

**Detektion reaktiver Sauerstoffspezies im
kardiopulmonalen System mittels *Electron Spin
Resonance (ESR)*-Spektroskopie**

Detection of Reactive Oxygen Species in the Pulmonary System
Using *Electron Spin Resonance (ESR)* Spectroscopy

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

vorgelegt dem Fachbereich Biologie und Chemie der
Justus-Liebig-Universität Gießen

von
Dipl.-Biol. Susan Scheibe
aus
Dresden

Erstgutachter: Prof. Dr. Thomas Wilke

Zweitgutachter: Prof. Dr. Norbert Weißmann

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Juni 2018

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	5
1 Allgemeine Einleitung	7
1.1 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies	7
1.2 Zelluläre ROS- und RNS-Quellen	12
1.2.1 Superoxid- und Hydrogenperoxid-Produktion durch NADPH-Oxidasen	12
1.2.2 Mitochondriale ROS-Produktion	15
1.2.3 NO-Synthasen als Stickstoffmonoxid- und ROS-Quelle	17
1.3 Oxidativer Stress	18
1.3.1 DNA-Schäden	18
1.3.2 Oxidation von Proteinen	19
1.3.3 Lipidperoxidation	19
1.4 Das antioxidative System	20
1.4.1 Nrf2-induzierte antioxidative Mechanismen	20
1.4.2 Endogene Antioxidantien	21
1.4.3 Exogene Antioxidantien	23
1.5 O ₂ -Sensing und ROS im respiratorischen System	25
1.5.1 Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV)	26
1.5.2 O ₂ -Sensoren und Mediatoren einer HPV	28
1.6 Zielstellung	29
2 Methoden	31
2.1 Zellbiologische Methoden	31
2.1.1 Zellkultur	31
2.1.2 Versuchsgenehmigungen	33
2.2 Proteinhistochemische Methoden	33
2.2.1 Proteinaufreinigung aus Lungengewebe und mPASMCMC	33

2.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	34
2.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot	34
2.3	Klinische Methoden	35
2.3.1	Bronchoalveoläre Lavage	35
2.3.2	Biopsie und Histopathologie	35
2.3.3	Zytologie der humanen bronchioalveolären Lavage-Flüssigkeit	36
2.3.3.1	Erythrozyten-Zellyse	36
2.3.3.2	Differenzierung von Leukozyten mittels Pappenheim-Färbung	37
2.3.3.3	Bestimmung des Hämosiderin-Scores	37
2.3.3.4	Immunophänotypisierung mittels Durchflusszytometrie	37
2.3.3.5	Immunophänotypisierung von BALF-Lymphozyten	38
2.4	Fluoreszenzbasierte Methoden zum ROS-Nachweis	40
2.4.1	Fluoreszenzsonden	40
2.4.2	Durchführung der Fluoreszenzmessungen	41
2.5	ESR-Spektroskopie	41
2.5.1	ESR-Probenvorbereitung in normoxischer Umgebung	43
2.5.1.1	Erstellung einer CM^\bullet - und CP^\bullet -Standardreihe	43
2.5.1.2	ESR-Probenvorbereitung von pulmonal-arteriellen Zellen der Maus	43
2.5.1.3	ESR-Probenvorbereitung Lungen- und Lebergewebe	44
2.5.1.4	ESR-Probenvorbereitung bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit	44
2.5.2	ESR-Probenvorbereitung unter hypoxischen Bedingungen	45
2.5.3	ESR-Parameter	45
2.6	ILU-ESR Pilotexperiment	46
2.6.1	Präparation der isolierten, ventilerten und perfundierten Lunge	46
2.6.2	Durchführung eines ILU-ESR-Experiments	47
2.7	Mathematische und statistische Methoden	49
2.7.1	Korrelationsanalysen nach Pearson, Spearman und Kendall	49
2.7.2	Varianzanalyse und lineare Regression	49
2.7.3	Varianzhomogenität und Normalverteilung der Residuen	52
2.7.4	Linearisierende Transformationen	53
2.7.5	Generalisierte lineare Modelle	54
2.7.6	Nichtlineare Regression	54
2.7.7	Kinetik erster Ordnung	56
2.7.8	Anpassung von Dichtefunktionen an empirische Verteilung	56
2.7.9	Modifizierte Doppelintegration eines Nitroxidspektrums	57
2.7.10	Sensitivität und Spezifität (ROC und AUC)	58

2.7.11	Klassifizierung anhand eines Entscheidungsbaums	60
3	Nachweis von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies	61
3.1	Einleitung	61
3.1.1	Grundprinzipien der ESR-Spektroskopie	62
3.1.2	Aufbau und Funktionsweise eines cw-ESR-Spektrometers	65
3.1.3	ESR-Frequenzbänder	67
3.1.4	Strukturelle Analyse der ESR-Spektren	67
3.1.5	Quantitative Analyse der ESR-Spektren	68
3.1.6	<i>Spin traps, Spin probes</i> und <i>Spin labels</i>	71
3.2	Ergebnisse	73
3.2.1	Analyse von Nitroxid-Spektra und -Standardreihen mittels <i>Peak-to-Peak</i> und <i>SpinFit</i> -Methode zellfreier ESR-Proben	73
3.2.1.1	Vergleich der <i>Peak-to-Peak</i> und <i>SpinFit</i> -Methode einer flüssig gemessenen CP^{\bullet} -Standardreihe	73
3.2.1.2	Vergleich der <i>Peak-to-Peak</i> und <i>SpinFit</i> -Methode einer CM^{\bullet} -Standardreihe gefrorener Proben	75
3.2.1.3	Effektiver Durchmesser des <i>AquaX</i> Kapillarbündels	76
3.2.2	Einfluss von Umgebungsbedingungen auf die CM^{\bullet} -Bildungsrate zellfreier ESR-Proben	77
3.2.2.1	Einfluss der Umgebungstemperatur auf das ESR-Signal	77
3.2.2.2	Einfluss des pH-Wertes und der Lagerungstemperatur	79
3.2.2.3	O_2 -Abhängigkeit des ESR-Signals zellfreier, flüssiger Proben	80
3.2.2.4	Dämpfung der O_2 -bedingten Signalanteile (Pilotversuch)	82
3.2.2.5	Einfluss der Hypoxie auf das ESR-Signal zellfreier, gefrorener Proben	85
3.2.3	Einfluss der Zellkonzentration, Inkubationszeit und Passage	86
3.2.3.1	ROS-Produktion als Funktion der Zellkonzentration	86
3.2.3.2	Nichtlinearität des CM^{\bullet} -Signals zwischen Null und 25 000 Zellen	87
3.2.3.3	$O_2^{\bullet-}$ -Produktion als Funktion der pSOD-Inkubationszeit	87
3.2.3.4	Einfluss der Zellpassage auf die $O_2^{\bullet-}$ -Produktion von mPASMC	88
3.2.4	Kompartiment-Spezifität von Hydroxylamin- <i>Spin probes</i>	89
3.2.5	Nachweis nichtradikalischer reaktiver Spezies	92
3.2.5.1	Nachweis von Peroxinitrit	92
3.2.5.2	Nachweis von Hydrogenperoxid mittels <i>Spin probe</i> HHTIO	93
3.2.6	<i>Spin trapping</i> mittels BMPO und DEPMPO	94
3.2.7	Hypoxie-induzierte ROS-Produktion pulmonaler Zellen	95

3.2.7.1	Zelltypspezifischer Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die ROS-Produktion unter akuter Hypoxie	95
3.2.7.2	Einfluss prolongierter und chronischer Hypoxie auf die <i>reactive oxygen species</i> (ROS)/O ₂ ^{•-} -Bildung von murinen PASMC	97
3.2.7.3	Detektion und Lokalisation der ROS-Produktion unter chronischer Hypoxie mittels Fluoreszenzsonden	98
3.2.7.4	Expression Nrf2-regulierter Antioxidantien in mPASMC unter Normoxie, prolongierter und chronischer Hypoxie . . .	101
3.2.8	Einfluss der Vitamin E-Konzentration und des Diätfetts auf die ROS-Bildung im Leber- und Lungengewebe von Ratten	103
3.2.9	ESR-gestützte Zeitreihe an einer isolierten Mauslunge unter Normoxie und akuter Hypoxie	106
3.2.9.1	Physiologischer ROS-Anteil am ESR-Signal	108
4	Reaktive Sauerstoffspezies als potentieller Biomarker zur Diagnose akuter Abstoßungsreaktionen von Lungentransplantaten	115
4.1	Einleitung	115
4.1.1	Akute Abstoßung	115
4.1.2	Diagnose und Therapie	115
4.2	Ziel der Studie	117
4.3	Studiendesign	118
4.3.1	Fallzahlabeschätzung	118
4.4	Ergebnisse	119
4.4.1	Zellzahlabhängige O ₂ ^{•-} -Freisetzung durch Leukozyten	119
4.4.2	Einfluss des Erythrozytenanteils der auf die O ₂ ^{•-} -Freisetzung	121
4.4.3	Charakteristika der Studienpopulation	122
4.4.4	Vergleich der O ₂ ^{•-} -Konzentration und klinischen Routinedaten mit dem Schweregrad der AR	123
4.4.5	Fallzahlen aufgeschlüsselt nach Schwere der Abstoßung	123
4.4.6	Superoxid-/CM [•] -Konzentrationen und BAL-Charakteristika nach Klassifizierung als keine, moderate und schwere AR	125
4.4.7	Superoxid-/CM [•] -Konzentrationen und BAL-Charakteristika nach ISHLT-A (1996+2006) und ISHLT-B (1996)	126
4.4.8	Erhöhte O ₂ ^{•-} -Konzentration bei einer schweren AR	127
4.4.9	BAL-Charakteristika in Abhängigkeit vom Abstoßungsgrad	127
4.4.10	Korrelation zwischen Superoxid-/CM [•] -Konzentration und Leukozytenpopulationen bei einer schweren AR	129
4.4.11	Beziehung zwischen der FEV ₁ und dem Anteil der zurückgewonnen BALF130	

