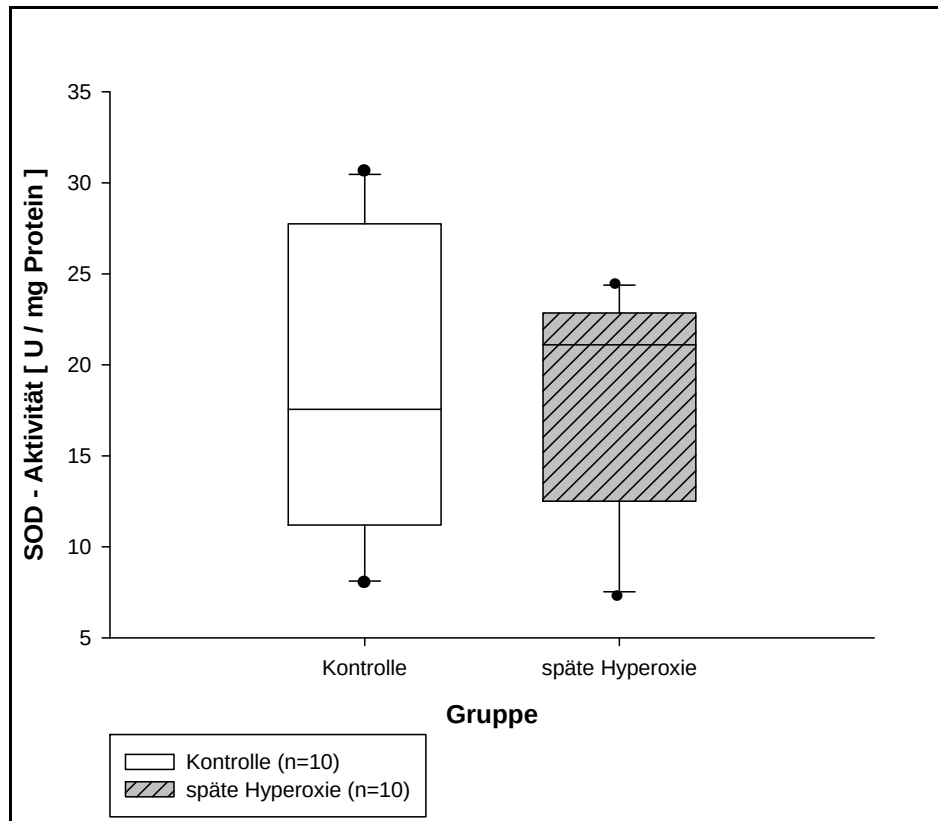


Abbildung 22:

Es ist die SOD- Aktivität [U/mg Protein] der beiden Versuchsgruppen in der Leber dargestellt. Abzulesen sind jeweils der Median, das 1. und 3. Quartil, das 10 %- und 90 %- Quantil sowie der Minimal- und Maximalwert. n= Anzahl der Tiere. p- Wert= 0,903 => kein signifikanter Unterschied (p= Überschreitungswahrscheinlichkeit).

3.3.3 Aktivität der Katalase in der Lunge

Trotz einer etwas stärkeren Streuung der Werte und eines höheren Medians in der späten Hyperoxiegruppe konnte kein wesentlicher Unterschied bezüglich der Katalase- Aktivität, angegeben in U/mg Protein, in der Lunge zwischen dieser und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Dies ist ebenso der sich anschließenden Abbildung 23 zu entnehmen. Im Mann- Whitney Rangsummentest erwies sich der Unterschied der Ergebnisse als nicht signifikant (p- Wert= 0,653).

Ergebnisse

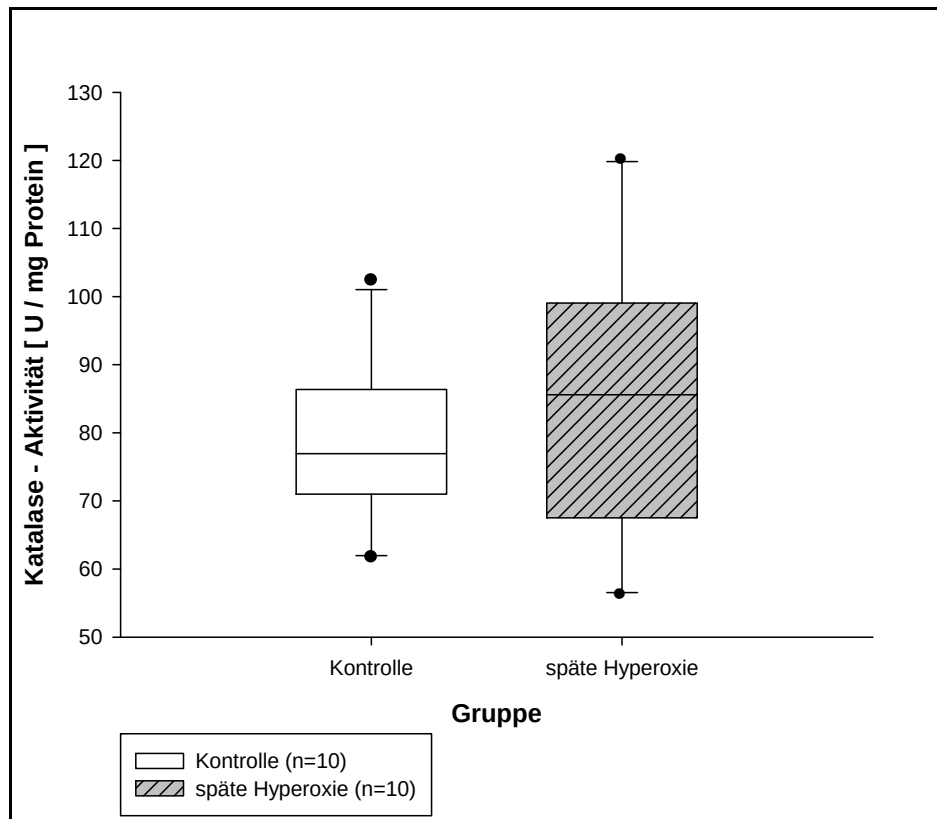


Abbildung 23:

Darstellung der Katalase- Aktivität [U/mg Protein] der beiden Versuchsgruppen in der Lunge. Dargestellt sind jeweils der Median, das 1. und 3. Quartil, das 10 %- und 90 %- Quantil sowie das Minimum und Maximum. n= Anzahl der Tiere. p-Wert= 0,653 => kein signifikanter Unterschied (p= Überschreitungswahrscheinlichkeit).

3.3.4 Aktivität der Katalase in der Leber

Es konnte kaum ein Unterschied bezüglich der Katalase- Aktivität [U/mg Protein] in der Leber zwischen den beiden Versuchsgruppen nachgewiesen werden (siehe unten in Abbildung 24). Statistisch gesehen ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und der späten Hyperoxiegruppe (p- Wert= 0,967 im Mann- Whitney Rangsummentest).

Ergebnisse

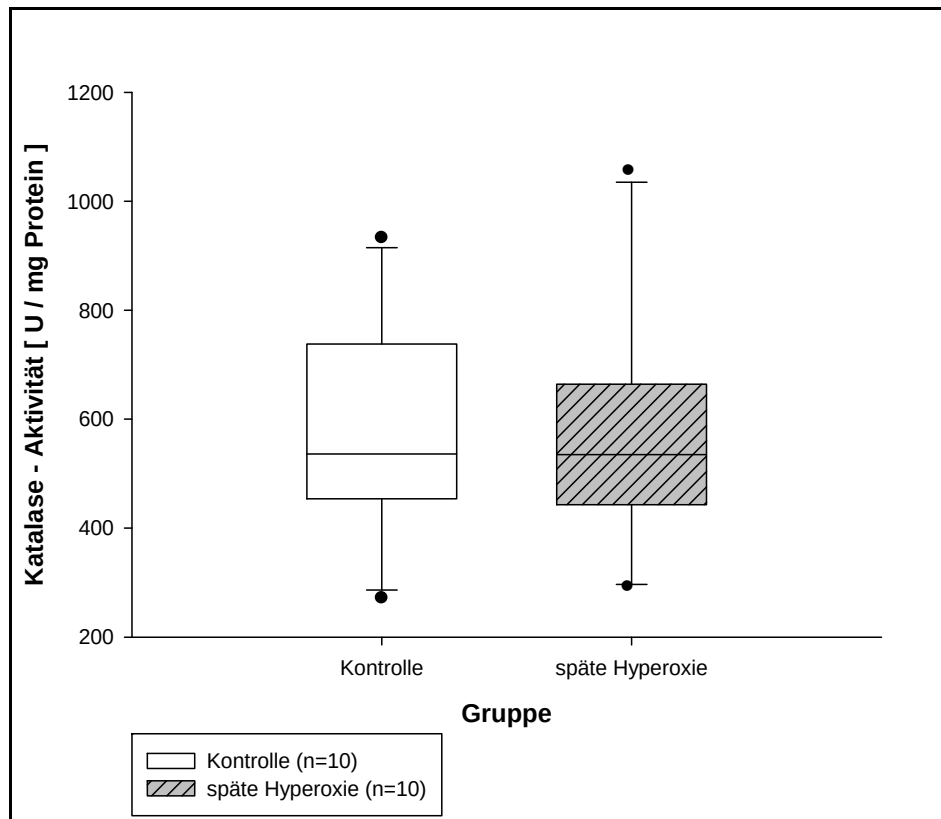


Abbildung 24:

Es wird die Katalase- Aktivität, angegeben in U/mg Protein, in der Leber im Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und der späten Hyperoxiegruppe gezeigt. Es erfolgt jeweils die Darstellung des Medians, des 1. und 3. Quartils, des 10 %- und 90 %- Quantils sowie des Minimal- und Maximalwertes. n= Anzahl der Tiere. p- Wert= 0,967 => kein signifikanter Unterschied (p= Überschreitungswahrscheinlichkeit).

3.4 Mikrobiologische Ergebnisse

3.4.1 Nachgewiesene Erreger in den Blutproben, ihre Eigenschaften und ihre Häufigkeit in den Versuchsgruppen

Es konnten in den Blutproben mehrere verschiedene Erreger unterschiedlich häufig mit unterschiedlicher Pathogenität und unterschiedlichem Sauerstoffbedarf nachgewiesen werden. In der späten Hyperoxiegruppe war im Gegensatz zur Kontrollgruppe eine Blutprobe negativ, in der Kontrollgruppe kamen im Vergleich zur späten Hyperoxiegruppe häufiger unterschiedliche Erreger vor. In beiden Versuchsgruppen konnte das Bakterium *Escherichia coli* am häufigsten nachgewiesen werden. Die nachstehende Tabelle (Tabelle 1) gibt eine Übersicht.

Ergebnisse

Tabelle 1: Erreger in den Blutproben

Die verschiedenen nachgewiesenen Erreger in den Blutproben in beiden Versuchsgruppen mit ihren Eigenschaften bezüglich hauptsächlichem Vorkommen, Pathogenität und Sauerstoffbedarf werden tabelliert. Zusätzlich ist angegeben, in welcher Versuchsgruppe der jeweilige Keim wie oft vorgekommen ist. K= Kontrollgruppe, sH= späte Hyperoxiegruppe.

Erreger	Hauptsächlich Vorkommen	Virulenz/ Pathogenität	Sauerstoffbedarf	Gruppe/ Häufig- keit
Bacteroides ureolyticus	Darmtrakt	Fakultativ pathogen	Anaerob	K/1
Escherichia coli	Darmtrakt, (Umwelt)	Fakultativ pathogen	Fakultativ anaerob	K/8; sH/8
Escherichia hermannii	Darmtrakt, (Umwelt)	Apathogen	Fakultativ anaerob	K/1
Klebsiella pneumoniae	Darmtrakt, Umwelt, auch Atem-, Urogenitaltrakt	Fakultativ pathogen	Fakultativ anaerob	K/1
Lactobacillus spp.	Mund, Darm, Vagina, Lebensmittel	Apathogen, wenige Krankheits-berichte existieren	Fakultativ anaerob und strikt anaerob	K/1
Oralstreptokokken	Mundhöhle, Rachen, Darm-, Urogenitaltrakt	Fakultativ pathogen	Fakultativ anaerob	K/1
Peptostreptococcus spp.	Haut, oberer Atem-, Darm-, Urogenitaltrakt	Fakultativ pathogen	Anaerob	K/1
Proteus mirabilis	Darmtrakt, Umwelt	Fakultativ pathogen	Fakultativ anaerob	K/1
Sporenbildner	Umwelt	Apathogen	Aerob	K/1
Staphylococcus aureus	Haut, Nasenlöcher, auch Darm- und Urogenitaltrakt	Pathogene und fakultativ pathogene Eigenschaften	Fakultativ anaerob	sH/1
Streptococcus mitis	Mundhöhle, Rachen, Darm-, Urogenitaltrakt	Fakultativ pathogen	Fakultativ anaerob	K/1

3.4.2 Vergleich der Erreger in den Blutproben bezüglich ihrer Pathogenität

In der Kontrollgruppe kamen etwas häufiger sowohl pathogene als auch apathogene Keime in den Blutproben vor als in der späten Hyperoxiegruppe. In der späten Hyperoxiegruppe war einmal eine Blutprobe negativ. Es konnte aber kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen bezüglich der Pathogenität der Erreger nachgewiesen werden (p -Wert = 1,000 im Fisher's exact test). Dies zeigt folgende Abbildung.