4.4.12	Diagnostische Vorhersagekraft der erfassten Parameter	131
4.4.13	Abhängigkeit des <i>Outcomes</i> vom Geschlecht des Patienten	134
4.4.14	Signifikanz der Gruppenunterschiede der BALF-Fraktionen	136
4.4.15	Referenzbereiche nach Geschlecht und Grad der AR	137
4.4.16	Klassifizierung anhand eines Entscheidungsbaums	139
5	Diskussion	140
5.1	ROS- und O ₂ ^{•-} -Nachweis im pulmonalen System	140
5.2	ROS als potentieller diagnostischer Marker einer schweren Abstoßungsreaktion	169
	Fazit	182
	Appendices	183
A	ILU-ESR	185
B	Ltx-Studie	188
C	R-Funktionen	191
D	Material	192
	Abkürzungen	201
	Literaturverzeichnis	206
	Publikationen	239
	Danksagung	242

Zusammenfassung

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und reaktive Stickstoffspezies (RNS) sind Teil zellulärer und systemischer Signalkaskaden, deren Konzentration durch ein fein abgestimmtes antioxidatives System reguliert wird. Eine exzessive ROS/RNS-Bildung kann hingegen zu oxidativen Schäden und Apoptose führen und somit zur Beschleunigung von Alterungsprozessen und Pathophysiologie der Atherosklerose, kardiopulmonale Erkrankungen, Ischämie/Reperfusionsschäden oder sogar Transplantatabstoßungen beitragen. Damit haben sie auch diagnostische und therapeutische Bedeutung. Der spezifische Nachweis der meisten biologisch relevanten reaktiven Spezies ist jedoch aufgrund ihrer hohen Reaktivität, Diversität und subzellulären Lokalisation schwierig. Aufgrund deren hoher Reaktivität und zahlreicher zellulärer Mechanismen, ROS/RNS zu entfernen, kommen diese *in vivo* in picomolaren oder geringen nanomolaren Konzentrationen vor. Der ROS-Nachweis in biologischen Systemen erfordert deswegen Sonden, die sehr schnell mit ROS reagieren, um mit Antioxidantien konkurrieren zu können. Eine der genauesten Methoden, um ROS zu identifizieren, ist die *Electron Spin Resonance* (ESR)-Spektroskopie unter Verwendung von *Spin probes*, welche quantitativ mit Superoxid ($O_2^{\bullet-}$) aber auch Peroxinitrit ($ONOO^-$) reagieren und dabei stabile Radikale (Nitroxide) bilden. In den meisten ESR-Versuchen wurde die *Spin probe 1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethyl-pyrrolidine* (CMH) verwendet.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf den Auswirkungen von Hypoxie-induziertem oxidativen Stress auf pulmonale Zellen zur Aufklärung (patho-)physiologischer Mechanismen der hypoxisch pulmonalen Vasokonstriktion (von Euler-Liljestrand Mechanismus) und dem Krankheitsbild der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie (Gruppe III nach Nizza-Klassifikation aus 2013) primär anhand von *in vitro* Modellen untersucht. Ergänzend dazu wurde ein zunächst eher messtechnisch ausgerichteter Pilotversuch an einer isolierten, ventilierten und blutfrei-perfundierten Mauslunge (ILU) durchgeführt. Neben dem ESR-Signal wurden hierbei unter anderem auch Daten zum Verlauf des pulmonal-arteriellen Drucks in Form einer hochaufgelösten Zeitreihe erfasst.

In einem Sauerstoff (O_2)-Konzentrationsreihen-Experiment zur akuten Hypoxie (5 min) wurden murine pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen (mPASMC) und murine Lungenfibroblasten (MLF) fünf verschiedenen O_2 -Partialdrucken (nominal 21, 15, 10, 5, 1 % O_2) ausgesetzt. Fibroblasten reagierten auf Hypoxie mit einem fast gleichmäßigem Absinken der $O_2^{\bullet-}$ - bzw. ROS/RNS-Konzentration, während mPASMCs ein komplexeres Verhalten zeigten: Dort war die $O_2^{\bullet-}$ -Produktion bei 1 % am höchsten und bei 15 % am niedrigsten. Unter chronisch hypoxischen Bedingungen (120 h, 1 % O_2) war nahezu kein $O_2^{\bullet-}$ mehr nachweisbar. Damit hängt die Produktion von ROS bzw. RNS sowohl vom Zelltyp als auch vom Ausmaß und der Dauer der Hypoxieexposition ab.

Fluorometrische Methoden auf Basis von *Dihydroethidium* (DHE) oder dessen kationischen Derivat MitoSOX wurden eingesetzt, um diese mit den ESR-gestützten Ergebnissen zu korrelieren. Um auch Hydrogenperoxid (H_2O_2) zu erfassen, wurde die Fluoreszenzsonde *2',7'-Dichlorofluorescein Diacetat* (DCFDA) einbezogen. Anhand von mPASCs von sechs Versuchstieren, welche individuell mit allen oben genannten Methoden sowohl unter Normoxie (120 h, 1 % O_2) als auch unter chronischer Hypoxie (120 h, 1 % O_2) untersucht wurden, zeigte sich eine enge positive Korrelation zwischen CM^\bullet (dem stabilen Nitroxid von CMH) und den Ergebnissen des für intrazelluläres $\text{O}_2^{\bullet-}$ spezifischen DHE-Assays. Stark negativ korrelierte Werte bestanden zwischen CM^\bullet und dem H_2O_2 detektierenden DCFDA-Assay unter Normoxie. Dieses Ergebnis deutet auf ein Gleichgewicht zwischen intrazellulären $\text{O}_2^{\bullet-}$ bzw. ONOO^- einerseits und H_2O_2 andererseits hin. Diese Korrelation bestand unter chronischer Hypoxie nicht mehr.

Die Proteinexpression der durch den *nuclear factor E2-related factor 2* (Nrf2)-regulierten Antioxidantien Katalase (Cat) sowie der zytosolischen und mitochondrialen Superoxid-Dismutase (SOD1 bzw. SOD2) wurde ebenfalls unter Normoxie sowie nach 3 und 120 h Hypoxie bei 1 % an mPASCs untersucht. Bei SOD1 und Cat lag keine von der Hypoxiedauer abhängige Expression vor. Im Unterschied dazu war die SOD2-Expression nach 120 h Hypoxie deutlich, jedoch nicht signifikant vermindert.

Wenig Beachtung findet bislang, dass die physiologische Normoxie verschiedener Zelltypen unterschiedlich ist und stark von der atmosphärischen Normoxie (21 % O_2) abweicht. Die Kultivierung von pulmonalen Zellen bei 21 % O_2 könnte bereits eine Verschiebung der Redox-Homöostase bewirken und damit zu einer Präadaptation an unphysiologische Bedingungen führen, womit Fehlinterpretationen begünstigt werden.

Im Gegensatz zu gefrorenen Proben ist die ROS-Bestimmung mittels ESR in flüssigen Proben unter wechselnder O_2 -Spannung wegen des konzentrationsabhängigen *Spin*-Austauschs zwischen O_2 und Nitroxiden sehr anfällig für Artefakte. *Peak-to-Peak*-Amplituden hängen deswegen stark von der O_2 -Konzentration in der Probe ab. Etwas vermindert gilt dies auch für die Doppelintegration und die sogenannte *SpinFit*-Methode. Damit stellen sich besondere Anforderungen an die technische Durchführung und die Analyse von ESR-gestützten Zeitreihen im Kontext von ILU-Experimenten. Neben der Einschaltung eines *Degassers* in die ESR-Probenschleife wird die direkte Messung der O_2 -Partialdrucke und eine daran anschließende Modellierung der rein durch wechselnde O_2 -Partialdrucke bedingten ESR-Transienten als notwendig angesehen.

Im Kontext einer klinischen Studie bei 78 lungentransplantierten Patienten wurde anhand von 238 histopathologisch sowohl nach der *International Society for Heart and Lung Transplantation* (ISHLT)-Klassifikation ISHLT-A (1996+2006) als auch ISHLT-B (1996) eingestuft Biopsien erstmals die mittels ESR gemessene $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Konzentration in der bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) als möglicher diagnostischer Marker einer akuten Transplantatabstoßung größer gleich A_2 oder B_2 etabliert. $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Konzentrationen der BALF zeigten sich bei Patienten, bei denen anhand der transbronchialen Biopsie eine schwere Abstoßung diagnostiziert wurde, als hochsignifikant erhöht im Vergleich zu jenen, bei denen eine nur moderate Abstoßungsreaktion (kleiner A_2 und kleiner B_2) nachgewiesen wurde oder aus Sicht der Pathologie keine Abstoßung (A_0 bei B_0) bestand. Als Prädiktor einer schweren Abstoßung ergab sich für $\text{O}_2^{\bullet-}$ anhand einer *Receiver-Operating-Characteristic* (ROC)-Analyse eine *Area Under Curve* (AUC) von

0,84. Außerdem konnte der Anteil an Neutrophilen, Makrophagen und der Anteil an zurückgewonnener BALF als etwas schwächere Prädiktoren einer schweren Abstoßung identifiziert werden. Eine heuristische Kombination von $O_2^{\bullet-}$ mit dem Prozentsatz von Makrophagen, Neutrophilen, Eosinophilen und dem zurückgewonnenen BALF-Anteil resultierte in einer AUC von 0,89. Hinsichtlich $O_2^{\bullet-}$, dem Anteil von Neutrophilen und Makrophagen und möglicherweise auch der selten beobachteten Eosinophilen ergaben sich teils signifikante Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Patienten.

Summary

Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) take part in cellular and systemic signalling cascades. Their concentrations are regulated by a finely tuned antioxidative system. Excessive ROS/RNS production can result in oxidative damage and apoptosis, hence accelerate ageing processes and contribute to the pathophysiology of atherosclerosis, cardiopulmonary ailments, ischemia/reperfusion injuries or even allograft rejection. Consequently, these radicals could be of diagnostic and therapeutic value. Due to their high reactivity potential, diversity and subcellular localisation, however, the specific detection of biological relevant species is still rather difficult. Given their high reactivity and numerous cellular clearance mechanisms, ROS/RNS exist *in vivo* in picomolar or low nanomolar concentrations. ROS detection in biological systems therefore requires probes that very rapidly react with ROS to compete with antioxidants. One of the most definitive methods of ROS identification is the *Electron Spin Resonance* (ESR) spectroscopy using spin probes which react quantitatively with superoxide ($O_2^{\bullet-}$) but also peroxynitrite ($ONOO^-$) thereby forming stable radicals (nitroxides). The spin probe 1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethyl-pyrrolidine (CMH) was used in most of the experiments.

The focus of the research was drawn to the effects of oxidative stress on pulmonary cells in order to understand the (patho-)physiology of hypoxic pulmonary vasoconstriction (von Euler-Liljestrand mechanism) as well as the hypoxia-induced form of pulmonary hypertension (Group III under the Nizza classification of 2013). Experiments were performed primarily *in vitro*, but also as a metrological aligned pilot experiment on an isolated, ventilated and blood-free perfused murine lung (IPL) where, among other data, ESR and pulmonal-arterial pressure data were simultaneously recorded as a high-resolution time series.

In an oxygen (O_2) concentration series experiment addressing acute hypoxia, murine pulmonary arterial smooth muscle cells (mPASMC) and murine lung fibroblasts (MLF) were exposed to five different O_2 partial pressures (nominally 21, 15, 10, 5, 1 % O_2) for five minutes. While fibroblasts responded to hypoxia with an almost steady decrease in $O_2^{\bullet-}$ and ROS/RNS, mPASMC showed a more complex behavior: $O_2^{\bullet-}$ production was highest at 1 % O_2 (gas phase), lowest at 15 % O_2 . Almost no $O_2^{\bullet-}$ was detectable when the cells were exposed to chronic hypoxic conditions (120 h, 1 % O_2). Thus ROS/RNS production was shown to be dependant on cell type, scale and duration of hypoxic exposition.

Fluorometric methods based on Dihydroethidium (DHE) and its cationic derivative MitoSOX were applied to correlate these data with the ESR results. Simultaneously, 2',7'-Dichlorofluorescein Diacetat (DCFDA) was used to illuminate the hydrogenperoxide (H_2O_2) angle of the ROS system. For this purpose mPASMC from six animals were individually processed by each method under normoxic and chronic

hypoxic conditions. For normoxic (120 h at 21 % O₂) and chronic hypoxic conditions (120 h at 1 % O₂), results showed a close positive correlation between CM• (the stable nitroxide of CMH) and DHE, with DHE being known to specifically detect intracellular O₂•⁻. A strong negative correlation was observed between CM• and the H₂O₂ detecting DCFDA under normoxia, indicating a balance between intracellular O₂•⁻ and ONOO⁻ on the one hand and H₂O₂ on the other. The correlation vanished under chronic hypoxia.

The protein expression of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)-regulated antioxidants catalase (Cat) as well as the cytosolic and mitochondrial superoxide dismutases SOD1 and SOD2 was examined using mPASCs under normoxic and hypoxic conditions (3 and 120 h at 1 % O₂). While the SOD1 and Cat expression did not show any difference with respect to the hypoxic exposure time SOD2 was remarkably but not significantly down-regulated after 120 h hypoxia.

Currently, not much attention is paid to the fact that physiologically normoxic conditions strongly depend on the considered celltype, and are very different from atmospheric normoxia (21 % O₂). Cultivating pulmonal cells at 21 % O₂ in the gas phase shifts the redox homeostasis resulting in a preadaption to abnormal conditions, and possibly leading to misinterpretations.

Compared to frozen samples the interpretation of ESR based ROS measurements in liquid samples are prone to artefacts due to a spin exchange between O₂ and nitroxides depending on the concentration. Peak-to-peak amplitudes thus strongly depend on the oxygen content in the sample. To a somewhat lesser extend, the same applies to the double integration and the so called *SpinFit* procedure. This means in context of IPL experiments the technical realization and analysis has to meet special requirements. Besides reducing the O₂ influence by inserting a degasser into the ESR sample loop, direct measurements of the oxygen partial pressure in the perfusate system and a subsequent modelling of the O₂-induced transients of the acquired ESR signal are suggested to address the problem.

In context of a clinical study on 78 lung-transplanted patients and 238 transbronchial biopsies graded according to International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) classification ISHLT-A (1996+2006) as well as ISHLT-B (1996), for the first time ever O₂•⁻ data from bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were shown to be a potential clinical biomarker of lung allograft rejection greater than A₁ or B₁. O₂•⁻ levels of this group are significantly higher (p<0.001) compared to those graded as moderate (less than A₂ and less than B₂) or no allograft rejection (A₀ together with B₀). The area under curve (AUC) for O₂•⁻ was 0.84 when predicting a severe rejection according to a receiver operating characteristic (ROC) analysis. Furthermore, the percentages of neutrophils, macrophages, and the fraction of recovered BALF were identified as comparatively weaker predictors of a severe allograft rejection. The heuristic combination of O₂•⁻ with the percentage of macrophages, eosinophils and the recovered BALF fraction resulted in an AUC value of 0.89. Finally, partly significant differences were found between male and female patients regarding O₂•⁻, the fraction of BALF neutrophils, macrophages and possibly also of the (rarely observed) eosinophils.

Kapitel 1

Allgemeine Einleitung

1.1 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies [*reactive oxygen species* (ROS)] und reaktive Stickstoffspezies [*reactive nitrogen species* (RNS)] werden von nahezu allen eukaryotischen Zellen produziert. In physiologischen Konzentrationen sind sie essentiell für die Regulation von zellulären und systemischen Signalkaskaden durch Redox-Signalling [1]. Besonders Hydrogenperoxid (H_2O_2) und Stickstoffmonoxid ($\bullet\text{NO}$) agieren als sekundäre Botenstoffe [2, 3]. ROS modulieren die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wie dem *nuclear factor E2-related factor 2* (Nrf2), der das zytoprotektive und antioxidative System reguliert [4–6], dem Hypoxie-induzierten Faktor-1 α [*hypoxia inducible factor-1 α* (HIF-1 α)], welcher bei systemisch oder zellulär auftretender Hypoxie stabilisiert wird und zu Erythropoese und Proliferation beiträgt [7, 8] und dem *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells* (NF- κ B), welcher bei Entzündungsreaktionen, Immunantwort, Proliferation und Apoptose involviert ist [9–11]. Die Aktivierung der Signalkaskaden ist stark von Art und Dauer des Stresses sowie dem Zelltyp abhängig [12].