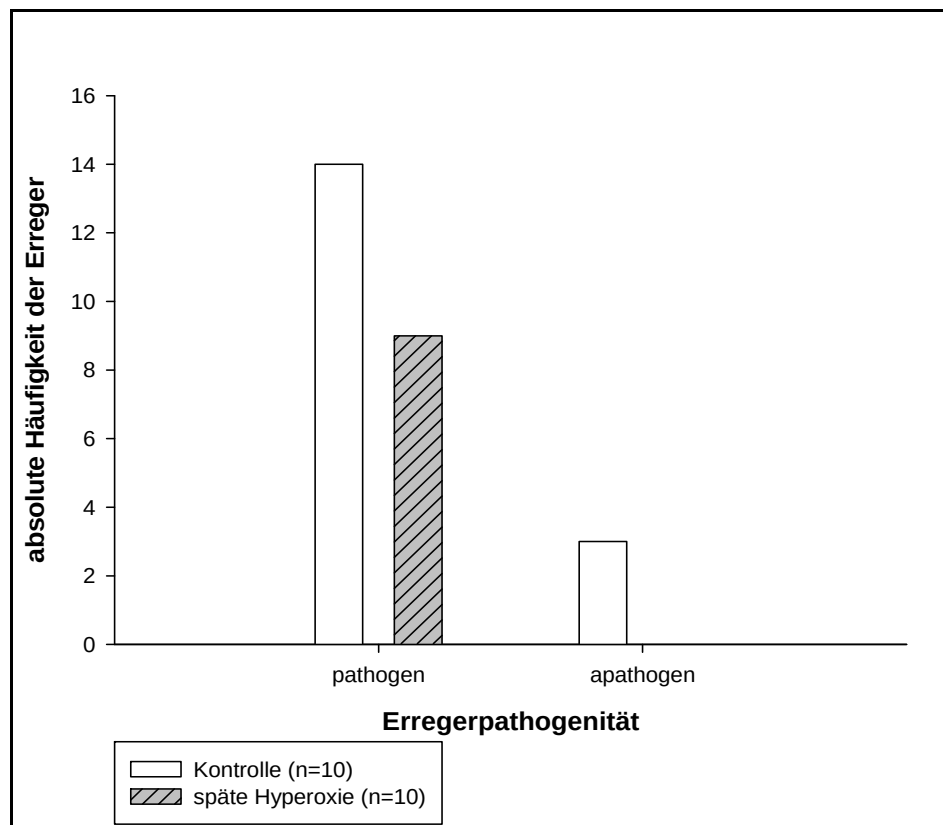


Abbildung 25:

Darstellung des Vorkommens pathogener und apathogener Erreger in den Blutproben der beiden Versuchsgruppen in absoluten Häufigkeiten. n = Anzahl der Tiere. p -Wert = 1,000 $\Rightarrow$ kein signifikanter Unterschied (p = Überschreitungswahrscheinlichkeit).

3.4.3 Vergleich der Erreger in den Blutproben bezüglich ihres Sauerstoffbedarfs

Es zeigte sich, wie der Abbildung 26 unten zu entnehmen, zwischen den beiden Versuchsgruppen kein signifikanter Unterschied bei den absoluten Häufigkeiten der vorkommenden aeroben bzw. anaeroben Keime, auch wenn in der Kontrollgruppe mehr aerobe und anaerobe Keime nachgewiesen wurden (p- Wert= 1,000 im Fisher's exact test).

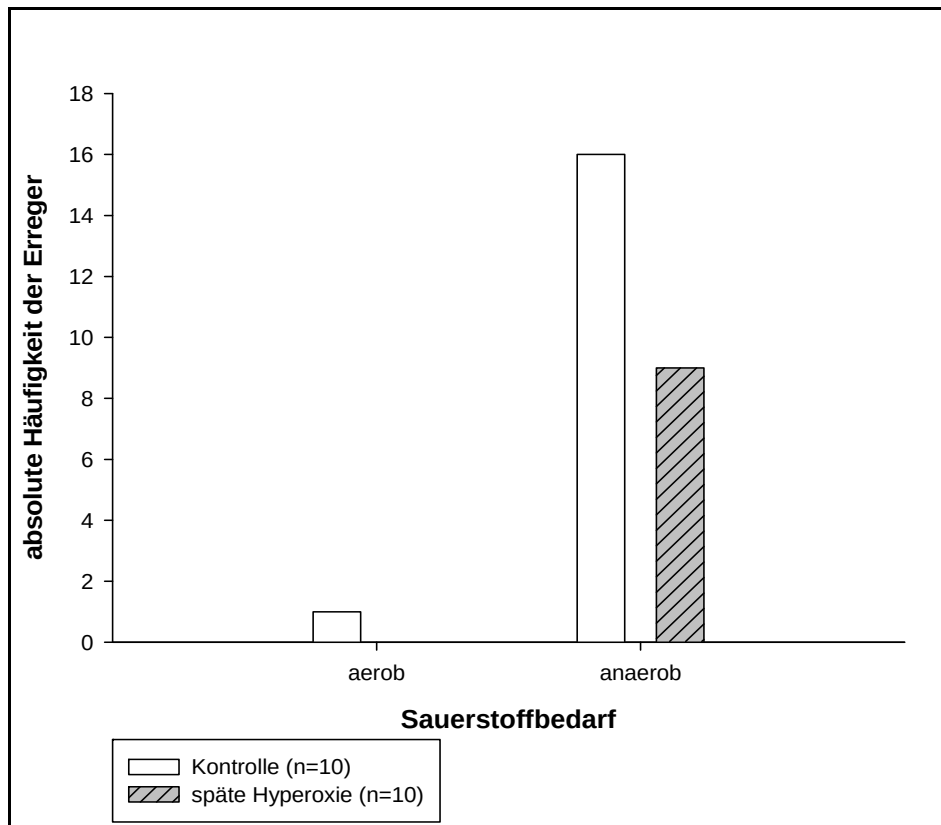


Abbildung 26:

Darstellung der absoluten Häufigkeiten der aeroben und anaeroben Erreger in den Blutproben der beiden Versuchsgruppen. n= Anzahl der Tiere. p- Wert= 1,000 => kein signifikanter Unterschied (p= Überschreitungswahrscheinlichkeit).

3.4.4 Nachgewiesene Erreger in den Abdominalabstrichen, ihre Eigenschaften und ihre Häufigkeit in den Versuchsgruppen

Beim Nachweis von Erregern in den Abdominalabstrichen ergaben sich viele verschiedene in beiden Versuchsgruppen. Die Keime konnten unterschiedlich häufig nachgewiesen werden und zeigten unterschiedliche Eigenschaften bezüglich der Virulenz/Pathogenität und des Sauerstoffbedarfs auf. Kein Abdominalabstrich war negativ. Sowohl in der Kontroll- als auch in der späten Hyperoxiegruppe konnte das Bakterium *Escherichia coli* am häufigsten nachgewiesen werden. Eine Übersicht gibt die nachfolgende Tabelle (Tabelle 2).

Tabelle 2: Erreger in den Abdominalabstrichen

Es werden die verschiedenen nachgewiesenen Erreger in den Abdominalabstrichen mit ihren Eigenschaften bezüglich hauptsächlichem Vorkommen, Pathogenität und Sauerstoffbedarf aufgeführt. Des Weiteren ist der Tabelle zu entnehmen, in welcher Versuchsgruppe der jeweilige Keim vorkam und dessen dortige Häufigkeit. K= Kontrollgruppe, sH= späte Hyperoxiegruppe.

Erreger	Hauptsächlichliches Vorkommen	Virulenz	Sauerstoffbedarf	Gruppe/Häufigkeit
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Umwelt, Krankenhauskeim, Haut, Nahrungsmittel	Apathogen mit fakultativ pathogenen Eigenschaften	Aerob	sH/1
<i>Acinetobacter junii</i>	Umwelt, Krankenhauskeim, Haut, Nahrungsmittel	Apathogen mit fakultativ pathogenen Eigenschaften	Aerob	K/1
<i>Bacteroides fragilis</i>	Darmtrakt	Fakultativ pathogen	Anaerob	K/1
<i>Bergeyella (Weeksella) zoohelcum</i>	unklar	Apathogen, wenige Krankheitsberichte existieren	Aerob	K/1
<i>Clostridium perfringens</i>	Darmtrakt, Umwelt (v.a. Erdboden)	Fakultativ pathogen	Anaerob	K/1
<i>Enterobacter cloacae</i>	Darmtrakt, Haut, Umwelt	Fakultativ pathogen	Fakultativ anaerob	sH/1
<i>Escherichia coli</i>	Darmtrakt, (Umwelt)	Fakultativ pathogen	Fakultativ anaerob	K/10; sH/10
<i>E. coli</i> hämolysierend	Darmtrakt, (Umwelt)	Fakultativ pathogen	Fakultativ anaerob	K/3; sH/3

Fortsetzung siehe nächste Seite (S.45)

Ergebnisse

Fortsetzung Tabelle 2: Erreger in den Abdominalabstrichen

Es werden die verschiedenen nachgewiesenen Erreger in den Abdominalabstrichen mit ihren Eigenschaften bezüglich hauptsächlichem Vorkommen, Pathogenität und Sauerstoffbedarf aufgeführt. Des Weiteren ist der Tabelle zu entnehmen, in welcher Versuchsgruppe der jeweilige Keim vorkam und dessen dortige Häufigkeit. K= Kontrollgruppe, sH= späte Hyperoxiegruppe.

Erreger	Hauptsächlichliches Vorkommen	Virulenz	Sauerstoffbedarf	Gruppe/Häufigkeit
Klebsiella oxytoca	Darmtrakt, Umwelt, auch Atem-, Urogenitaltrakt	Fakultativ pathogen	Fakultativ anaerob	sH/1
Klebsiella pneumoniae	Darmtrakt, Umwelt, auch Atem-, Urogenitaltrakt	Fakultativ pathogen	Fakultativ anaerob	K/1
Lactococcus lactis	Lebensmittel, Pflanzen, evt. Darmtrakt	Apathogen, wenige Krankheitsberichte existieren	Aerob	K/1
Micrococcus spp.	Umwelt, Haut, auch Urogenitaltrakt	Apathogen, wenige Krankheitsberichte existieren	Aerob	sH/1
Propionibacterium acnes	Haut, (auch Darm-, oberer Atem-, Urogenitaltrakt)	Fakultativ pathogen	Anaerob	sH/1
Proteus mirabilis	Darmtrakt, Umwelt	Fakultativ pathogen	Fakultativ anaerob	K/2; sH/5
Providencia rettgeri	Darmtrakt, Umwelt	Fakultativ pathogen	Fakultativ anaerob	K/1
Pseudomonas aeruginosa	Feuchte Umwelt, Krankenhauskeim	Pathogene und fakultativ pathogene Eigenschaften	Aerob	K/4; sH/4
Sporenbildner	Umwelt	Apathogen	Aerob	sH/1
Sporenbildner hämolysierend	Umwelt	Apathogen	Aerob	K/2; sH/2
Staphylococcus aureus	Haut, Nasenlöcher, auch Darm- und Urogenitaltrakt	Pathogene und fakultativ pathogene Eigenschaften	Fakultativ anaerob	sH/2
Staphylococcus caseolyticus	Haut, auch Darm- und Urogenitaltrakt	Fakultativ pathogen	Fakultativ anaerob	K/1; sH/2

Fortsetzung siehe nächste Seite (S.46)

Ergebnisse

Fortsetzung Tabelle 2: Erreger in den Abdominalabstrichen

Es werden die verschiedenen nachgewiesenen Erreger in den Abdominalabstrichen mit ihren Eigenschaften bezüglich hauptsächlichem Vorkommen, Pathogenität und Sauerstoffbedarf aufgeführt. Des Weiteren ist der Tabelle zu entnehmen, in welcher Versuchsgruppe der jeweilige Keim vorkam und dessen dortige Häufigkeit. K= Kontrollgruppe, sH= späte Hyperoxiegruppe.

Erreger	Hauptsächliches Vorkommen	Virulenz	Sauerstoffbedarf	Gruppe/Häufigkeit
Staphylococcus cohnii	Haut, auch Darm- und Urogenitaltrakt	Fakultativ pathogen	Fakultativ anaerob	K/1
Staphylococcus hominis	Haut	Fakultativ pathogen	Fakultativ anaerob	K/1; sH/1
Staphylococcus intermedius	Haut (v.a. bei Hunden)	Fakultativ pathogen für Hunde	Fakultativ anaerob	sH/1
Staphylococcus simulans	Haut (transient beim Menschen)	Fakultativ pathogen	Fakultativ anaerob	K/1; sH/1
Staphylococcus warneri	Haut, auch Darm- und Urogenitaltrakt	Fakultativ pathogen	Fakultativ anaerob	sH/1
Stenotrophomonas maltophilia	Feuchte Umwelt, Krankenhauskeim	Fakultativ pathogen	Aerob	K/1
Streptococcus bovis	Mundhöhle, Rachen, Darm-, Urogenitaltrakt	Apathogen, wenige Krankheitsberichte existieren	Fakultativ anaerob	K/1
Streptococcus (Enterococcus) durans	Darmtrakt (auch Mundhöhle, Urogenitaltrakt), Umwelt	Apathogen	Fakultativ anaerob	K/1
Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis	Mundhöhle, Rachen, Darm-, Urogenitaltrakt	Pathogene und fakultativ pathogene Eigenschaften	Fakultativ anaerob	sH/2
Streptococcus (Enterococcus) faecalis	Darmtrakt (auch Mundhöhle, Urogenitaltrakt), Umwelt	Fakultativ pathogen	Fakultativ anaerob	K/3; sH/3
Streptococcus (Enterococcus) faecium	Darmtrakt (auch Mundhöhle, Urogenitaltrakt), Umwelt	Fakultativ pathogen	Fakultativ anaerob	sH/1
Streptococcus mitis	Mundhöhle, Rachen, Darm-, Urogenitaltrakt	Fakultativ pathogen	Fakultativ anaerob	K/1

Fortsetzung siehe nächste Seite (S.47)

Ergebnisse

Fortsetzung Tabelle 2: Erreger in den Abdominalabstrichen

Es werden die verschiedenen nachgewiesenen Erreger in den Abdominalabstrichen mit ihren Eigenschaften bezüglich hauptsächlichem Vorkommen, Pathogenität und Sauerstoffbedarf aufgeführt. Des Weiteren ist der Tabelle zu entnehmen, in welcher Versuchsgruppe der jeweilige Keim vorkam und dessen dortige Häufigkeit. K= Kontrollgruppe, sH= späte Hyperoxiegruppe.