Zu niedrige ROS- und RNS-Konzentrationen können Ursache einer Deregulation physiologischer Prozesse sein [13, 14]. Ein exzessiver Anstieg der ROS-Konzentration hingegen kann zu oxidativen Schädigungen von Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren führen (Abs. 1.3) [15]. So sind ROS mit einer Beschleunigung von Alterungsprozessen, altersbedingten Behinderungen sowie der Pathogenese und Progression einer Vielzahl von Erkrankungen assoziiert [12, 16]. Es konnte nachgewiesen werden, dass sie u. a. bei der Pathogenese von Diabetes mellitus, neurodegenerativen, kardiovaskulären und pulmonalen Erkrankungen sowie der Tumorgenese involviert sind [17–25]. Ein fein abgestimmtes, antioxidatives System reguliert die ROS-Konzentration, um die zelluläre Redox-Homöostase (Gleichgewicht zwischen Oxidation und Reduktion) aufrechtzuerhalten (Abs. 1.4).

ROS entstehen durch Aufnahme einzelner Elektronen bzw. sequenzielle Reduktion molekularen Sauerstoffs (O_2) (Abb. 1.1). Sie umfassen sowohl nichtradikalische als auch radikalische re-

aktive Spezies. Zu den nichtradikalischen Oxidantien gehören z. B. H_2O_2 , Peroxinitrit (ONOO^-) und Lipidperoxid (LOOH). Zu den Radikalen zählen unter anderem Superoxid ($\text{O}_2^{\bullet-}$), das Hydroxylradikal ($\bullet\text{OH}$), das Lipidradikal (L^\bullet) und das Lipidperoxyradikal (LOO^\bullet) (Abb. 1.2). Sie weisen ein oder mehrere ungepaarte Elektronen im äußeren π^* -Orbital auf [26, 27]. Dadurch besitzen sie eine hohe Affinität, ein zweites Elektron eines möglichen Reaktionspartners aufzunehmen, um eine stabilere, chemische Bindung einzugehen. Aus O_2 entsteht so $\text{O}_2^{\bullet-}$ durch reduktive Aufnahme eines Elektrons in eines der sogenannten antibindenden π^* -Orbitale (Orbitale, die nur mit einem Elektron besetzt sind). Durch weitere nachfolgende Ein-Elektron-Übergänge entstehen H_2O_2 und das $\bullet\text{OH}$ und nach vierfacher Elektronen-Reduktion Wasser (H_2O) (Abb. 1.1) [26].

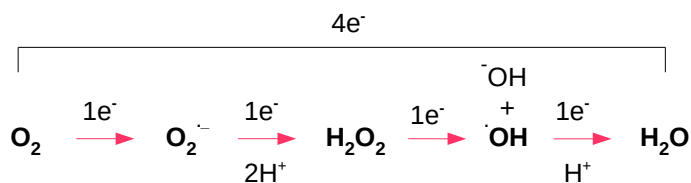


Abbildung 1.1: Sequentielle Reduktion von O_2 nach H_2O . Molekularer Sauerstoff (O_2) besitzt zwei freie Elektronen (e^-) und ist damit ein Biradikal. Die Ein-Elektron-Reduktion (ein Elektron wird auf Sauerstoff übertragen) führt zum Superoxid ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Eine Zwei-Elektronen-Reduktion von O_2 führt zum Hydrogenperoxid (H_2O_2), der vollprotonierten Form von O_2 . Ist zweiwertiges Eisen (Fe^{2+}) vorhanden, wird aus H_2O_2 das hochreaktive Hydroxylradikal ($\bullet\text{OH}$) gebildet. Nach vierfacher Elektronen-Reduktion entsteht Wasser (H_2O) [26].

Zu den ROS zählen außerdem die hypochlorige Säure (HOCl), Ozon (O_3) und Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) [27–29]. In Gegenwart katalytischer Mengen von redoxaktiven Metallen, v. a. Kupfer (Cu^+ , Cu^{2+})- und Eisenionen (Fe^{2+} , Fe^{3+}), werden Aldehyde, wie Malondialdehyd (MDA) und 4-Hydroxynonenal (4-HNE), als Zerfallsprodukt von LOOH gebildet [30]. Freie Radikale können darüber hinaus durch homolytische Aufspaltung einer kovalenten Bindung, der sogenannten Radiolyse, gebildet werden. So werden bei der homolytischen Spaltung der O-O-Bindung in H_2O_2 zwei $\bullet\text{OH}$ gebildet [26, 31].

Superoxid

Superoxid ($\text{O}_2^{\bullet-}$) entsteht durch Ein-Elektron-Reduktion direkt aus O_2 und ist somit Vorläufer von den meisten anderen ROS (Abb. 1.1). Es ist hochreaktiv und hat eine effektive Halbwertszeit von wenigen Millisekunden. $\text{O}_2^{\bullet-}$ kann enzymatisch durch Superoxid-Dismutasen (SOD) zu dem stabileren, nichtradikalischen H_2O_2 reduziert werden (Glg. 1.1) [32] als auch spontan durch schnelle Reaktion mit einem zweiten $\text{O}_2^{\bullet-}$ (*self-dismutation*) H_2O_2 bilden [29]. Da $\text{O}_2^{\bullet-}$ ein polares Molekül ist, kann es Membranen, mit Ausnahme des Transports durch selektive Anionenkanäle [u. a. *voltage-dependent anion channel* (VDAC)], nicht passieren [23, 33]. Es ist unter physiologischen Bedingungen eines der wichtigsten Signalmoleküle. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von $\text{O}_2^{\bullet-}$, der schnellen Dismutation in Anwesenheit von Antioxidantien und der

negativen Ladung muss das Radikal jedoch in der Nähe seines *Targets* freigesetzt werden, um effektiv als Signalmolekül agieren zu können [34].

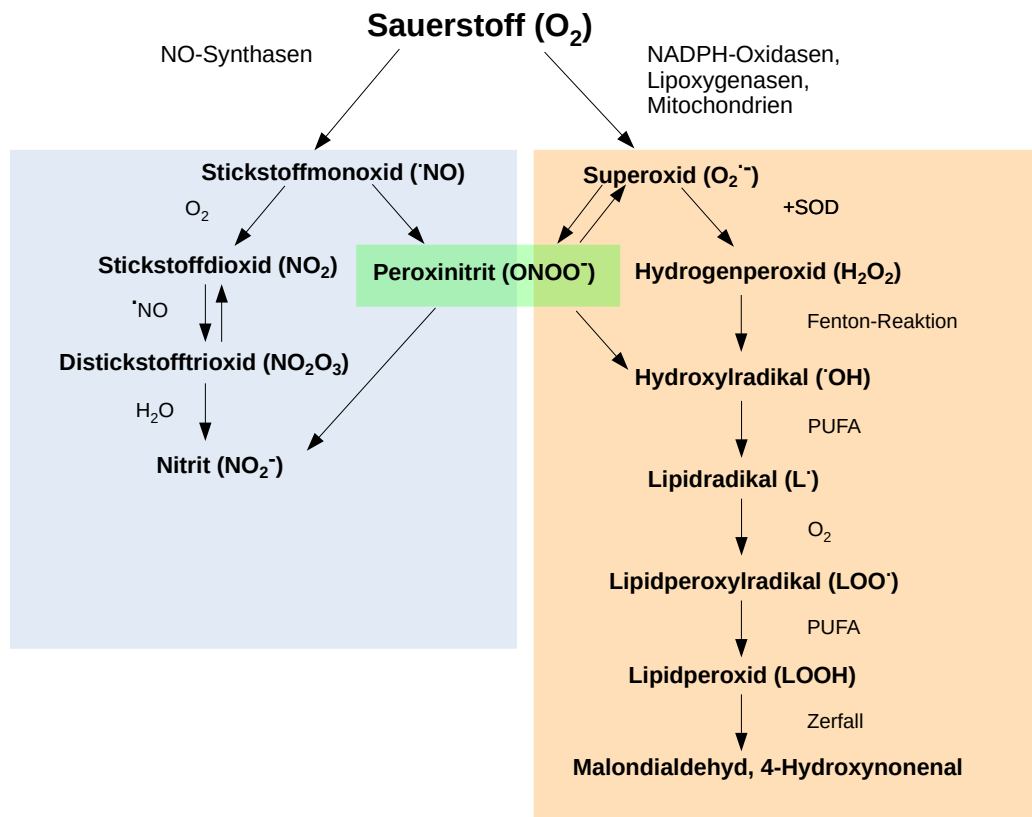


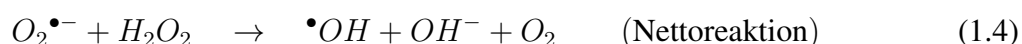
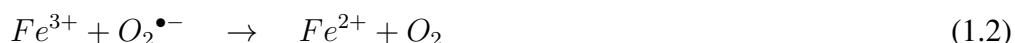
Abbildung 1.2: Überblick über reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies. ROS- bzw. RNS-Quellen sind u. a. NADPH-Oxidasen, die mitochondriale Elektronen-Transportkette, Lipoxygenasen und NO-Synthasen [29]. Superoxid ($O_2^{\bullet-}$) wird durch Ein-Elektron-Reduktion aus Sauerstoff (O_2) gebildet und durch Superoxid-Dismutasen (SOD) zu Hydrogenperoxid (H_2O_2) katalysiert [32]. In Anwesenheit von Redox-Metallionen entsteht via Fenton-Reaktion das Hydroxylradikal ($\bullet OH$) [35], welches durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA) zum Lipidradikal (L^\bullet) reduziert werden kann. L^\bullet reagiert mit O_2 zum Lipidperoxyradikal (LOO^\bullet), welches u. a. durch PUFA zum Lipidperoxid ($LOOH$) und L^\bullet reduziert wird [26]. Stickstoffmonoxid ($\bullet NO$) wird enzymatisch durch NO-Synthasen aus L-Arginin und O_2 gebildet. In der Reaktion zwischen $\bullet NO$ und $O_2^{\bullet-}$ entsteht Peroxinitrit ($ONOO^-$). $ONOO^-$ ist ein starkes Oxidanz und nitrierendes Agens, aus dem durch Ein- oder Zwei-Elektronen-Reduktion $\bullet OH$ und Nitrit (NO_2^-) entstehen können [3]. $ONOO^-$ kann außerdem durch Oxidation von Tetrahydrobiopterin (BH_4) zur Entkopplung der endothelialen NO-Synthase führen, wodurch diese $O_2^{\bullet-}$ anstatt $\bullet NO$ bildet [36]. In Gegenwart katalytischer Mengen von Redox-Metallionen werden Aldehyde, wie das Malondialdehyd und 4-Hydroxynonenal gebildet [30].

Hydrogenperoxid

Unter physiologischen Bedingungen entsteht Hydrogenperoxid (H_2O_2) vorrangig in Peroxisomen und Mitochondrien als Endprodukt von Oxidationsreaktionen. H_2O_2 ist stabiler als $O_2^{\bullet-}$ und kann, aufgrund der fehlenden Ladung, durch Zellmembranen diffundieren und als Signalmolekül zwischen verschiedenen Zellkompartimenten als auch extrazellulär agieren [2, 37]. Spezifische Aquaporin-Kanäle erleichtern ebenfalls das Passieren durch die Plasmamembran ins Zytoplasma [2, 38]. H_2O_2 wird im biologischen System stark durch die Enzyme Katalase (Cat), Glutathion-Peroxidase (GPX) und Peroxiredoxin (Prx) reguliert, die es zu H_2O reduzieren [4, 39].

Hydroxylradikal

Das Hydroxylradikal ($\bullet\text{OH}$) ist das reaktivste Oxidanz unter den biologisch relevanten ROS. Die Halbwertszeit wird auf wenige Nanosekunden geschätzt [29]. Aufgrund seines hoch positiven Redoxpotentials (je positiver das Redoxpotential, desto stärker die Oxidationskraft) reagiert es mit einer Vielzahl von biologischen Molekülen. $\bullet\text{OH}$ kann durch den Zerfall von H_2O_2 entstehen, der durch Übergangsmetalle (Metalle, die mehrere Oxidationszustände einnehmen können) katalysiert wird. Diese Reaktion findet hauptsächlich bei Vorliegen von zweiwertigem Eisen (Fe^{2+}) über die Fenton-Reaktion (Glg. 1.3) statt. Obwohl andere Übergangsmetallionen (z. B. Cu^+ , Cu^{2+}) ebenso fähig wären, die Fenton-Reaktion zu katalysieren, wird die Eisen-katalysierte Fenton-Reaktion als Hauptmechanismus bei der Bildung von $\bullet\text{OH}$ angesehen. Außerdem kann es in der Haber-Weiss-Reaktion aus $\text{O}_2^{\bullet-}$ und H_2O_2 entstehen. In den Glg. 1.1 bis 1.4 ist dargestellt, wie Eisen über die Fenton- und Haber-Weiss-Reaktion die Produktion von $\bullet\text{OH}$ bewirkt [35, 40].



1.1: Dismutasereaktion; 1.2: Eisenreduktion; 1.3: Fenton-Reaktion; 1.4: Haber-Weiss-Reaktion

Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid ($\bullet\text{NO}$) ist mit einer Halbwertszeit von 10 bis 30 s das stabilste unter den biologisch relevanten Radikalen [3]. In Säugerzellen wird $\bullet\text{NO}$ enzymatisch durch NO-Synthasen (NOS) (Abs. 1.2.3) aus L-Arginin (Arg) und O_2 unter Verbrauch von NADPH gebildet (Glg. 1.5). Bei der Reaktion wird L-Citrullin (L-Cit) abgespalten [41]. Hauptbildungsort ist das Gefäß- und Atemwegsepithel [42].

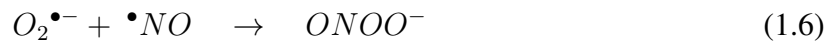


Das gasförmige $\bullet\text{NO}$ diffundiert leicht durch die Zellmembran in die Gefäßmuskelzelle, aktiviert das lösliche Enzym Guanylat-Cyclase (sGC), führt zur Produktion von 3',5'-Guanosinmonophosphat (cGMP) und damit zur Relaxation der Gefäßmuskulatur [43, 44]. Die Signaltransduktion wird durch Phosphodiesterasen terminiert, welche cGMP zu 5'-Guanosinmonophosphat hydrolysieren [45]. Da $\bullet\text{NO}$ bereits in geringen Konzentrationen reduzierend auf den Gefäßtonus wirkt, stellt es einen potenten Vasodilatator dar [42]. Im Hinblick auf die

Atherogenese sind die meisten Effekte des endothelialen •NO protektiv und steuern zur Aufrechterhaltung der kardiovaskulären Homöostase bei. Weitere Funktionen sind die Hemmung der Thrombozytenaggregation, der Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen und der Oxidation von Lipoproteinen geringer Dichte [*Low-density Lipoprotein (LDL)*] [46, 47]. Außerdem agiert •NO als Signalmolekül bei Entzündungsreaktionen, Neuroplastizität und Zytotoxizität [3, 48, 49].

Peroxinitrit

Bei dem nichtradikalischen, anionischen Peroxinitrit (ONOO^-) handelt es sich um ein potentes Oxidanz, welches mit einer Halbwertszeit von 10 bis 20 ms gegenüber anderen freien Radikalen relativ stabil, aber deutlich kurzlebiger als •NO ist [3, 50]. ONOO^- wird aus •NO und $\text{O}_2^{\bullet-}$ gebildet (Glg. 1.6) [36]. In hydrophober Umgebung zerfällt es jedoch wieder zu $\text{O}_2^{\bullet-}$ und •NO [51, 52].



ONOO^- kann Tetrahydrobiopterin (BH_4), einem intrazellulären Kofaktor der endotheliale NO-Synthase (eNOS), oxidieren. Die dadurch hervorgerufenen BH_4 -Verarmung führt zu einer partiellen Entkopplung der eNOS, wodurch das Enzym $\text{O}_2^{\bullet-}$ anstatt •NO produziert [36, 53, 54]. Durch die schnelle Reaktion zwischen $\text{O}_2^{\bullet-}$ und •NO wird wiederum ONOO^- gebildet, welches zur partiellen Entkopplung nahezu aller NOS (Abs. 1.2.3) und einer verminderten •NO-Verfügbarkeit führt und letztendlich in einer endothelialen Dysfunktion resultieren kann [55, 56].

ONOO^- befindet sich mit der korrespondierenden Peroxosalpetersäure (ONOOH) im Gleichgewicht. Unter physiologischen Bedingungen liegt ONOOH zu 80 % in anionischer (ONOO^-) und zu 20 % in protonierter (ONOOH) Form vor. ONOOH ist ein ungewöhnliches Hydroperoxid, das durch Glutathion-Peroxidasen zu Nitrit (NO_2^-) und H_2O reduziert werden kann [57, 58]. Sowohl ONOO^- als auch dessen protonierte Form können direkt mit verschiedenen Biomolekülen interagieren. ONOO^- kann u. a. Lipide und Proteine schädigen, Deoxyribonukleinsäure (DNA)-Strangbrüche initiieren und die mitochondriale Atmungskette inhibieren [3, 51]. Es kann zu einer verstärkten NF- κ B-Aktivität und somit zu einer erhöhten Expression der induzierbaren NOS (iNOS) und Stimulation von Entzündungskaskaden führen [55]. Bei der Reaktion von ONOO^- mit Kohlendioxid (CO_2) werden NO_2^- und Carbonatradikal-Anionen ($\text{CO}_3^{\bullet-}$) gebildet, die ihrerseits wiederum Proteine und DNA schädigen können [58].