Erreger	Hauptsächlichliches Vorkommen	Virulenz	Sauerstoffbedarf	Gruppe/Häufigkeit
Streptococcus suis II	Mundhöhle, Rachen, Darm-, Urogenitaltrakt (v.a. beim Schwein)	Pathogene und fakultativ pathogene Eigenschaften für Mensch und Schwein	fakultativ anaerob	K/1

3.4.5 Vergleich der Erreger in den Abdominalabstrichen bezüglich ihrer Pathogenität

Beim Vergleich der Häufigkeiten sowohl der pathogenen als auch apathogenen Erreger in den Abdominalabstrichen (siehe folgende Abbildung 27) ergab sich zwischen der Kontrollgruppe und der späten Hyperoxiegruppe kein wesentlicher Unterschied. Es konnte im durchgeführten statistischen Test (Fisher's exact Test) kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (p- Wert= 1,000).

Ergebnisse

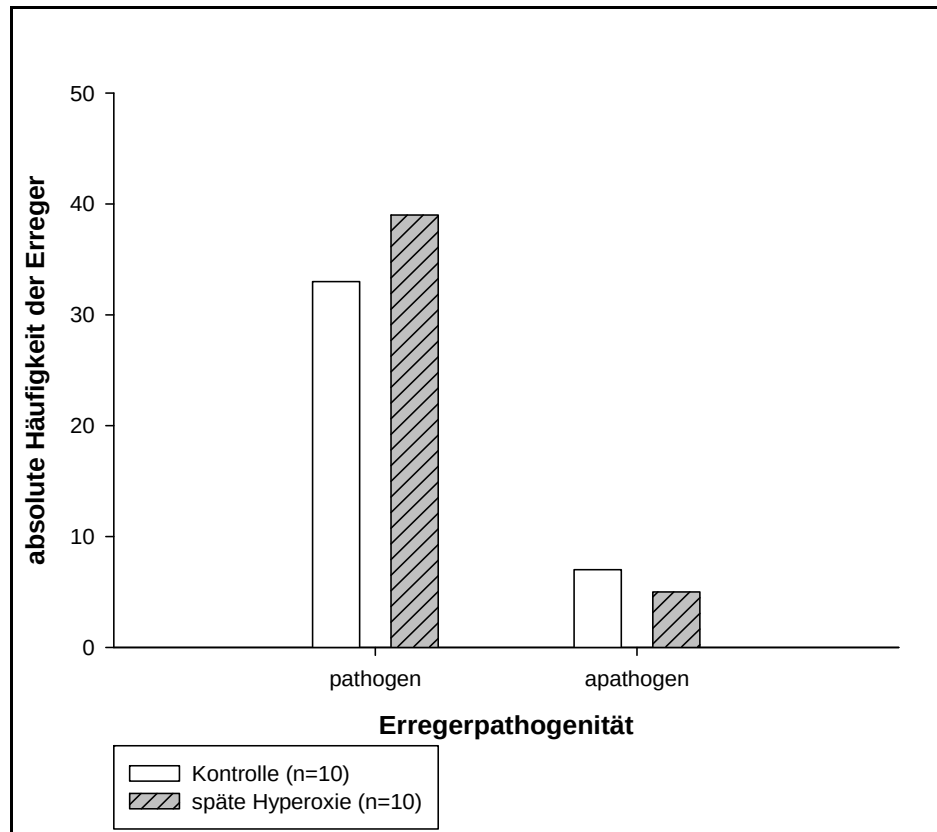


Abbildung 27:

Es werden für die Abdominalabstriche der Kontroll- und späten Hyperoxiegruppe die absoluten Häufigkeiten der pathogenen und apathogenen Erreger im Vergleich dargestellt. n= Anzahl der Tiere. p-Wert= 1,000 => kein signifikanter Unterschied (p= Überschreitungswahrscheinlichkeit).

3.4.6 Vergleich der Erreger in den Abdominalabstrichen bezüglich ihres Sauerstoffbedarfs

Die absoluten Häufigkeiten sowohl der aeroben als auch der anaeroben Erreger waren im Vergleich der beiden Versuchsgruppen ähnlich. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und der späten Hyperoxiegruppe bezüglich der nachgewiesenen Erreger in den Abdominalabstrichen und ihres Sauerstoffbedarfs (p-Wert= 1,000 im Fisher's exact Test). Dies zeigt die nachstehende Abbildung.

Ergebnisse

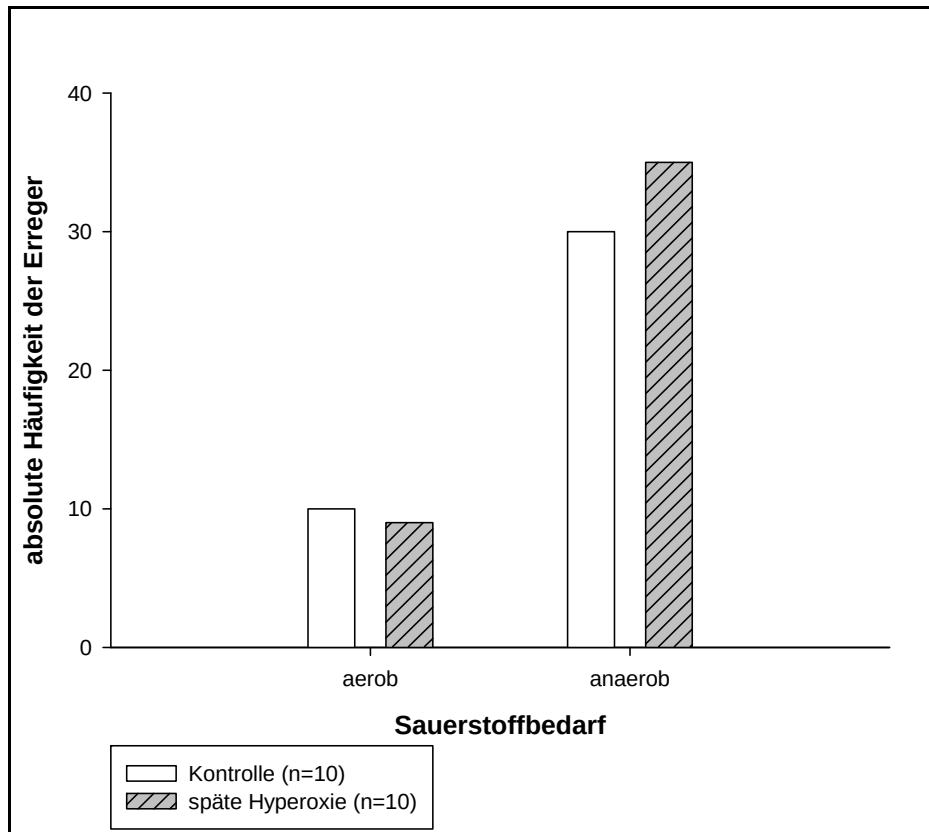


Abbildung 28:

Darstellung der absoluten Häufigkeiten der nachgewiesenen Erreger in den Abdominalabstrichen der Kontroll- und späten Hyperoxiegruppe bezüglich ihres Sauerstoffbedarfs. n= Anzahl der Tiere. p- Wert= 1,000 => kein signifikanter Unterschied (p= Überschreitungswahrscheinlichkeit).

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Effekte einer späten hyperoxischen Beatmung mit reinem Sauerstoff bei einem hyperdynamen, durch fäkale Peritonitis induzierten Langzeitmodell des vollentwickelten septischen Schocks beim Schwein untersucht.

Es sollten die Fragen geklärt werden, welche Auswirkungen diese Beatmung mit 100 % Sauerstoff 12 Stunden nach Induktion des septischen Schocks im Gegensatz zu einer kontinuierlichen Beatmung mit Raumluft auf histomorphologische Parameter der Leber und Lunge darunter die Apoptoserate hat und welche Rolle dabei die Antioxidantien und die Mikrobiologie spielen.

Im Folgenden sollen neben den Charakteristika dieser Studie die diesbezüglichen Ergebnisse beleuchtet und diskutiert werden.

4.1 Charakteristika dieser Studie

In dieser Studie wurde beim Schwein ein hyperdynames Langzeit- Schockmodell durch die Auslösung einer fäkalen Peritonitis induziert. Dafür kamen Hausschweine beiderlei Geschlechts mit einem Gewicht, das im Median bei 50,0 kg lag, zur Verwendung. Es wurde die Tierspezies Schwein ausgewählt, da sie sich für die Realisierung dieser Studie hervorragend eignet. Zum einen ist es bei diesen Tieren sehr gut möglich, die erforderlichen Organ- und Gefäßpräparationen zu vollziehen, die speziellen Katheter und verschiedenen Messgeräte einzubringen und ausreichend Blut- und Gewebeproben zu entnehmen, um damit die nötigen Analysen durchzuführen und die entscheidenden Ergebnisse zu gewinnen. Zum anderen besitzt das Schwein allen möglichen Spezies voran die größte Homologie mit dem Menschen, sei es anatomisch bezüglich Gefäßversorgung sowie Lage und Konfiguration der abdominalen und thorakalen Organe, biochemisch, physiologisch, pathophysiologisch oder metabolisch. Viele Parameter und physiologisch gemessene Werte ähneln denen des Menschen [4, 36, 37, 64, 102, 133].

Verschiedene Autoren [32, 41, 68, 85] haben Anforderungen für ein klinisch relevantes Tiermodell in Analogie zur schweren Sepsis beim Menschen formuliert, darunter Hypermetabolismus, niedriger peripherer Widerstand mit erhöhtem Herzzeitvolumen, respiratorische Insuffizienz mit erforderlicher maschineller Beatmung und Organversagen. Das Modell beruht auf der Auslösung eines hyperdynamen Schocks durch kontinuierliche Endotoxininfusion, womit unsere Arbeitsgruppe über Erfahrungen verfügt und worüber auch einiges in der Literatur zu finden ist [54, 99, 107, 118, 151, 162]. Im Rahmen einer

Weiterentwicklung des bisher verwendeten Modells wurde in dieser Studie das hämodynamische Bild durch eine fäkale Peritonitis ausgelöst. Dieses Vorgehen repräsentiert ein in der Literatur inzwischen in diversen Studien etabliertes Modell, das als besonders adäquate Reproduktion des septischen Schocks beim Menschen gilt [57, 67, 79, 86]. Es handelt sich um ein hyperdynames, durch fäkale Peritonitis induziertes Langzeit-Sepsis- bzw. Schockmodell, so wie es häufig auf Intensivstationen auftritt. Die fäkale Peritonitis repräsentiert zudem eine der wichtigsten Ätiologien eines septischen Schocks. Sie löst im Gegensatz zur kontinuierlichen Infusion reinen Endotoxins eine realitätsnahe polymikrobielle Sepsis aus [15, 130]. Weiterhin führt eine Endotoxininfusion initial zu einer schnellen Entwicklung eines pulmonalen Hypertonus mit konsekutivem Rechtsherzversagen und hypodynamer Kreislauftsituation. Dies kann bei unserem fäkalen Peritonitismodell durch die graduelle Entwicklung der Sepsis vermieden werden.

In dieser Studie wurden Gewebeproben von Lunge und Leber entnommen, da beides entscheidende Organe, nicht nur bei Sepsis, sind. Leberintegrität und – funktion sind ausschlaggebend für das Überleben von Patienten, die unter einem Trauma, einer Operation oder einer Infektion leiden [76]. Die Lunge ist das Organ, das mit dem höchsten Gehalt an Sauerstoff konfrontiert wird und dessen gesamte Alveolarepitheloberfläche direkt O₂ ausgesetzt ist [47].

4.2 Histologische Ergebnisse der Lunge und Leber

4.2.1 Histomorphologie

In der Lunge konnten typische Veränderungen eines diffusen Alveolarschadensyndroms nachgewiesen werden, darunter Ödembildung, hyaline Membran- und Fibrinablagerungen sowie interstitielle Fibrose. In der Leber zeigte sich das Bild einer minimalen akuten Stauung mit geringgradig gestauten Zentralvenen und geringgradig dilatierten Sinusoiden, wobei unter anderem ein Rückstau im Kreislaufsystem, eventuell auch bedingt durch Veränderungen in der Lunge, eine Rolle spielt. Während die Leberpräparate qualitativ beurteilt und zwischen den beiden Versuchsgruppen verglichen wurden, konnte bezüglich der Ergebnisse der Lunge eine semiquantitative Auswertung erfolgen. Im Vergleich der beiden Versuchsgruppen ergab sich sowohl für die Leber als auch für die Lunge kein signifikanter Unterschied bezüglich der Histomorphologie.

Bezüglich der histologischen Veränderungen sind vor allem die Alveolarepithelzellen und die mikrovaskulären Endothelzellen gefährdet [141]. Die Sepsis kann über den

hämatischen Weg durch Endotoxine der Bakterien zu einer initialen Schädigung des Lungenendothels und somit zu den im Ergebnisteil beschriebenen Veränderungen wie Ödembildung, Fibrinexudation und Fibrosierung führen (*siehe unter 3.2.1.1*) sowie auch zu den Veränderungen in der Leber beitragen (*siehe Kapitel 3.2.2*). Während einer Sepsis kommt es zudem zu einem höheren Sauerstoffverbrauch, woraus die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) resultiert, die ihrerseits in biologischen Systemen neben histomorphologischen Schäden auch Apoptose induzieren und durch ihre Schädigungen zu Apoptose führen [49]. Die durch Sauerstoffradikale induzierte Ödemformation kann ebenso auf eine Beeinflussung der Lungenkapillaren zurückgeführt werden, die eine erhöhte Permeabilität aufweisen [21]. Die toxischen Sauerstoffmetabolite wie z.B. das Superoxid- Radikal können allerdings auch direkt die Alveozyten in der Lunge schädigen und so ein diffuses Alveolarschadenssyndroms bedingen. Durch die Sauerstoffradikale oder auch durch Apoptose kommt es zur Zerstörung der Alveolarepithelzellen Typ I, was zum Kollaps dieser Barriere, zu erhöhter pulmonaler Permeabilität und zum Ödem [31, 149] sowie zu einer Beeinträchtigung des Gasaustausches und im schlechtesten Fall zum Tod [97] führen kann. Bei Verlust der Alveolarepithelzellen Typ II bleibt die Reparatur des Alveolarepithels aus, da diese durch Proliferation und Differenzierung dafür sorgen [148] und zudem kann es zu einer Beschleunigung von Kollagenablagerungen und zu einer Proliferation von Lungenfibroblasten kommen [161]. In unserer Studie wären für genauere Aussagen, z.B. bezüglich der vorwiegenden Beteiligung von Alveolarepithelzellen Typ I oder II an den histomorphologischen Veränderungen oder an den Apoptoseraten weitergehende genauere Nachweisverfahren nötig gewesen, so dass darüber hier keine Aussagen möglich sind.