1.2 Zelluläre ROS- und RNS-Quellen

Es sind eine Vielzahl zellulärer ROS- bzw. RNS-Quellen bekannt. In Säugerzellen sind NADPH-Oxidasen, die entkoppelte eNOS und die Enzymkomplexe der mitochondrialen Elektronentransportkette [*electron transport chain* (ETC)] die Bedeutendsten. ROS-Quellen können miteinander interagieren, was wiederum zu *feed forward*-Prozessen und somit zu einer erhöhten ROS-Freisetzung und exzessivem oxidativen Stress führen kann [59, 60]. Dieses als ROS-induzierte ROS-Bildung (*ROS induced ROS*) bekannte Phänomen wurde in verschiedenen Studien beschrieben. So aktiviert zytosolisches H_2O_2 phagozytische und nicht-phagozytische NADPH-Oxidasen, wodurch die $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Freisetzung ansteigt [60]. Das durch NADPH-Oxidasen gebildete $\text{O}_2^{\bullet-}$ führt wiederum zum Öffnen Adenosintriphosphat (ATP)-sensitiver Kaliumkanäle (K_{ATP}) wodurch der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials verursacht werden kann und letztendlich in einem Anstieg des mitochondrialen ROS (mtROS) resultiert [61, 62]. Ebenso kann eine Inhibition des Elektronentransports der ETC eine erhöhte mtROS-Bildung bewirken. MtROS gelangt durch Diffusion (H_2O_2) oder Porine und selektive Anionenkanäle (H_2O_2 und $\text{O}_2^{\bullet-}$) in der äußeren Mitochondrienmembran ins Zytosol und somit zu einem Anstieg des zytosolischen ROS führen [63, 64]. Es wird angenommen, dass zwischen 20 und 30 % des zytosolischen H_2O_2 mitochondrialen Ursprungs ist [63, 65]. Dadurch können wiederum NADPH-Oxidasen aktiviert werden. Durch Bildung einer *feed forward*-Schleife kommt es zu einer substantiellen Erhöhung von $\text{O}_2^{\bullet-}$ und H_2O_2 [66–68]. Das durch NADPH-Oxidasen und Mitochondrien gebildete $\text{O}_2^{\bullet-}$ kann außerdem mit dem durch eNOS gebildeten $\bullet\text{NO}$ zu ONOO^- reagieren. ONOO^- wiederum entkoppelt die eNOS, wodurch nicht $\bullet\text{NO}$, sondern $\text{O}_2^{\bullet-}$ gebildet wird [36, 56, 69].

1.2.1 Superoxid- und Hydrogenperoxid-Produktion durch NADPH-Oxidasen

Zu der sieben NADPH-Oxidase (NOX)-Isoformen umfassenden Familie von Transmembranproteinen gehören NOX1 bis 5 sowie die dualen Oxidasen 1 und 2 (DUOX1/2) [70, 71]. Alle NOX-Isoformen bestehen aus sechs Transmembran-Domänen und einen zytosolischen C-Terminus. Die dritte und fünfte Transmembran-Domäne enthält konservierte Histidin-Residuen, die an zwei prosthetischen Hämgruppen binden (Abb. 1.3). Der C-Terminus kodiert für zwei Domänen, die Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und NADPH binden. Die prosthetischen Gruppen dienen dem Elektronentransfer von NADPH (im Zytosol) auf FAD, danach auf jede Hämgruppe und letztendlich auf O_2 auf der entgegengesetzten Seite der Zellmembran, um $\text{O}_2^{\bullet-}$ zu bilden. NOX1 bis 4 sind konstitutiv mit dem membrangebundenen $p22^{\text{phox}}$ assoziiert. NOX1 ist außerdem mit der zytosolischen Untereinheit NOXO1 (Homolog zu $p47^{\text{phox}}$), NOXA1 (Homolog zu $p67^{\text{phox}}$) und *Rac* assoziiert, NOX2 hingegen mit $p47^{\text{phox}}$, $p67^{\text{phox}}$ und *Rac*. NOX4 benötigt

keine zytosolische Untereinheit und bildet über einen zweifachen Ein-Elektron-Transfer zwei $O_2^{\bullet-}$, die zu H_2O_2 dismutiert werden, noch bevor die Radikale vom Enzym freigesetzt werden. NOX5 und DUOX1/2 sind nicht mit $p22^{phox}$ oder einer zytosolischen Untereinheit assoziiert. Die Aktivierung der Isoformen erfolgt durch Kalziumbindung an dem N-Terminal bedingenden EF-Hand-Motiv, einem spezifischen Aminosäuremotiv, das Kalzium-Ionen bindet. DUOX1/2 weisen zusätzlich dazu eine extrazelluläre Peroxidase-Domäne auf [28, 71].

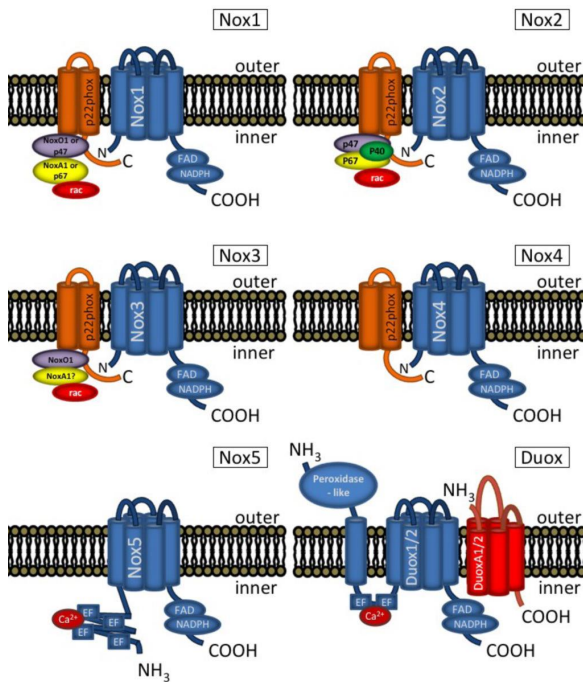


Abbildung 1.3: Strukturhomologie der NADPH-Oxidasen NOX1 bis 5 und DUOX1/2. Sie bestehen aus sechs Transmembran-Domänen und einem zytosolischen C-Terminus. NOX1 bis 4 sind konstitutiv mit dem membrangebundenen $p22^{phox}$ assoziiert. NOX1 ist außerdem mit der zytosolischen Untereinheit NOXO1, NOXA1 und Rac assoziiert; NOX2 hingegen mit $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ und Rac. NOX4 benötigt keine zytosolische Untereinheit und bildet über einen zweifachen Ein-Elektron-Transfer zwei $O_2^{\bullet-}$, die zu H_2O_2 dismutiert werden, noch bevor die vom Enzym freigesetzt werden. NOX5 und DUOX1/2 sind nicht mit $p22^{phox}$ oder einer zytosolischen Untereinheit assoziiert. Die Aktivierung der Isoformen erfolgt durch Kalziumbindung an dem N-Terminal bedingenden EF-Hand-Motiv. DUOX1/2 weisen zusätzlich dazu eine extrazelluläre Peroxidase-Domäne auf. DUOX1/2 sind zytospezifische Reifefaktoren. Modifiziert nach Brown und Griendling [28].

dem wird postuliert, dass NOX1- und DUOX1/2-generiertes ROS bei der Abwehr von Pathogenen und der Regulation von Entzündungs- bzw. Wundheilungsprozessen involviert sind [28, 75, 76]. Zum anderen können $O_2^{\bullet-}$ und H_2O_2 spezifisch und reversibel mit Proteinen reagieren und dadurch deren Aktivität, Lokalisation und Halbwertszeit verändern. Durch NOX generiertes ROS werden Redox-sensitive Signalwege moduliert, die in eine Vielzahl von zellulären Prozessen involviert sind (Tab. 1.1) [70, 72].

NOX1 ist in den Caveolae (Einbuchtungen der Plasmamembran, in der Signalmoleküle

Bei Säugern werden NADPH-Oxidasen in nahezu allen Zelltypen exprimiert. Die Expression der NOX-Isoformen hängt von Gewebe, Zelltyp und Kompartiment ab. Oft können jedoch im gleichen Zelltyp verschiedene NADPH-Oxidasen mit unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation und Funktion nachgewiesen werden (Tab. 1.1) [28]. Innerhalb des humanen Gefäßsystems sind die NOX-Isoformen NOX1, NOX2, NOX4 und NOX5 bedeutend [71–73]. Die NOX-Isoformen NOX3, DUOX1/2 hingegen wurden im Gehirn und Innenohr (NOX3) sowie der Lunge und Schilddrüse (DUOX1/2) nachgewiesen [28, 74].

NADPH-Oxidasen katalysieren die Reduktion von O_2 zur Bildung von $O_2^{\bullet-}$ oder H_2O_2 unter Verwendung von NADPH als Elektronendonator [29]. ROS, das durch NADPH-Oxidasen produziert wird, scheint zwei grundsätzliche physiologische Funktionen zu haben. Zum einen setzen Makrophagen und Neutrophile während des respiratorischen Bursts durch NOX2 produziertes $O_2^{\bullet-}$ frei. Außerdem

konzentriert vorkommen) und den Endosomen lokalisiert. Das Enzym bildet konstitutiv in geringen Mengen $O_2^{\bullet-}$. Obwohl die Orientierung ähnlich zu der von NOX2 ist, wirken von NOX1 generierte ROS vor allem intrazellulär. NOX1 und 2 finden sich auch in sogenannten Redoxisomen, d. h. Endosomen, die für das frühe, Rezeptor-vermittelte *Signalling* in nicht-phagozytischen Zellen verantwortlich sind [56, 71, 72].