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen lassen sich mehrere Studien finden, in denen Hyperoxie mit stärkeren histomorphologischen Schäden korreliert und die bestätigen, dass eine hyperoxische Umgebung zu toxischen Effekten führt.

Eine andauernde Hyperoxie- Exposition verursacht Gewebe- und Organschäden [159] und kann zum Tode führen wie beispielsweise bei Mäusen, die mehr als 90 % Sauerstoff ausgesetzt wurden und nach Zeichen von Lethargie und mangelndem Ess- und Trinkverhalten letztendlich starben [1]. Je höher bei einer Beatmung die Sauerstoffkonzentration oder der Beatmungsdruck ist, umso größer sind die dadurch zu erwartenden Schäden. Auch die Dauer der hyperoxischen Einwirkung spielt dabei eine Rolle [73, 75]. Außerdem haben wohl der Anteil verschiedener Organellen und die Aktivität antioxidativer Enzyme wie der SOD und Katalase einen Einfluß auf die

Schädigungen durch Hyperoxie [73]. In anderen Versuchsreihen konnte beobachtet werden, dass Hyperoxie zu einer deutlichen pulmonalen Entzündung führt, wobei aktivierte neutrophile Granulozyten Proteasen und weitere freie von Sauerstoff abgeleitete Radikale freisetzen, was zu Gewebeschäden führt [6, 66]. Die akute Entzündungsantwort mit der Neutrophilenrekrutierung hat also parenchymale, epitheliale und endotheliale Beschädigungen zur Folge, was unter anderem zu einem Einstromen proteinreicher Flüssigkeit in die Lufträume führt [115]. In der Literatur finden sich Arbeiten, in denen nachgewiesen werden konnte, dass hyperoxische Beatmung zu einem erhöhten Level an aktivierten Proteinasen führt, demnach einen Abbau der extrazellulären Matrix mit ihren Komponenten wie Kollagen zur Folge hat und so zur Beeinträchtigung des Lungengewebes beiträgt [117, 143]. Dabei wird spekuliert, dass die SOD, die ihrerseits eventuell von Proteinasen inaktiviert werden kann, vor allem beim Verhindern der von Superoxid vermittelten Zerstörung von Kollagen eine Rolle spielt [114], wofür es in unserer Studie allerdings keinen Anhalt gibt. Interessant ist, dass weitere Studien, die Hyperoxie in Verbindung mit stärkeren histomorphologischen Schäden sehen, was in unserer Studie nicht bestätigt werden kann, diesbezüglich neutrophilen Granulozyten und chemotaktischen Faktoren eine besondere Rolle zuschreiben. So konnte bei Kaninchen während Hyperoxie ein großer Einstrom an Neutrophilen in die Lungen nachgewiesen werden, was einherging mit stärkerer zellulärer Schädigung. Neutropene Versuchstiere erfuhren kein Ansteigen der Leukozyten in den Lungen und zeigten einen verbesserten Schutz vor der Exposition mit Sauerstoff und somit weniger Veränderungen [131]. Auch Studien von Johnson und Mitarbeiter indizieren, dass Sauerstoffmetabolite zu Lungenschädigung und interstitieller pulmonaler Fibrose führen können [77]. ROS können also proinflammatorische Reaktionen initiieren und so den pulmonalen und systemischen Stress vermehren und zu stärkeren Schädigungen führen [20].

In unserer Studie konnten in der späten Hyperoxiegruppe weder in der Lunge noch in der Leber signifikant stärkere histomorphologische Beschädigungen als in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Eine Erklärung dafür bleibt fraglich. Zu denken wäre beispielsweise an das Zytokin TNF- α . Obwohl TNF- α in bestimmten Situationen Apoptose induzieren kann [108, 154] (*siehe auch Kapitel 4.2.2*), wurde in mehreren Studien gezeigt, dass die intraperitoneale, die intravenöse oder die intratracheale Applikation von Zytokinen wie Tumornekrosefaktor und/oder Interleukin (IL)-1 Ratten gegenüber O₂-Toxizität resistenter macht. Dieser Schutz wird über eine Erhöhung der Aktivität antioxidativer Enzyme vermittelt [91, 146, 158], was allerdings in unserer Studie nicht nachgewiesen

werden konnte. Trotz dieser ausbleibenden Aktivitätserhöhung stellen die antioxidativen Enzymsysteme sowie die Mikrobiologie generell weitere Ansatzpunkte für mögliche Erklärungen der histomorphologischen Ergebnisse dar. Darauf soll in den Kapiteln 4.3 und 4.4 eingegangen werden.

Die Ergebnisse der Histomorphologie sind ein Hinweis dafür, dass eine Beatmung mit 100 % Sauerstoff nicht nur mit deletären Effekten in Verbindung zu bringen ist. Wir erhielten in der späten Hyperoxiegruppe sogar eine geringere Anzahl an Apoptosen als in der Gruppe mit normoxischer Beatmung, was sich mit vielen Erklärungsmodellen und Ergebnissen in der Literatur nicht deckt. Dies führt zum nächsten Kapitel *Apoptose*, in dem diese Problematik diskutiert werden soll.

4.2.2 Apoptose

Sowohl in der Lunge als auch in der Leber konnten in der späten Hyperoxiegruppe eindeutig weniger Apoptosen nachgewiesen werden als in der Kontrollgruppe. Während der Unterschied der Apoptosezahlen für die Lunge eine deutliche Signifikanz aufwies, verfehlten die Ergebnisse der Leber diese nur knapp.

Die Ergebnisse unserer Studie sind erstaunlich, da sie auf einen eventuellen positiven Effekt von Hyperoxie hinweisen. In der Literatur finden sich allerdings nur wenige Arbeiten, die unsere Ergebnisse untermauern und die vor allem gegen Ende dieses Kapitels erwähnt und diskutiert werden. In den meisten Studien wird Hyperoxie dagegen als schädlich bezeichnet und eher mit höheren Apoptosezahlen in Verbindung gebracht.

So konnte in einer Studie von Mantell et al. gezeigt werden, dass das Ausmaß von Apoptose mit der Schwere der Hyperoxie-induzierten Schädigung korreliert [96]. An dieser Stelle sei noch einmal erwähnt, dass Apoptose sowohl gute als auch schlechte Seiten haben kann (*siehe unter 1.3.1 im Teil Einleitung*). Man kann hier letztendlich nicht sicher sagen, was in unserer Studie im Vordergrund steht. Dennoch weist diese Arbeit von Mantell und Kollegen darauf hin, dass Apoptose in Verbindung mit Hyperoxie eher deletäre Effekte aufweist und somit der durch Apoptose verursachte Gewebeverlust in Lunge und Leber im Vordergrund steht. Durch Apoptose gehen in der Leber Hepatozyten und in der Lunge Alveolarepithelzellen unter, die unter anderem für Reparaturarbeiten in der Lunge nötig sind (*siehe 4.2.1*). Weitere Studien liefern Ergebnisse, die sich nicht mit unseren Resultaten decken, und zeigen zudem die verschiedenen komplexen Regulationsmechanismen der Apoptose auf. Kantrow et al. zeigten, dass oxidativer Stress zu vermehrter Initiierung von Apoptose führt, wobei es der Zelle misslingt, ATP zu

verbrauchen und ADP adäquat zur Verfügung zu stellen. Dies erhöht die Durchlässigkeit der Mitochondrien und prädisponiert diese zur Abgabe von Cytochrom- C, was Apoptose zur Folge hat [78]. Eine wichtige Rolle spielen also die reaktiven Sauerstoffspezies, die über den erwähnten Mitochondrienweg und über eine DNA- Schädigung mehr Apoptose initiieren können [48, 49, 124]. Zhang und Kollegen konnten in ihrer Studie nachweisen, dass bei Mäusen die Exposition mit reinem Sauerstoff im Gegensatz zur Exposition mit Raumluft eine starke Lungenschädigung, Epithelverschorfung und einen erhöhten durch TUNEL dargestellten Apoptoseindex unter anderem bei den Alveolarepithelzellen zur Folge hatte [165]. Einer Studie von O' Reilly und Mitarbeiter ist ebenfalls zu entnehmen, dass Hyperoxie mit einer vermehrten DNA- Strangbruchrate der pulmonalen Epithelzellen einhergeht, wobei die Arbeitsgruppe erhöhte Level des proapoptotischen Proteins p 53 aufzeigen konnte [112]. In der Literatur gibt es weitere Hinweise, dass eine Infektion selbst, im weiteren Sinne somit auch eine Sepsis, über Endotoxine, Entzündungsvorgänge und ROS bei der Apoptoseinduktion beteiligt sein kann und eine Hyperoxie diesen Mechanismus im Gegensatz zu unseren Ergebnissen verstärkt. Zudem sollten in diesem Zusammenhang auch die Apoptose- mitregulierenden Mediatoren TNF- α und Fas erwähnt werden, obwohl über Fas in unserer Studie keine Aussagen getroffen werden können. Infektionen, z.B. mit *Legionella pneumophila*, können zu einer höheren Apoptoserate führen und Mäuse, die zusätzlich erhöhten Konzentrationen an Sauerstoff ausgesetzt wurden, zeigten im Gegensatz zur Kontrollgruppe ohne Hyperoxie gesteigerte Apoptosezahlen, wobei der Nachweis der Apoptosen unter anderem mit Hilfe der TUNEL-Färbung erfolgte. Mäuse mit einem Mangel an Fas, das Apoptose induzieren kann, wiesen geringere Apoptosezahlen auf. Es sind wohl auch zusätzlich andere Fas- unabhängige Signalwege an der Pathogenese der Organbeschädigung und der Apoptose beteiligt. Die Tiere zeigten ebenso ein erhöhtes Level an TNF- α , das in bestimmten Situationen Apoptose induzieren kann, und eine Blockade dieses Zytokins führte zu reduzierten Apoptosezahlen. Allerdings war die Blockade von TNF- α nicht so effektiv bezüglich der Überlebensrate der Mäuse wie die von Fas, was darauf hinweist, dass TNF- α selbst eine multipotentiale Aktivität auf das biologische und immunologische System des Wirts haben und so einen gewissen Schutz vor Pathogenen, Hyperoxie und deren Schädigungen und damit auch vor Apoptose darstellen könnte (*siehe auch Kapitel 4.2.1*) [13, 35, 53, 83, 108, 134, 141, 147, 154]. Dies verdeutlicht erneut die Komplexität der Apoptoseregulation und deutet darauf hin, dass es Situationen geben kann, in denen möglicherweise die Hyperoxie

über bestimmte Mechanismen, wie z. B. über das gerade erwähnte multipotentiale TNF- α , vor Apoptose schützt.

Im Gegensatz zu den bisherigen Ausführungen gibt es einige wenige Studien, die mit unseren geringeren Apoptosezahlen in der späten Hyperoxiegruppe einhergehen und dafür Erklärungsansätze bilden. Ratten mit Klebsiella- infizierten Lungen wurden hyperoxischen Bedingungen ausgesetzt und wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe unter Exposition mit Raumluft weder eine erhöhte Letalität noch einen Anstieg an Histon- assoziierten DNA- Fragmenten auf, die Marker für Apoptose sind [141]. Die Anpassung von Hypoxie auf Hyperoxie bewirkte beispielsweise unter anderem in der Leber einen Membranstabilisierenden Effekt [2], was zur Verhinderung von Apoptose führen könnte.

Möglicherweise führt die Hyperoxie auch nicht direkt zum Zelltod wie Apoptose, sondern gibt der Zelle Zeit und ermöglicht ihr so, einen eventuellen DNA- Schaden zu reparieren, wodurch diese dann vor weiteren toxischen Effekten des oxidativen Stresses geschützt ist [113].

Bezüglich eines anderen Zusammenhanges zwischen Sauerstoff und Apoptose ist denkbar, dass hohe Dosen an molekularem Sauerstoff direkt in die Induktionswege der Apoptose eingreifen, indem Caspasen oxidiert werden und so ihre Fähigkeit verlieren, Apoptose einzuleiten und durchzuführen [63]. Möglicherweise ist hierbei tatsächlich die Dosis entscheidend und deshalb konnten in der späten Hyperoxiegruppe weniger Apoptosen nachgewiesen werden, da hier in den letzten 12 Stunden der Versuche im Gegensatz zur Kontrollgruppe eine Beatmung mit 100 % Sauerstoff erfolgte. Da in der Leber der Unterschied zwischen den Apoptosezahlen der Gruppen im Vergleich zur Lunge nicht signifikant war, ist diesbezüglich eventuell entscheidend, dass die Leber nicht wie die Lunge direkt 100 % Sauerstoff ausgesetzt war. Es wäre ebenfalls denkbar, dass die Signalwege zur Apoptose dort entweder inkomplett durch Sauerstoff gehemmt oder diese durch nachfolgende oxidative Verletzung umgangen werden.

Bei einer weiteren möglichen Erklärung, wie Hyperoxie Sauerstoff- induzierte Apoptose verhindern könnte, spielt der Transkriptionsfaktor NF- κ B eine Rolle. Die Apoptosehemmung hat laut Franek und Kollegen keinen direkten Zusammenhang mit der Sauerstofftoxizität oder einem signifikanten Anstieg antioxidativer Enzyme, sondern scheint direkt mit dem durch Hyperoxie induzierten Abbau von I- κ B und der darauf folgenden Aktivierung von NF- κ B in Beziehung zu stehen [44]. NF- κ B schützt die Zellen dann vor Apoptose durch die Hochregulierung von antiapoptotisch wirksamen Mitgliedern der Bcl- 2- Familie sowie durch die Regulierung von Caspasen [34, 155]. Die Rolle des

Proteins Bcl- 2 bei Apoptose zeigt sich auch in anderen Studien, in der die Überexpression von Bcl- 2 über die Beeinflussung apoptotischer Signalwege Hyperoxie- induzierten Zelltod verhinderte und deutlich mit einem Abfall von Apoptosezahlen in Verbindung stand [26, 106]. Proteine der Bcl- 2- Familie können auch an Aktivatorproteine der Exekutionsmaschinerie andocken und so verhindern, dass die Initiator- Caspase der Apoptose aktiviert wird. Nicht nur in der Lunge, sondern auch in der Leber konnten solche Zusammenhänge beobachtet werden [76]. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Aktivierung von NF- κ B das zelluläre oxidative Gleichgewicht hin zu einem geringeren oxidativen Status verändern kann. Dies wird durch die Studien von Haddad und Kollegen bestätigt [61]. Darüber können in unserer Studie allerdings keine Aussagen gemacht werden, da keine Messungen der NF- κ B- Aktivität oder des Bcl- 2- Proteins durchgeführt wurden.

Denkbar wäre auch der folgende Zusammenhang. Bei Sepsis führen nicht nur die daraus resultierenden reaktiven Sauerstoffspezies zu Apoptose sondern auch unverbundene, Rezeptor- vermittelte Signalwege, bei denen möglicherweise proinflammatorische Mediatoren eine Rolle spielen [23, 49]. Vielleicht werden genau diese durch die zusätzliche hyperoxische Beatmung mehr gehemmt als durch eine normoxische, was sich dann in niedrigeren Apoptosezahlen in der späten Hyperoxiegruppe im Gegensatz zur Kontrollgruppe zeigt.

Insgesamt bezüglich der histologischen Ergebnisse bleibt festzuhalten, dass die späte Hyperoxiegruppe weniger Apoptosezahlen zeigte und im histomorphologischen Vergleich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen nachgewiesen werden konnte. Trotz möglicher Erklärungsansätze bleibt dies in Anbetracht zahlreicher Studien in der Literatur, die dies nicht bestätigen, ein überraschendes Ergebnis.

Weitere Ansatzpunkte stellen die Antioxidantien und die Mikrobiologie dar, über deren Rolle in den folgenden Kapiteln diskutiert werden soll.

4.3 Aktivität der antioxidativen Enzyme SOD und Katalase in Lunge und Leber

Sowohl in der Lunge als auch in der Leber zeigten sich im Vergleich der späten Hyperoxiegruppe zur Kontrollgruppe für die Aktivität der antioxidativen Enzyme SOD und Katalase keine signifikanten Unterschiede.

In Anbetracht der Tatsache, dass sich bei den Ergebnissen in der späten Hyperoxiegruppe sowohl für die Leber als auch für die Lunge geringere Apoptosezahlen und keine stärkeren histomorphologischen Schäden ergeben haben, hätten höhere Aktivitäten der SOD und Katalase in dieser Versuchsgruppe einen möglichen Erklärungsansatz dargestellt. Denn in der Literatur sind viele Anhaltspunkte dafür zu finden, dass Hyperoxie mit einer Erhöhung der SOD- Aktivität einhergeht und diese Erhöhung einen gewissen Schutz vor Schädigungen bieten kann. So führte bei Säugetieren wie Ratten das Einatmen von 85 %-igem Sauerstoff zu einer Aktivitätserhöhung der SOD [28] und Katalase, wobei auch molekulare Regulationsmechanismen auf transkriptionaler und translationaler Ebene eine Rolle spielen [69]. Dies bot sogar einen Schutz vor Schäden durch die nachfolgende Exposition mit letalen Sauerstoffkonzentrationen (100 %) [27, 29, 30, 82], da antioxidative Enzyme antioxidative Reaktionen begünstigen und wie die SOD und Katalase direkt die reaktiven Sauerstoffspezies zersetzen [20]. Die Anwendung von Antioxidantien, allen voran die SOD, schwächt also die schädlichen Effekte von freien Radikalen in Verbindung mit Sepsis und Endotoxämie ab [14, 87]. Knock- out Mäuse ohne SOD waren gegenüber Hyperoxie empfindlicher als die Kontrollgruppe mit SOD [18] und transgene Mäuse mit einer SOD- Überexpression überlebten unter hyperoxischen Bedingungen (95 % O₂) wesentlich länger als die nicht- transgenen Kontrollen [160], was den in der Literatur häufig beschriebenen schützenden Effekt der antioxidativen Enzyme erneut verdeutlicht. Folz und Kollegen zeigten, dass bei transgenen Mäusen durch erhöhte Level an SOD in den Lungen die Hyperoxie- induzierte Neutrophilenrekrutierung signifikant verringert werden konnte, woraus sich eine geringere Schädigung der Lunge durch Hyperoxie ergab [42]. Frank et al. haben herausgefunden, dass bakterielles Endotoxin zu einer Aktivitätserhöhung antioxidativer Enzyme wie SOD und Katalase führen kann und somit einen schützenden Effekt auf Rattenlungen hatte, die Hyperoxie ausgesetzt wurden, was sich auch in einer geringeren Letalität widerspiegelte [45, 46].

Es gibt allerdings in der Literatur auch einige Studien, die mit unseren Ergebnissen einhergehen und diese untermauern. Bei Mäusen führte bakterielles Endotoxin

beispielsweise zu keiner SOD- Aktivitätserhöhung [46]. Bei Franek und Mitarbeiter wurden Alveolarepithelzellen einmal mit 95 %- igem Sauerstoff und einmal mit Raumluft vorbehandelt und danach einer letalen Konzentration von H_2O_2 ausgesetzt. Es kam zu keinem signifikanten Anstieg antioxidativer Enzyme (SOD, Katalase, Glutathionperoxidase) in der mit 95 %- igem Sauerstoff vorbehandelten Gruppe [44]. Oury und Mitarbeiter konnten sogar bei Mäusen einen signifikanten Abfall des SOD- Levels durch die Beatmung mit 100 % O_2 feststellen, was zu einer Erhöhung der Lungenschädigung führte [115]. Möglicherweise spielt auch die Tierspezies eine Rolle. Forman und Kollegen berichten, dass in Experimenten mit Mäusen, Meerschweinchen und Hamster die Tiere keinen Anstieg der SOD- Aktivität bei einer Sauerstoff- Exposition von 85 % aufwiesen [43]. Erwachsene Kaninchen zeigten unter Hyperoxie ebenfalls keine Erhöhung der Aktivitäten von SOD und Katalase [5]. Denkbar wäre auch, dass ein Ansteigen der SOD und Katalase keine direkte Antwort auf hohe Sauerstoffkonzentrationen ist, sondern eher eine Folge von Hyperoxie- induzierten Lungenschädigungen [69]. Da in beiden Versuchsgruppen keine histomorphologische Diskrepanz nachgewiesen werden konnte, würde dies demnach den fehlenden Unterschied bei den antioxidativen Enzymen erklären.

Es bleibt festzuhalten, dass sich also bei den Aktivitäten der SOD und Katalase in der späten Hyperoxiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied ergab. Daher können diese Parameter auch nicht als Erklärung für die histomorphologischen und apoptotischen Ergebnisse dienen. Dies lässt die Fragen aufkommen, welche Rolle die Mikrobiologie spielt und welche Möglichkeiten sich für die Interpretation der mikrobiologischen Ergebnisse ergeben (*siehe folgendes Kapitel*).

4.4 Mikrobiologische Ergebnisse in den Blutproben und Abdominalabstrichen

Bei Sepsis sind *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, Klebsiellen und Enterokokken häufig und typisch vorkommende Keime [16]. Auch in unserer Studie konnten in beiden Versuchsgruppen bei polymikrobieller Sepsis unter anderem diese Keime nachgewiesen werden.

Zwischen den beiden Versuchsgruppen ergaben sich bei den mikrobiologischen Ergebnissen allerdings keine Veränderungen des mikrobiologischen Keimspektrums im Blut und in der Abdominalhöhle hinsichtlich Pathogenität und Sauerstoffbedarf. In der Literatur findet sich aber eine Verknüpfung von Hyperoxie und Mikrobiologie, die einen antibiotischen Effekt von Sauerstoff andeutet. So führte die perioperative Beatmung von Patienten mit 80 % Sauerstoff im Gegensatz zu der mit 30 % O₂ zu einer geringeren Rate an chirurgischen Wundinfektionen und somit zu einer Reduzierung bakteriellen Nachweises. Dies könnte abhängig sein von der Bildung bakterizider reaktiver Sauerstoffspezies, auch durch Neutrophile, deren bakterizide Aktivität durch oxidatives Töten vermittelt wird [3, 59, 132]. Zudem wurde gezeigt, dass aerobe im Gegensatz zu anaeroben Bakterien das Enzym Superoxiddismutase besitzen und so Sauerstoff möglicherweise schnell toxisch für anaerobe Keime ist [103]. Weiterhin kann Hyperoxie zur Verhinderung von bakterieller Translokation aus dem Darm führen, was günstige Auswirkungen haben kann [38, 55]. Allerdings gibt es in unserer Studie keinen Anhalt für diese Mechanismen.

In Anbetracht der histomorphologischen Ergebnisse sowie der niedrigeren Apoptosezahlen in der späten Hyperoxiegruppe, die aufgrund des fehlenden Unterschieds nicht mit den antioxidativen Enzymsystemen SOD und Katalase in Verbindung stehen können, stellt sich diesbezüglich die Frage nach der Rolle der Mikrobiologie. Der fehlende Unterschied in den mikrobiologischen Ergebnissen zwischen den beiden Versuchsgruppen ist vereinbar mit dem Fehlen einer histomorphologischen Differenz. Eine Erhöhung von Inflammation durch Bakterien mit konsekutiv stärkeren histomorphologischen Schäden in einer der Versuchsgruppen konnte demnach nicht nachgewiesen werden. Bakterielle Pathogene können zudem, um ihre pathogenen Effekte zu verbessern, ihrerseits Apoptose induzieren und diese über Interaktionen mit Schlüsselbestandteilen der Apoptosemaschinerie modulieren [156]. In einer Studie von Fettucciari und Kollegen wurde gezeigt, dass beispielsweise Gruppe- B- Streptokokken fähig sind, in Phagozytosezellen des Wirts

Apoptose zu induzieren [39]. Auch das Bakterium *Staphylococcus aureus* ist fähig, in Endothelzellen Apoptose auszulösen [105], sowie dies auch *E. coli*- Endotoxin in Rinderepithelzellen kann [50]. In der Literatur gibt es im Gegensatz dazu auch Berichte darüber, dass Lipopolysaccharide von Bakterien einen antiapoptotischen Effekt besitzen können [72]. Da sich bei den mikrobiologischen Ergebnissen kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen ergab und zudem nur im Blut und in der Abdominalhöhle und nicht direkt in Lunge und Leber die bakteriellen Untersuchungen erfolgten, lässt sich in unserer Studie kein Zusammenhang zwischen den Resultaten der Apoptoseauszählung und der Mikrobiologie erkennen.

4.5 Schlussfolgerung

Anhand eines klinisch relevanten durch fäkale Peritonitis induzierten Sepsismodells beim Schwein zeigen die erhobenen Daten, dass eine Beatmung mit reinem Sauerstoff bei einem vollentwickelten septischen Schock im Vergleich zu einer kontinuierlichen Beatmung mit Raumluft keine Auswirkungen auf die Aktivität der antioxidativen Enzyme Superoxiddismutase und Katalase in Lunge und Leber hatte und sich auch keine Veränderungen des mikrobiologischen Keimspektrums im Blut und in der Abdominalhöhle hinsichtlich Pathogenität und Sauerstoffbedarf zeigten. Des Weiteren ging sie in Lunge und Leber nicht mit stärkeren histomorphologischen Beschädigungen einher und hatte niedrigere Apoptosezahlen zur Folge. In Anbetracht vieler Berichte über Sauerstofftoxizität sind dies überraschende Ergebnisse, zumal die Resultate bezüglich Antioxidantien und Mikrobiologie dafür keinen Erklärungsansatz bieten. Es stellt sich also die Frage, ob eine Beatmung mit höheren Konzentrationen an Sauerstoff, die bei Sepsis und Hypoxämie sehr wichtig sein kann, unter Umständen nicht schädlich ist trotz häufiger Erwähnung in wissenschaftlichen Arbeiten, sondern im Gegenteil vielleicht sogar einen protektiven Effekt besitzt. Dem sollte in weiteren tierexperimentellen Arbeiten, auch bezüglich möglicher Mechanismen, nachgegangen werden. Dies könnte längerfristig gesehen dann auch nicht nur bei Sepsis Auswirkungen auf die Klinik und auf den Einsatz von höheren Konzentrationen an Sauerstoff, eventuell sogar bis zu 100 %, bei Beatmungsstrategien haben.

5 Zusammenfassung

Einleitung und Fragestellung: Sepsis ist nach wie vor ein schweres Krankheitsbild, das mit einer hohen Mortalitätsrate einhergeht. Eine lungenprotektive Beatmungsstrategie ist Teil von mehreren verschiedenen Therapiesäulen dieser Erkrankung. In dieser Studie wurden nun in einem hyperdynamen, durch fäkale Peritonitis induzierten Langzeitmodell des vollentwickelten septischen Schocks beim Schwein die Effekte einer Beatmung mit 100 % Sauerstoff nach Vollentwicklung des septischen Schocks untersucht. Es sollten die Fragen geklärt werden, welche Auswirkungen diese Beatmung mit 100 % Sauerstoff 12 Stunden nach Induktion des septischen Schocks im Gegensatz zu einer Beatmung mit Raumluft auf histomorphologische Parameter der Leber und Lunge darunter die Apoptoserate hat und welche Rolle dabei die Antioxidantien und die Mikrobiologie spielen.