Katalytische Untereinheit	Subzelluläre Lokalisation	Funktion (Organ/Ort)
NOX1	Caveolae auf Zelloberfläche Endosomen	Migration und Proliferation (VSMC, Lungen-Epithelzellen) frühes, Rezeptor-vermitteltes <i>Signalling</i> in nicht-phagozytischen Zellen
NOX2	Phagosomenmembran Endosomen Caveolae auf Zelloberfläche	respiratorischer Burst (Phagozyten) frühes, Rezeptor-vermitteltes <i>Signalling</i> in nicht-phagozytischen Zellen Proliferation und Migration (Endothelzellen) •NO- <i>Signalling</i> (Endothelzellen), Angiogenese
NOX3	Plasmamembran	Biosynthese/ Kristallisation der Otokonien im Innenohr Apoptose von Neuronen nach Verletzung Schutz von Lungenepithelzellen Vorbeugung vor Elastindefizit der Lunge und Emphysem
NOX4	Plasmamembran Mitochondrienmembran Nukleus, ER	Migration und Differenzierung (VSMC, Endothel) zelluläre Adaptierung an oxidativen Stress durch Aktivierung von Nrf2, HIF-1 α und NF- κ B
NOX5	Plasmamembran	Expression inflammatorischer Enzyme Proliferation und Migration (VSMC, Endothelzellen) Angiogenese
DUOX1/2	Plasmamembran, ER	Schilddrüsen-Hormonsynthese Migration und Differenzierung (Lungen-Epithelien)

Tabelle 1.1: Isoformen der NADPH-Enzymfamilie, deren subzelluläre Kompartimentierung und wesentliche Funktionen [28, 70–72, 74, 77].
Abk.: ER - endoplasmatisches Retikulum, VSMC - vaskuläre glatte Muskelzellen, Nrf2 - nuclear factor E2-related factor 2, HIF-1 α - hypoxia inducible factor-1 α , NF- κ B - nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells

NOX2 wird in phagozytischen und endothelialen Zellen exprimiert und ist bei der Regulation des Blutdrucks, Entzündungsreaktionen und Zellwachstum involviert [67, 78]. NOX2-generiertes ROS wird hauptsächlich extrazellulär durch Exozytose freigesetzt. Durch die Myeloperoxidase (MPO) wird die Reaktion von H_2O_2 mit Chlorid-Ionen katalysiert und HOCl gebildet. HOCl ist ein effektives antimikrobielles Oxidanz, das während des respiratorischen Bursts von Phagozyten freigesetzt wird [79, 80]. NOX2 wird Proteinkinase C (PKC)-abhängig durch Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) stimuliert, was zu einer schnellen Phosphorylierung von $p47^{phox}$ und dem Zusammenbau und Aktivierung des NOX2-Komplexes führt [81]. Tumornekrosefaktor α (TNF α), Fas-Ligand (FasL) und durch laminaren Scherstress stimulierte Endothelzellen können die Aktivierung von NOX2 und Translokierung von NOX2 und eNOS in *Lipid Rafts* fördern. *Lipid Rafts* sind, ähnlich wie Caveolae, Bereiche der Zellmembran mit einem hohem Vorkommen an Signalmolekülen. Dort kann das NOX2-generierte $O_2^{\bullet-}$ mit dem von eNOS-gebildeten •NO zu ONOO $^-$ reagieren [56, 69].

NOX3 wird im Innenohr, Nervensystem und der Lunge exprimiert. Sie spielt eine Rolle beim Gleichgewichtssinn, bei der Apoptose von Neuronen nach Verletzung und bei der Regulation der Elastizität der Lunge [82, 83]. Zhang et al. beobachteten bei *toll-like receptor 4* (TLR4)-defizienten Mäusen eine verstärkte NOX3-Expression in den Endothelzellen der Lunge, verbunden mit einem $O_2^{\bullet-}$ -Anstieg. Diese Tiere entwickelten im Alter von etwa sechs Monaten ein Lungenemphysem, da TLR4 für die Aufrechterhaltung der Lungenintegrität von Bedeutung ist. Durch Inhibition von NOX3 konnte dieser Phänotyp unterdrückt werden [84].

NOX4 ist konstitutiv aktiv und hauptsächlich im Nukleus und ER lokalisiert. Sie ist bislang die einzige Isoform, die auch in der Mitochondrienmembran nachgewiesen werden konnte [77, 85] und somit in zelluläre Prozesse involviert ist, die mit mitochondrialen oxidativen Stress assoziiert sind [86]. Anders als bei anderen NOX-Isoformen wird nicht $O_2^{\bullet-}$, sondern H_2O_2 freigesetzt [87]. NOX4 ist für die Funktion einer Vielzahl von Zelltypen, u. a. VSMC, Fibroblasten, Osteoklasten, Adipozyten und Neuronen von Bedeutung [77]. NOX4 interagiert mit den Redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren HIF-1 α , Nrf2 und NF- κ B [88–90]. Sie steht funktionell mit Seneszenz, Entzündungsreaktionen, Migration, Hypoxie-induzierter Proliferation, Differenzierung und Apoptose in Beziehung [22, 77, 91, 92].

NOX5 wird im lymphatischen Gewebe, in VSMC und Endothelzellen exprimiert. Im Unterschied zu NOX1 bis 4 wird NOX5 Kalzium (Ca^{2+})-abhängig durch zytosolische Untereinheiten aktiviert. Dabei steigt deren Aktivität mit zunehmender Ca^{2+} -Konzentration [93]. Das durch NOX5 produzierte ROS kann die Expression von inflammatorischen Enzymen über die Aktivierung von NF- κ B verstärken [28, 70].

DUOX1/2 werden vor allem in Lungenepithelzellen und Zilienzellen des respiratorischen Trakts exprimiert. Sie werden wie NOX5 Kalzium-abhängig aktiviert und produzieren aus $O_2^{\bullet-}$ über eine Zwei-Elektronen-Reduktion direkt H_2O_2 . Das durch DUOX1/2 produzierte H_2O_2 oxidiert Jodid während der Hormonsynthese in der Schilddrüse [28, 74].

1.2.2 Mitochondriale ROS-Produktion

Die zentrale Funktion von Mitochondrien ist die ATP-Synthese durch oxidative Phosphorylierung. Dieser Prozess basiert auf dem Elektronentransfer der mitochondrialen Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran, die aus fünf Enzymkomplexen – der NADH-Dehydrogenase (Komplex I), Succinat-Dehydrogenase (Komplex II), Cytochrom-c-Reduktase (Komplex III), Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) sowie der ATP-Synthase (Komplex V) und den Wasserstoff- bzw. Elektronen-übertragenden Ubiquinol und Cytochrom c – besteht (Abb. 1.4) [23, 94].

Im Citrat-Zyklus, der in der Mitochondrienmatrix stattfindet, werden die Reduktionsequivalente NADH (reduzierte Form von NAD^+) und $FADH_2$ (reduzierte Form von FADH) unter Abspaltung von CO_2 und H_2O gewonnen. Über Komplex I werden durch Oxidation von NADH zu NAD^+ Elektronen in die Atmungskette eingeschleust. Die Elektronen werden entlang eines

Redox-Gradienten auf Ubiquinon (Q) übertragen, zum Komplex III und weiter über Cytochrom c zum Komplex IV transportiert, wo O_2 zu H_2O reduziert wird [23]. Die Einspeisung von Elektronen erfolgt außerdem durch $FADH_2$ über Komplex II, die zweite Oxidoreduktase der ETC neben Komplex I. Diese oxidiert Succinat zu Fumarat mit FAD als Oxidanz und reduziert Ubiquinon. Durch Zwei-Elektronen-Reduktion wird Ubiquinol (QH_2) gebildet, welches wiederum an Komplex III bindet. Dort wird durch das Rieske-Eisen-Schwefel-Protein ein Elektron entfernt, wodurch Semiubiquinon (QH^\bullet) entsteht. Die bei der Elektronenübertragung von Enzym- zu Enzymkomplex und schließlich auf O_2 freiwerdende Energie wird nutzbar, indem Protonen von der Mitochondrienmatrix in den Intermembranraum transportiert werden. Durch das gebildete mitochondriale Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) und den Protonengradienten (ΔpH) wird die ATP-Synthase angetrieben, um Energie durch oxidative Phosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP) zu ATP zu generieren [23, 95, 96].