Material und Methoden: Für die Studie kamen 20 deutsche Hausschweine zur Anwendung. Die notwendige Menge autologer Faeces zur Auslösung des polymikrobiellen septischen Schocks durch fäkale Peritonitis war in Vorversuchen etabliert worden. Die Schweine wurden in Allgemeinnarkose einer chirurgischen Präparation unterzogen, der sich eine 8- stündige Ruhe- und Erholungsphase anschloss. Anschließend erfolgte die Auslösung der fäkalen Peritonitis. Daraufhin entwickelten die Tiere in den nächsten 12 Stunden eine Sepsis bzw. einen septischen Schock. Die Kontrollgruppe, bestehend aus 10 Schweinen, wurde während der gesamten Versuchsdauer mit Luft beatmet bzw. erfolgte eine Anpassung der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration, um die Sauerstoffsättigung über 90 % zu halten. Die 10 Tiere der späten Hyperoxiegruppe erhielten zunächst eine Beatmung mit Luft und nach Entwicklung der Sepsis für 12 Stunden mit 100 % Sauerstoff. Am Ende des Versuchs wurden Blutproben und Abdominalabstriche für die Mikrobiologie und Gewebeproben von Lunge und Leber zur Aufbereitung sowie zur darauf folgenden Bestimmung der antioxidativen Enzymaktivitäten und zur Untersuchung der Histomorphologie und Apoptoserate entnommen. Bezüglich Histomorphologie kamen die HE (Hämatoxylin- Eosin)- und die PAS (Periodic Acid Schiff)- Färbung, bezüglich Apoptose die TUNEL (TdT- mediated dUTP nick end labeling)- Färbung zum Einsatz. Die Aktivitäten der antioxidativen Enzyme wurden mit im Handel erhältlichen Kits und die Keime mit gängigen mikrobiologischen Nachweismethoden bestimmt.

Ergebnisse: Histomorphologisch gesehen zeigten die Gewebeproben der Leber das Bild einer minimalen akuten Stauung und die der Lunge Veränderungen, wie sie bei einem

diffusen Alveolarschadensyndrom auftauchen. Bei der Auswertung der Histomorphologie hinsichtlich des Vergleichs der beiden Versuchsgruppen wiesen diese sowohl für die Leber als auch für die Lunge keine signifikante Verschiedenheit auf. Dagegen ergab sich in der späten Hyperoxiegruppe allerdings eine deutlich geringere Apoptoserate als in der Kontrollgruppe. Während die Ergebnisse in der Leber nur knapp eine Signifikanz verfehlten, zeigte sich in der Lunge eine eindeutige Signifikanz bezüglich der niedrigeren Apoptosezahlen. Bezüglich der Aktivitäten von Superoxiddismutase und Katalase in Lunge und Leber konnte zwischen den beiden Versuchsgruppen kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Auch in den Blutproben und in den Abdominalabstrichen ergab sich im Vergleich der beiden Versuchsgruppen hinsichtlich Pathogenität und Sauerstoffbedarf der nachgewiesenen Keime kein signifikanter Unterschied.

Diskussion: In Anbetracht dessen, dass in der Literatur viele Berichte zur Toxizität des Sauerstoffs existieren, die zeigen, dass Hyperoxie mit stärkeren histomorphologischen Schäden, mehr Apoptose und einer erhöhten Mortalität einhergehen, sind die Ergebnisse dieser Studie recht überraschend, da sie nicht in diese Richtung weisen. Es sind aber auch Arbeiten zu finden, in denen positive Auswirkungen einer Exposition mit Hyperoxie nachgewiesen wurden. Dabei wird unter anderem die Möglichkeit aufgeworfen, dass der Sauerstoff direkt oder über die Hochregulierung bestimmter Mediatoren in die Apoptosewege eingreift und so diese verhindert. Aufgrund des mangelnden Unterschieds zwischen den beiden Versuchsgruppen bezüglich Antioxidantien und Mikrobiologie liefern diese Bereiche keinen Erklärungsansatz für die Resultate der Histomorphologie und Apoptoseauszählung.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse dieser Studie führen also zu der Frage, ob eine Beatmung mit höheren Konzentrationen an Sauerstoff, die bei Sepsis und Hypoxämie sehr wichtig sein kann, unter Umständen nicht schädlich ist trotz häufiger Erwähnung in wissenschaftlichen Studien, sondern im Gegenteil vielleicht sogar einen protektiven Effekt besitzt. Dem sollte in weiteren tierexperimentellen Arbeiten, auch bezüglich möglicher Mechanismen, nachgegangen werden. Dies könnte langfristig gesehen dann auch Auswirkungen auf die Klinik, nicht nur bei Sepsis, und auf den Einsatz von höheren Konzentrationen an Sauerstoff, eventuell sogar bis zu 100 %, bei Beatmungsstrategien haben.

6 Literaturverzeichnis

- 1 **Adamson IY, Bowden DH, Wyatt JP:** Oxygen poisoning in mice. Ultrastructural and surfactant studies during exposure and recovery. *Arch Pathol* 90: 463- 472 (1970).
- 2 **ArkhipenkoYV, Sazontova TG, Zhukova AG:** Adaptation to periodic hypoxia and hyperoxia improves resistance of membrane structures in heart, liver, and brain. *Bull Exp Biol Med* 140: 278- 281 (2005).
- 3 **Babior BM:** Oxygen- dependent microbial killing by phagocytes. *New Engl J Med* 298: 659- 668 (1978).
- 4 **Bähr KH, Schulze W:** The swine as standardized experimental animal. *Z Rheumaforsch* 31: 99- 104 (1972).
- 5 **Baker RR, Holm BA, Panus PC, Matalon S:** Development of O₂ tolerance in rabbits with no increase in antioxidant enzymes. *J Appl Physiol* 66: 1679- 1684 (1989).
- 6 **Barry BE, Crapo JD:** Pattern of accumulation of platelets and neutrophils in rat lungs during exposure to 100 % and 85 % oxygen. *Am Rev Respir Dis* 132: 548- 555 (1985).
- 7 **Bauer M:** The physiopathology of sepsis. Current concepts. *Anaesthesist* 45: 312- 322 (1996).
- 8 **Bitterman H, Bitterman N, Melamed Y, Cohen L:** Effects of hyperbaric oxygen in circulatory shock induced by splanchnic artery occlusion and reperfusion in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 67: 1033- 1037 (1989).
- 9 **Bitterman H, Muth CM:** Hyperbaric oxygen in systemic inflammatory response. *Intensive Care Med* 30: 1011- 1013 (2004).
- 10 **Bochkov VN, Kadl A, Huber J, Gruber F, Binder BR, Leitinger N:** Protective role of phospholipid oxidation products in endotoxin- induced tissue damage. *Nature* 419: 77- 81 (2002).
- 11 **Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ:** Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/ SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/ Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101: 1644- 1655 (1992).

- 12 **Bornstein A:** Über Sauerstoffvergiftung. *Dt Med Wochenschrift*: 1495- 1497 (1912).
- 13 **Brieland JK, Remick DG, Freeman PT, Hurley MC, Fantone JC, Engleberg NC:** In vivo regulation of replicative *Legionella pneumophila* lung infection by endogenous tumor necrosis factor alpha and nitric oxide. *Infect Immun* 63: 3253- 3258 (1995).
- 14 **Broner CW, Shenep JL, Stidham GL, Stokes DC, Hildner WK:** Effect of scavengers of oxygen- derived free radicals on mortality in endotoxin-challenged mice. *Crit Care Med* 16: 848-851 (1988).
- 15 **Brun- Buisson C, Doyon F, Carlet J, Dellamonica P, Gouin F, Lepoutre A, Mercier JC, Offenstadt G, Regnier B:** Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. *J Am Med Ass* 274: 968- 974 (1995).
- 16 **Brun- Buisson C, Doyon F, Carlet J:** Bacteremia and severe sepsis in adults: a multicenter prospective survey in ICUs and wards of 24 hospitals. French Bacteremia- Sepsis Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 154: 617- 624 (1996).
- 17 **Brunkhorst FM:** Epidemiology, economy and practice – results of the German study on prevalence by the competence network sepsis (SepNet). *Anaesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzth* 41: 43- 44 (2006).
- 18 **Carlsson LM, Jonsson J, Edlund T, Marklund SL:** Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 6264- 6268 (1995).
- 19 **Carraway MS, Piantadosi CA:** Oxygen toxicity. *Respir Care Clin N Am* 5: 265- 295 (1999).
- 20 **Christofidou- Solomidou M, Muzykantov VR:** Antioxidant strategies in respiratory medicine. *Treat Respir Med* 5: 47- 78 (2006).
- 21 **Clark JM, Lambertsen CJ:** Pulmonary oxygen toxicity: a review. *Pharmacol Rev* 23: 37- 133 (1971).
- 22 **Clary EM, Bruch SM, Lau CL, Ali A, Chekan EG, Garcia- Oria MJ, Eubanks S:** Effects of pneumoperitoneum on hemodynamic and systemic immunologic responses to peritonitis in pigs. *J Surg Res* 108: 32- 38 (2002).

- 23 **Clutton S:** The importance of oxidative stress in apoptosis. *Br Med Bull* 53: 662- 668 (1997).
- 24 **Comroe JH, Dripps RD, Dumke PR, Deming M:** Oxygen toxicity. *J Am Med Ass* 128: 710- 718 (1945).
- 25 **Conger AD, Fairchild LM:** Breakage of chromosomes by oxygen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 38: 289- 299 (1952).
- 26 **Coopersmith CM, Stromberg PE, Dunne WM, Davis CG, Amiot DM 2nd, Buchman TG, Karl IE, Hotchkiss RS:** Inhibition of intestinal epithelial apoptosis and survival in a murine model of pneumonia- induced sepsis. *J Am Med Ass* 287: 1716- 1721 (2002).
- 27 **Crapo JD, Tierney DF:** Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity. *Am J Physiol* 226: 1401- 1407 (1974).
- 28 **Crapo JD, McCord JM:** Oxygen- induced changes in pulmonary superoxide dismutase assayed by antibody titrations. *Am J Physiol* 231: 1196- 1203 (1976).
- 29 **Crapo JD, Sjostrom K, Drew RT:** Tolerance and cross- tolerance using NO₂ and O₂. I. Toxicology and biochemistry. *J Appl Physiol* 44: 364- 369 (1978).
- 30 **Crapo JD, Barry BE, Foscue HA, Shelburne J:** Structural and biochemical changes in rat lungs occurring during exposures to lethal and adaptive doses of oxygen. *Am Rev Respir Dis* 122: 123- 143 (1980).
- 31 **Crapo JD, Barry BE, Gehr P, Bachofen M, Weibel ER:** Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *Am Rev Respir Dis* 126: 332- 337 (1982).
- 32 **Deitch EA:** Animal models of sepsis and septic shock: a review and lessons learned. *Shock* 9: 1- 11 (1998).
- 33 **Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, Gea- Banacloche J, Keh D, Marshall JC, Parker MM, Ramsay G, Zimmerman JL, Vincent JL, Levy MM; Surviving Sepsis Campaign Management Guidelines Committee:** Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 32: 858- 873 (2004).
- 34 **De Moissac D, Zheng H, Kirshenbaum LA:** Linkage of the BH4 domain of Bcl- 2 and the nuclear factor kappaB signaling pathway for suppression of apoptosis. *J Biol Chem* 274: 29505- 29509 (1999).

- 35 **De Paepe ME, Mao Q, Chao Y, Powell JL, Rubin LP, Sharma S:** Hyperoxia- induced apoptosis and Fas/FasL expression in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289: 647- 659 (2005).
- 36 **Dodds WJ:** The pig model for biomedical research. *Fed Proc* 41: 247- 256 (1982).
- 37 **Douglas WR:** Of pigs and men and research: a review of applications and analogies of the pig, *sus scrofa*, in human medical research. *Space Life Sci* 3: 226- 234 (1972).
- 38 **Endo Y, Shimizu T, Mori T, Tabata T, Hanasawa K, Tsuchiya M, Tani T:** Hyperoxic condition prevents bacterial translocation and elevation of plasma microorganism components during hemorrhagic shock. *J Invest Surg* 16: 275- 281 (2003).
- 39 **Fettucciari K, Rosati E, Scaringi L, Cornacchione P, Migliorati G, Sabatini R, Fettriconi I, Rossi R, Marconi P:** Group B Streptococcus induces apoptosis in macrophages. *J Immunol* 165: 3923- 3933 (2000).
- 40 **Fine A, Janssen- Heininger Y, Soultanakis RP, Swisher SG, Uhal BD:** Apoptosis in lung pathophysiology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: 423- 427 (2000).
- 41 **Fink MP, Heard SO:** Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res* 49: 186- 196 (1990).
- 42 **Folz RJ, Abushamaa AM, Suliman HB:** Extracellular superoxide dismutase in the airways of transgenic mice reduces inflammation and attenuates lung toxicity following hyperoxia. *J Clin Invest* 103: 1055- 1066 (1999).
- 43 **Forman HJ, Fisher AB:** Antioxidant defenses. In: *Gilbert DL (Hrsg) Oxygen and Living Processes, An Interdisciplinary Approach, Springer, New York, Kapitel 12, S. 235- 249 (1981).*
- 44 **Franek WR, Horowitz S, Stansberry L, Kazzaz JA, Koo HC, Li Y, Arita Y, Davis JM, Mantell AS, Scott W, Mantell LL:** Hyperoxia inhibits oxidant-induced apoptosis in lung epithelial cells. *J Biol Chem* 276: 569- 575 (2001).
- 45 **Frank L, Yam J, Roberts RJ:** The role of endotoxin in protection of adult rats from oxygen- induced lung toxicity. *J Clin Invest* 61: 269- 275 (1978).
- 46 **Frank L, Summerville J, Massaro D:** Protection from oxygen toxicity with endotoxin. Role of the endogenous antioxidant enzymes of the lung. *J Clin Invest* 65: 1104- 1110 (1980).

- 47 **Freeman BA, Crapo JD:** Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *J Biol Chem* 256: 10986- 10992 (1981).
- 48 **Freeman BA, Crapo JD:** Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47: 412- 426 (1982).
- 49 **Freeman BD, Reaume AG, Swanson PE, Epstein CJ, Carlson EJ, Buchman TG, Karl IE, Hotchkiss RS:** Role of CuZn superoxide dismutase in regulating lymphocyte apoptosis during sepsis. *Crit Care Med* 28: 1701-1708 (2000).
- 50 **Frey EA, Finlay BB:** Lipopolysaccharide induces apoptosis in a bovine endothelial cell line via a soluble CD14 dependent pathway. *Microb Pathog* 24: 101- 109 (1998).
- 51 **Fridovich I:** The biology of oxygen radicals. *Science* 201: 875- 880 (1978).
- 52 **Friedman G, Silva E, Vincent JL:** Has the mortality of septic shock changed with time? *Crit Care Med* 26: 2078- 2086 (1998).
- 53 **Gao LY, Abu Kwaik Y:** Activation of caspase 3 during Legionella pneumophila- induced apoptosis. *Infect Immun* 67: 4886- 4894 (1999).
- 54 **Garrido Adel P, Cruz Junior RJ, Poli de Figueiredo LF, Rocha e Silva M:** Small volume of hypertonic saline as the initial fluid replacement in experimental hypodynamic sepsis. *Crit Care* 10: R 62 (S. 1-9) (2006).
- 55 **Gennari R, Alexander JW:** Effects of hyperoxia on bacterial translocation and mortality during gut- derived sepsis. *Arch Surg* 131: 57- 62 (1996).
- 56 **Gerschmann R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO:** Oxygen poisoning and X- radiation: a mechanism in common. *Science*: 623- 625 (1954).
- 57 **Goldfarb RD, Marton A, Szabó E, Virág L, Salzman AL, Glock D, Akhter I, McCarthy R, Parillo JE, Szabó C:** Protective effect of a novel, potent inhibitor of poly (adenosine 5'- diphosphate- ribose) synthetase in a porcine model of severe bacterial sepsis. *Crit Care Med* 30: 974- 980 (2002).
- 58 **Gomi F, Matsuo M:** Effects of 60% oxygen inhalation on the survival and antioxidant enzyme activities of young and old rats. *Mech Ageing Dev* 123: 1295- 1304 (2002).
- 59 **Greif R, Akca O, Horn EP, Kurz A, Sessler DI:** Supplemental perioperative oxygen to reduce the incidence of surgical- wound infection. Outcomes Research Group. *N Engl J Med* 342: 161- 167 (2000).

- 60 **Gutteridge JM, Mitchell J:** Redox imbalance in the critically ill. *Br Med Bull* 55: 49- 75 (1999).
- 61 **Haddad JJ, Olver RE, Land SC:** Antioxidant/pro- oxidant equilibrium regulates HIF- 1 alpha and NF- kappa B redox sensitivity. Evidence for inhibition by glutathione oxidation in alveolar epithelial cells. *J Biol Chem* 275: 21130- 21139 (2000).
- 62 **Halliwell B, Gutteridge JM:** Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219: 1- 14 (1984).
- 63 **Hampton MB, Orrenius S:** Redox regulation of apoptotic cell death in the immune system. *Toxicol Lett* 102/103: 355- 358 (1998).
- 64 **Hannon JP, Bossone CA, Wade CE:** Normal physiological values for conscious pigs used in biomedical research. *Lab Anim Sci* 40: 293- 298 (1990).
- 65 **Haslett C, Savill J:** Why is apoptosis important to clinicians? *Br Med J* 322: 1499- 1500 (2001).
- 66 **Henson PM, Johnston RB:** Tissue injury in inflammation. *J Clin Invest* 79: 669- 674 (1987).
- 67 **Hiltebrand LB, Krejci V, tenHoevel ME, Banic A, Sigurdsson GH:** Redistribution of microcirculatory blood flow within the intestinal wall during sepsis and general anesthesia. *Anesthesiology* 98: 658- 669 (2003).
- 68 **Hinshaw LB:** Application of animal shock models to the human. *Circ Shock* 17: 205- 212 (1985).
- 69 **Ho YS, Dey MS, Crapo JD:** Antioxidant enzyme expression in rat lungs during hyperoxia. *Am J Physiol* 270: 810- 818 (1996).
- 70 **Hotchkiss RS, Swanson PE, Knudson CM, Chang KC, Cobb JP, Osborne DF, Zollner KM, Buchman TG, Korsmeyer SJ, Karl IE:** Overexpression of Bcl- 2 in transgenic mice decreases apoptosis and improves survival in sepsis. *J Immunol* 162: 4148- 4156 (1999).
- 71 **Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Karl IE:** Endothelial cell apoptosis in sepsis. *Crit Care Med* 30: 225- 228 (2002).
- 72 **Hu X, Yee E, Harlan JM, Wong F, Karsan A:** Lipopolysaccharide induces the antiapoptotic molecules, A1 and A20, in microvascular endothelial cells. *Blood* 92: 2759- 2765 (1998).
- 73 **Jamieson D, Chance B, Cadenas E, Boveris A:** The relation of free radical production to hyperoxia. *Annu Rev Physiol* 48: 703- 719 (1986).

- 74 **Javesghani D, Hussain SN, Scheidel J, Quinn MT, Magder SA:** Superoxide production in the vasculature of lipopolysaccharide- treated rats and pigs. *Shock* 19: 486- 493 (2003).
- 75 **Jenkinson SG:** Oxygen toxicity. *New Horiz* 1: 504- 511 (1993).
- 76 **Jeschke MG, Rensing H, Klein D, Schubert T, Mautes AE, Bolder U, Croner RS:** Insulin prevents liver damage and preserves liver function in lipopolysaccharide- induced endotoxemic rats. *J Hepatol* 42: 870- 879 (2005).
- 77 **Johnson KJ, Fantone JC 3rd, Kaplan J, Ward PA:** In vivo damage of rat lungs by oxygen metabolites. *J Clin Invest* 67: 983- 993 (1981).
- 78 **Kantrow SP, Tatro LG, Piantadosi CA:** Oxidative stress and adenine nucleotide control of mitochondrial permeability transition. *Free Radic Biol Med* 28: 251- 260 (2000).
- 79 **Kazarian KK, Perdue PW, Lynch W, Dziki A, Nevola J, Lee CH, Hayward I, Williams T, Law WR:** Porcine peritoneal sepsis: modeling for clinical relevance. *Shock* 1: 201- 212 (1994).
- 80 **Kellog EW 3rd, Fridovich I:** Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *J Biol Chem* 250: 8812- 8817 (1975).
- 81 **Khaw KS, Wang CC, Ngan Kee WD, Pang CP, Rogers MS:** Effects of high inspired oxygen fraction during elective caesarean section under spinal anaesthesia on maternal and fetal oxygenation and lipid peroxidation. *Br J Anaesth* 88: 18- 23 (2002).
- 82 **Kimball RE, Reddy K, Peirce TH, Schwartz LW, Mustafa MG, Cross CE:** Oxygen toxicity: Augmentation of antioxidant defense mechanisms in rat lung. *Am J Physiol* 230: 1425- 1431 (1976).
- 83 **Kirby JE, Vogel JP, Andrews HL, Isberg RR:** Evidence for pore- forming ability of Legionella pneumophila. *Mol Microbiol* 27: 323- 336 (1998).
- 84 **Knight PR, Holm BA:** The three components of hyperoxia. *Anaesthesiology* 93: 3- 5 (2000).
- 85 **Koike K, Sekine K, Endo T, Nomura R, Shinozawa Y:** Animal models for sepsis. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 104: 800- 804 (2003).
- 86 **Krejci V, Hildebrand LB, Erni D, Sigurdsson GH:** Endothelin receptor antagonist bosentan improves microcirculatory blood flow in splanchnic organs in septic shock. *Crit Care Med* 31: 203- 210 (2003).

- 87 **Kunimoto F, Morita T, Ogawa R, Fujita T:** Inhibition of lipid peroxidation improves survival rate of endotoxemic rats. *Circ Shock* 21: 15- 22 (1987).
- 88 **Labrousche S, Javorschi S, Leroy D, Gbikpi-Benissan G, Freyburger G:** Influence of hyperbaric oxygen on leukocyte functions and haemostasis in normal volunteer divers. *Thromb Res* 96: 309-315 (1999).
- 89 **Lahat N, Rahat MA, Ballan M, Weiss- Cerem L, Engelmayer M, Bitterman H:** Hyperoxia reduces CD 80 expression on monocytes but enhances their LPS-stimulated TNF- alpha secretion. *J Leukoc Biol* 74: 197- 205 (2003).
- 90 **Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G; SCCM/ ESICM/ ACCP/ ATS/ SIS: 2001 SCCM/ ESICM/ ACCP/ ATS/ SIS/ International Sepsis Definitions Conference.** *Crit Care Med* 31: 1250- 1256 (2003).
- 91 **Lewis- Molock Y, Suzuki K, Taniguchi N, Nguyen DH, Mason RJ, White CW:** Lung manganese superoxide dismutase increases during cytokine-mediated protection against pulmonary oxygen toxicity in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 10: 133- 141 (1994).
- 92 **Lindahl SG, Mure M:** Dosing oxygen: a tricky matter or a piece of cake? *Anesth Analg* 95: 1472- 1473 (2002).
- 93 **Majno G, Joris I:** Apoptosis, oncosis, and necrosis: An overview of cell death. *Am J Pathol* 146: 3- 15 (1995).
- 94 **Mak S, Azevedo ER, Liu PP, Newton GE:** Effect of hyperoxia on left ventricular function and filling pressures in patients with and without congestive heart failure. *Chest* 120: 467- 473 (2001).
- 95 **Mak S, Egri Z, Tanna G, Colman R, Newton GE:** Vitamin C prevents hyperoxia- mediated vasoconstriction and impairment of endothelial- dependent vasodilation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: 2412- 2421 (2002).
- 96 **Mantell LL, Kazzaz JA, Xu J, Palaia TA, Piedboeuf B, Hall S, Rhodes GC, Niu G, Fein AF, Horowitz S:** Unscheduled apoptosis during acute inflammatory lung injury. *Cell Death Differ* 4: 600- 607 (1997).
- 97 **Mantell LL, Horowitz S, Davis JM, Kazzaz JA:** Hyperoxia- induced cell death in the lung – the correlation of apoptosis, necrosis, and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 887: 171- 180 (1999).

- 98 **Martinez JM, Wagner KE, Snider RH, Nylen ES, Muller B, Sarani B, Becker KL, White JC:** Late immunoneutralization of procalcitonin arrests the progression of lethal porcine sepsis. *Surg Infect (Larchmt)* 2: 193- 203 (2001).
- 99 **Matejovic M, Radermacher P, Zülke C, Vlatten A, Altherr J, Brinkmann A, Brückner UB, Jauch KW, Georgieff M, Träger K:** Intestinal O₂-exchange and energy balance in hyperdynamic porcine endotoxemia: effects of the TXA₂- inhibitor DTTX30. *Shock* 13: 307- 313 (2000).
- 100 **Matejovic M, Krouzecky A, Martinkova V, Rokyta R, Kralova H, Treska V, Radermacher P, Novak I:** Selective inducible nitric oxide synthase inhibition during long- term hyperdynamic porcine bacteremia. *Shock* 21: 458- 465 (2004).
- 101 **Matejovic M, Krouzecky A, Martinkova V, Rokyta R, Radej J, Kravola H, Treska V, Radermacher P, Novak I:** Effects of tempol, a free radical scavenger, on long- term hyperdynamic porcine bacteremia. *Crit Care Med* 33: 1057- 1063 (2005).
- 102 **McClellan RO:** Applications of swine in biomedical research. *Lab Anim Care* 18: 120- 126 (1968).
- 103 **McCord JM, Fridovich I:** Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244: 6049- 6055 (1969).
- 104 **Meier J, Kemming GI, Kisch- Wedel H, Wölkhammer S, Habler OP:** Hyperoxic ventilation reduces 6- hour mortality at the critical hemoglobin concentration. *Anaesthesiology* 100: 70- 76 (2004).
- 105 **Menzies BE, Kourteva I:** Internalization of Staphylococcus aureus by endothelial cells induces apoptosis. *Infect Immun* 66: 5994- 5998 (1998).
- 106 **Metrailler- Ruchonnet I, Pagano A, Carnesecchi S, Ody C, Donati Y, Barazzone Argiroffo C:** Bcl- 2 protects against hyperoxia- induced apoptosis through inhibition of the mitochondria- dependent pathway. *Free Radic Biol Med* 42: 1062- 1074 (2007).
- 107 **Murphey ED, Traber DL:** Cardiopulmonary and splanchnic blood flow during 48 hours of a continuous infusion of endotoxin in conscious pigs: a model of hyperdynamic shock. *Shock* 13: 224- 229 (2000).
- 108 **Nagata S:** Apoptosis by death factor. *Cell* 88: 355- 365 (1997).

- 109 **Natanson C, Hoffman WD, Suffredini AF, Eichacker PQ, Danner RL:** Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanisms of pathogenesis. *Ann Intern Med* 120: 771- 783 (1994).
- 110 **Nicholson DW:** From bench to clinic with apoptosis- based therapeutic agents. *Nature* 407: 810- 816 (2000).
- 111 **Ogasawara J, Watanabe- Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, Itoh N, Suda T, Nagata S:** Lethal effect of the anti- Fas antibody in mice. *Nature* 364: 806- 809 (1993).
- 112 **O' Reilly MA, Staversky RJ, Stripp BR, Finkelstein JN:** Exposure to hyperoxia induces p53 expression in mouse lung epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18: 43- 50 (1998).
- 113 **O' Reilly MA:** DNA damage and cell cycle checkpoints in hyperoxic lung injury: braking to facilitate repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281: 291- 305 (2001).
- 114 **Oury TD, Chang LY, Marklund SL, Day BJ, Crapo JD:** Immunocytochemical localization of extracellular superoxide dismutase in human lung. *Lab Invest* 70: 889- 898 (1994).
- 115 **Oury TD, Schaefer LM, Fattman CL, Choi A, Weck KE, Watkins SC:** Depletion of pulmonary EC- SOD after exposure to hyperoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: 777- 784 (2002).
- 116 **Pappas CT, Obara H, Bensch KG, Northway WH Jr:** Effect of prolonged exposure to 80 % oxygen on the lung of newborn mouse. *Lab Invest* 48: 735- 748 (1983).
- 117 **Pardo A, Selman M, Ridge K, Barrios R, Sznajder JI:** Increased expression of gelatinases and collagenase in rat lungs exposed to 100 % oxygen. *Am J Respir Crit Care Med* 154: 1067- 1075 (1996).
- 118 **Pastor CM, Payen DM:** Effect of modifying nitric oxide pathway on liver circulation in a rabbit endotoxin shock model. *Shock* 2: 196- 202 (1994).
- 119 **Raff M:** Cell suicide for beginners. *Nature* 396: 119- 122 (1998).
- 120 **Reinhardt K, Bloos F, Konig F, Bredle D, Hannemann L:** Reversible decrease of oxygen consumption by hyperoxia. *Chest* 99: 690- 694 (1991).
- 121 **Reinhardt K, Spies CD, Meier-Hellmann A, Bredle DL, Hannemann L, Specht M, Schaffartzik W:** N- acetylcysteine preserves oxygen consumption

- and gastric mucosal pH during hyperoxic ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 151: 773- 779 (1995).
- 122 **Renahan AG, Booth C, Potten CS:** What is apoptosis, and why is it important? *Br Med J* 322: 1536- 1538 (2001).
- 123 **Rice- Evans CA, Diplock AT:** Current status of antioxidant therapy. *Free Radic Biol Med* 15: 77- 96 (1993).
- 124 **Roy S, Nicholson DW:** Cross- talk in cell death signaling. *J Exp Med* 192: 21- 25 (2000).
- 125 **Saikumar P, Venkatachalam MA:** Role of apoptosis in hypoxic/ischemic damage in the kidney. *Semin Nephrol* 23: 511- 521 (2003).
- 126 **Salvemini D, Cuzzocrea S:** Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation. *Free Radic Biol Med* 33: 1173- 1185 (2002).
- 127 **Saugstad OD:** Resuscitation with room air or oxygen supplementation. *Clin Perinatol* 25: 741- 756 (1998).
- 128 **Saugstad OD, Rootwelt T, Aalen O:** Resuscitation of asphyxiated newborn infants with room air or oxygen: an international controlled trial: the Resair 2 study. *Pediatrics* 102: e1 (1998).
- 129 **Schaffner F, Felig P:** Changes in hepatic structure in rats produced by breathing pure oxygen. *J Cell Biol* 27: 505- 517 (1965).
- 130 **Scheumann GF, Winkler M, Ziesing S:** Stellenwert von Ertapenem bei intraabdominalen Infektionen in der Chirurgie. *Chemother J* 15: 145- 151 (2006).
- 131 **Shasby DM, Fox RB, Harada RN, Repine JE:** Reduction of the edema of acute hyperoxic lung injury by granulocyte depletion. *J Appl Physiol* 52: 1237- 1244 (1982).
- 132 **Simini B:** More oxygen during operations may decrease surgical- wound infections. *Lancet* 355: 383 (2000).
- 133 **Simon GA, Maibach HI:** The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations – an overview. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 13: 229- 234 (2000).
- 134 **Skerrett SJ, Bagby GJ, Schmidt RA, Nelson S:** Antibody- mediated depletion of tumor necrosis factor- alpha impairs pulmonary host defenses to *Legionella pneumophila*. *J Infect Dis* 176: 1019- 1028 (1997).

- 135 **Slater AF, Nobel CS, Orrenius S:** The role of intracellular oxidants in apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1271: 59- 62 (1995).
- 136 **Sohal RS, Agarwal S, Dubey A, Orr WC:** Protein oxidative damage is associated with life expectancy of houseflies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 7255- 7259 (1993).
- 137 **Steinberg J, Halter J, Schiller H, Gatto L, Nieman G:** The development of acute respiratory distress syndrome after gut ischemia/reperfusion injury followed by fecal peritonitis in pigs: a clinically relevant model. *Shock* 23: 129- 137 (2005).
- 138 **Stone R:** Search for sepsis drugs goes on despite past failures. *Science* 264: 365- 367 (1994).
- 139 **Sukhotnik I, Krausz MM, Brod V, Balan M, Turkieh A, Siplovich L, Bitterman H:** Divergent effects of oxygen therapy in four models of uncontrolled hemorrhagic shock. *Shock* 18: 277- 284 (2002).
- 140 **Tähepõld P, Ruusalepp A, Li G, Vaage J, Starkopf J, Valen G:** Cardioprotection by breathing hyperoxic gas- relation to oxygen concentration and exposure time in rats and mice. *Eur J Cardiothorac Surg* 21: 987- 994 (2002).
- 141 **Tateda K, Deng JC, Moore TA, Newstead MW, Paine R 3rd, Kobayashi N, Yamaguchi K, Standiford TJ:** Hyperoxia mediates acute lung injury and increased lethality in murine *Legionella* pneumonia: the role of apoptosis. *J Immunol* 170: 4209- 4216 (2003).
- 142 **Thom SR, Fisher D, Zhang J, Bhopale VM, Ohnishi ST, Kotake Y, Ohnishi T, Buerk DG:** Stimulation of perivascular nitric oxide synthesis by oxygen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: 1230- 1239 (2003).
- 143 **Torii K, Iida K, Miyazaki Y, Saga S, Kondoh Y, Taniguchi H, Taki F, Takagi K, Matsuyama M, Suzuki R:** Higher concentrations of matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid of patients with adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 155: 43- 46 (1997).
- 144 **Tsai AG, Cabrales P, Winslow RM, Intaglietta M:** Microvascular oxygen distribution in awake hamster window chamber model during hyperoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: 1537- 1545 (2003).

- 145 **Tsai BM, Wnag M, March KL, Turrentine MW, Brown JW, Meldrum DR:** Preconditioning: evolution of basic mechanisms to potential therapeutic strategies. *Shock* 21: 195- 209 (2004).
- 146 **Tsan MF, White JE, Santana TA, Lee CY:** Tracheal insufflation of tumor necrosis factor protects rats against oxygen toxicity. *J Appl Physiol* 68: 1211- 1219 (1990).
- 147 **Tsan MF, White JE, Michelsen PB, Wong GH:** Pulmonary O₂ toxicity: role of endogenous tumor necrosis factor. *Exp Lung Res* 21: 589- 597 (1995).
- 148 **Uhal BD:** Cell cycle kinetics in the alveolar epithelium. *Am J Physiol* 272: 1031- 1045 (1997).
- 149 **Uhal BD:** Fas and apoptosis in the alveolar epithelium: holes in the dike? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281: 326- 327 (2001).
- 150 **Vangala RR, Kritzler K, Schoch G, Topp H:** Induction of single- strand breaks in lymphocyte DNA of rats exposed to hyperoxia. *Arch Toxicol* 72: 247- 248 (1998).
- 151 **Vassilev D, Hauser B, Bracht H, Iványi Z, Schoaff M, Asfar P, Vogt J, Wachter U, Schelzig H, Georgieff M, Brückner UB, Radermacher P, Fröba G:** Systemic, pulmonary and hepatosplanchnic effects of N- acetylcysteine during long- term porcine endotoxemia. *Crit Care Med* 32: 525- 532 (2004).
- 152 **Vincent JL, Zhang H, Szabo C, Preiser JC:** Effects of nitric oxide in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 1781- 1785 (2000).
- 153 **Waisman D, Brod V, Wolff R, Sabo E, Chernin M, Weintraub Z, Rotschild A, Bitterman H:** Effects of hyperoxia on local and remote microcirculatory inflammatory response after splanchnic ischemia and reperfusion. *Am J Physiol* 285: 643- 652 (2003).
- 154 **Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP:** Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 17: 331- 367 (1999).
- 155 **Wang CY, Guttridge DC, Mayo MW, Baldwin AS Jr:** NF- kappaB induces expression of the Bcl- 2 homologue A1/Bfl- 1 to preferentially suppress chemotherapy- induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 19: 5923- 5929 (1999).
- 156 **Weinrauch Y, Zychlinsky A:** The induction of apoptosis by bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol* 53: 155- 187 (1999).

- 157 **Wheeler AP, Bernard GR:** Treating patients with severe sepsis. *N Engl J Med* 340: 207- 214 (1999).
- 158 **White CW, Ghezzi P, McMahon S, Dinarello CA, Repine JE:** Cytokines increase rat lung antioxidant enzymes during exposure to hyperoxia. *J Appl Physiol* 66: 1003- 1007 (1989).
- 159 **Wispe JR, Roberts RJ:** Molecular basis of pulmonary oxygen toxicity. *Clin Perinatol* 14: 651- 666 (1987).
- 160 **Wispe JR, Warner BB, Clark JC, Dey CR, Neuman J, Glasser SW, Crapo JD, Chang LY, Whitsett JA:** Human Mn- superoxide dismutase in pulmonary epithelial cells of transgenic mice confers protection from oxygen injury. *J Biol Chem* 267: 23937- 23941 (1992).
- 161 **Witschi H:** Responses of the lung to toxic injury. *Environ Health Perspect* 85: 5- 13 (1990).
- 162 **Xiao H, Xu HW, Liu H, Zhang L:** Effect of ketamine on endotoxin- induced septic shock in rats and its mechanism. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 19: 303- 305 (2007).
- 163 **Yan LJ, Sohal RS:** Prevention of flight activity prolongs the life span of the housefly, *Musca domestica*, and attenuates the age- associated oxidative damage to specific mitochondrial proteins. *Free Radic Biol Med* 29: 1143- 1150 (2000).
- 164 **Yusa T, Crapo JD, Freeman BA:** Hyperoxia enhances lung and liver nuclear superoxide generation. *Biochim Biophys Acta* 798: 167- 174 (1984).
- 165 **Zhang XF, Foda HD:** Pulmonary apoptosis and necrosis in hyperoxia- induced acute mouse lung injury. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 27: 465- 468 (2004).

7 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Radermacher danken. Er hat mir die Möglichkeit gegeben, an dieser Studie mitzuwirken und mir dieses Thema für meine Doktorarbeit überlassen. Seine Antworten auf jegliche Fragen haben mir sehr weitergeholfen und zusätzlich gebührt ihm mein Dank für seine schnellen Korrekturen dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt auch meinem Kommilitonen und Mitdoktoranden Michael Gösele, mit dem ich zusammen durch Höhen und Tiefen dieser Doktorarbeit gegangen bin. Wir haben alle Phasen der Doktorarbeit gemeinsam durchlebt und in äußerst guter Zusammenarbeit alle Bereiche der Arbeit gemeistert. Unsere gegenseitige Unterstützung und Motivation war immer sehr hilfreich und enorm wichtig.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. Hasel bedanken. Sie hat sich für uns extra Zeit genommen, um uns bei den histologischen Auswertungen zu unterstützen. Ihre freundliche Hilfe und ihre Erklärungen waren unverzichtbar und haben uns unheimlich weitergebracht.

Frau Dr. Kirsch möchte ich ebenso meinen herzlichen Dank aussprechen. Ohne ihre sehr freundliche und spontane Hilfe wäre die mikrobiologische Auswertung in dieser Form nicht möglich gewesen.

Ein großes Dankeschön gebührt auch vielen Laborassistentinnen und –assistenten, die uns nicht nur Färbetechniken und sonstige technische Laborfähigkeiten mit viel Geduld erklärt haben, sondern uns auch bei Problemen weitergeholfen haben. Darunter befinden sich in der Parkstraße Andrea Soell, Tanja Schulz, Ingrid Eble und Wolfgang Siegler sowie am Safranberg Carmen Veneruso und Birgit Rettenmaier.

Ebenfalls Danke sagen möchte ich meiner Schwester. Sie hatte immer ein offenes Ohr für meine Gedanken bezüglich dieser Doktorarbeit.

Ganz besonders wichtig ist mir zu guter Letzt ein riesiger Dank an meine Eltern. Sie haben mir das Medizinstudium ermöglicht, unterstützen mich bei allem auf jede erdenkliche Art und Weise und stehen mir stets mit Rat und Tat zur Seite.

Vielen herzlichen Dank!

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Grupp, Caroline
Geburtsdatum/-ort: 30. März 1983/Aalen
Eltern/Schwester: Werner und Elisabeth Grupp/Simone Grupp
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Konfession: evangelisch

Schulbildung

1989-1993 Grundschohule (Parkschohule Essingen)
1993-2002 Gymnasium (Schubart-Gymnasium Aalen)
2002 Abitur

Studium

10/2002 Beginn Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm
10/2003-03/2004 Mitglied der Nachwuchsgruppe des Graduiertenkollegs 460 der
Universität Ulm
08/2004 Ärztliche Vorprüfung
10 u. 11/2008 2. Teil der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen

21.02.- 23.03.2005 Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie,
Unfall- und Wiederherstellungschirurgie (Ostalb-Klinikum Aalen)
25.07.- 31.08.2005 Innere Medizin, Gastroenterologie (Internistische
Gemeinschaftspraxis Dr. med. Auchter und Dr. med. Bopp Aalen)
02.03.- 02.04.2006 Gynäkologie und Geburtshilfe (Ostalb-Klinikum Aalen)
28.08.- 01.10.2006 Dermatologie und Allergologie (Praxis Dr. med. Hehl Aalen)

Praktisches Jahr

27.08.-16.12.2007 1. Tertial, Innere Medizin (Ostalb-Klinikum Aalen)
17.12.07-06.04.2008 2. Tertial, Chirurgie (Ostalb-Klinikum Aalen)
07.04.-27.07.2008 3. Tertial, Anästhesie (Ostalb-Klinikum Aalen)

Dissertation

12/2004 Beginn der klinisch-experimentellen Doktorarbeit
Thema: „Effekte einer späten Beatmung mit reinem Sauerstoff
auf histomorphologische Parameter von Leber und Lunge im
Langzeitmodell des vollentwickelten septischen Schocks beim
Schwein“ (Doktorvater: Prof. Dr. Peter Radermacher)
11/2008 Rigorosum/Abschluss des Promotionsverfahrens

Sprachen

Schulkenntnisse in Englisch, Latein, Französisch; marginal
Italienisch

Hobbys

Musik, Instrumente: Blockflöte, Klavier, Geige, Keyboard, Gitarre
10/2002-09/2007 Mitglied im Universitätsorchester Ulm
seit Anfang 2008 Mitglied im Aalener Symphonie-Orchester
Tennis