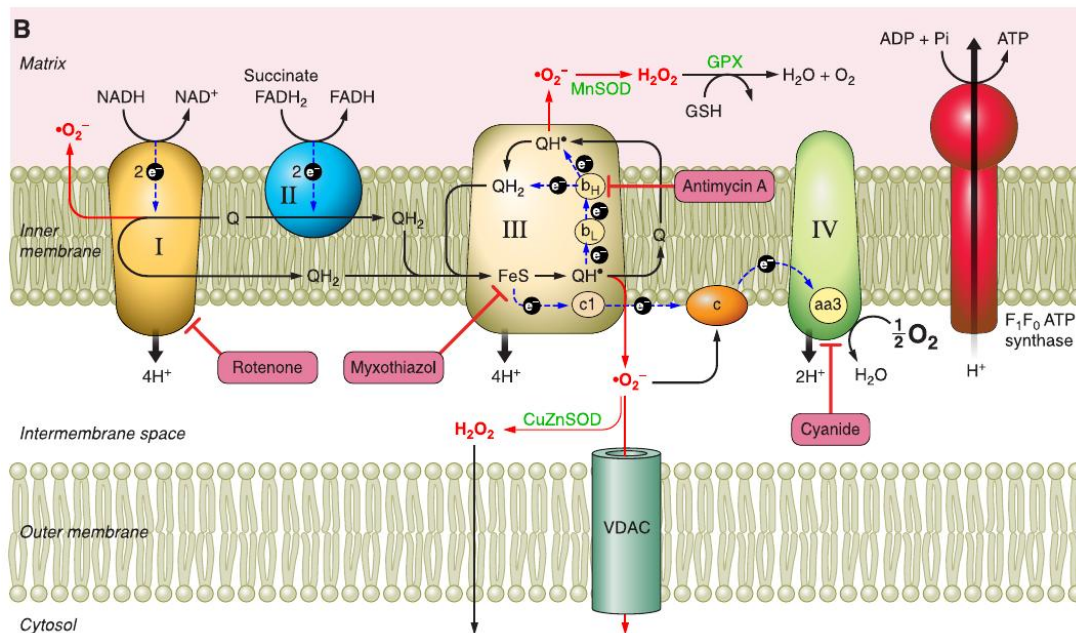


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der mitochondrialen Atmungskette mit den Komplexen I, II, III und IV sowie der ATP-Synthase (Komplex V). In der Mitochondrienmatrix läuft der Citrat-Zyklus ab, der durch die Oxidation von NADH zu NAD^+ bzw. von Succinat zu Fumarat Elektronen in die Atmungskette an Komplex I oder Komplex II einschleust. Die Elektronen werden über Ubiquinon, zum Komplex III und weiter über Cytochrom c zum Komplex IV transportiert, wo sie Sauerstoff zu Wasser reduzieren. Durch die ATP-Synthase erfolgt die oxidative Phosphorylierung von ADP zu ATP. Modifiziert nach Sylvester et al. [23]. Abk.: aa₃ - Hämgruppen a und a₃ des Komplex IV, b - Cytochrom b mit zwei Hämgruppen (b_H, b_L), c - Cytochrom c, FeS - Rieske-Eisen-Schwefel-Protein, Q - Ubiquinon, QH^\bullet - Semiubiquinon, QH_2 - Ubiquinol, VDAC - voltage-dependent anion channel, GPX - Glutathion-Peroxidase, GSH - reduzierte Sulfhydryl-Form von Glutathion, CuZnSOD - zytosolische SOD, MnSOD - mitochondriale SOD, P_i - Phosphat

In Mitochondrien gehen konstitutiv zwischen 1 und 5 % des durch die Atmungskette generierten Elektronenflusses durch die Bildung von $O_2^{\bullet-}$ verloren [4]. In einer Vielzahl an Studien konnte gezeigt werden, dass hauptsächlich Komplex I und III zur mtROS-Produktion beitragen [33, 67, 97–99]. Komplex II und Komplex IV scheinen hingegen nicht wesentlich an der mtROS-Bildung beteiligt zu sein. Allerdings fanden Quinlan et al. 2012 heraus, dass bei Inhibiti-

on von Komplex I und III sowie einer niedrigen Succinat-Konzentration auch durch Komplex II in großen Konzentrationen $O_2^{\bullet-}$ oder H_2O_2 freigesetzt werden kann [100]. Unter physiologischen Bedingungen wird in die Matrix freigesetztes $O_2^{\bullet-}$ durch die mitochondriale SOD schnell zu H_2O_2 dismutiert. Außerdem wird durch Komplex III produziertes $O_2^{\bullet-}$ in den Intermembranraum geschleust. Dort wird es entweder durch die zytosolische SOD zu H_2O_2 dismutiert, durch Cytochrom c rezykliert oder durch Porine (u. a. VDAC) in der äußeren Mitochondrienmembran ins Zytosol transportiert (Abb. 1.4) [63, 97].

Die Enzyme der ETC können spezifisch inhibiert werden. Rotenon und *1-Methyl-4-phenylpyridin* (MPP^+) hemmen Komplex I irreversibel. Beide Substanzen weisen strukturelle Ähnlichkeiten zu Ubiquinon auf, weswegen sie an der Ubiquinon-Bindungsstelle von Komplex I kompetitiv binden und somit den Elektronentransport auf Ubiquinon verhindern können [101, 102]. Die Ubiquinon-Bindungsstelle von Komplex II kann durch Atpenin A5, diejenige von Flavin durch Malonat inhibiert werden. Somit kann das Einschleusen von Elektronen in die ETC über Succinat verhindert werden [100]. Myxothiazol und Antimycin A sind Inhibitoren des Elektronen-Transports von Komplex III. Myxothiazol blockiert den Elektronenfluss vom Häm des Rieske-Eisen-Schwefel-Proteins zum Ubiquinol, während Antimycin A die Reduktion von Cytochrom c zu Cytochrom b blockiert [67, 103, 104]. Komplex IV kann spezifisch durch Cyanid inhibiert werden. Das Cyanid-Ion bindet an die Hämgruppen a und a_3 und blockiert somit den terminalen Schritt des Elektronen-Transfers, der zur ATP-Produktion erforderlich ist [103].

1.2.3 NO-Synthasen als Stickstoffmonoxid- und ROS-Quelle

Bei Säugern sind drei Isoformen der NO-Synthasen bekannt. Dazu werden die endotheliale NO-Synthase (eNOS), die neuronale NO-Synthase (nNOS) und induzierbare NO-Synthase (iNOS) gezählt [48, 49].

Die eNOS und nNOS werden Ca^{2+} -abhängig durch das Ca^{2+} -bindende Protein Calmodulin reguliert. Beide Enzyme werden konstitutiv exprimiert. Im gesunden Gewebe stellt das Endothel und damit die in vaskulären Endothelzellen exprimierte eNOS die dominierende $\bullet NO$ -Quelle dar [105]. Endotheliales $\bullet NO$ verhindert über den Signalweg des zyklischen Guanosinmonophosphats (cGMP) eine Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur und bewirkt somit eine Vasodilatation der Gefäße [46]. Die von Neuronen exprimierte nNOS bildet $\bullet NO$ im Gehirn, wo es als Neurotransmitter fungiert. Außerdem schützt es durch Induktion der HIF-1 α -abhängigen Erythropoietin-Expression die Degeneration von Axonen [106].

Im Gegensatz zu eNOS und nNOS ist die Aktivität der dritten Isoform, der iNOS, im kardiovaskulären System unter physiologischen Bedingungen kaum oder nicht nachweisbar [107]. Die Induktion bzw. Stimulation der iNOS-Expression erfolgt insbesondere über den NF- κ B-Signalweg durch proinflammatorische Zytokine (u. a. $TNF\alpha$, IL-1 β , IL-6, IL-8) und bakterielle Lipopolysaccharide [3, 41, 55]. Während sie in den meisten Geweben vor allem durch proinflam-

matorische Faktoren induziert wird, wird die Isoform in der renalen Medulla konstitutiv exprimiert. Die Funktion der iNOS in den Nieren ist jedoch bislang weitestgehend ungeklärt [108]. Die iNOS-Aktivität ist von Calmodulin und somit auch von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration unabhängig [55]. Charakteristisch ist eine relativ konstante $\bullet\text{NO}$ -Produktion über Stunden bis Tage, wohingegen die endotheliale wie auch die neuronale $\bullet\text{NO}$ -Synthese kurzfristig induziert wird [49, 105].

Eine vierte Isoform konnte bislang nur in Bakterien nachgewiesen werden. Das durch die bakterielle NO-Synthase (bNOS) produzierte $\bullet\text{NO}$ schützt Bakterien vor oxidativen Stress durch Antibiotika und der Immunreaktion des Wirtsorgansimus [109].

1.3 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress wird überwiegend als Beeinträchtigung der Balance zwischen Oxidantien und Antioxidantien zugunsten der Ersteren definiert, der zur Unterbrechung von Signalkaskaden, Verlust der Redox-Kontrolle und letztlich zu oxidativen Schäden führt [110]. Eine zweite, grundlegend gegensätzliche und oft wenig beachtete Seite ist, dass oxidativer Stress für eine Vielzahl physiologischer Prozesse wie dem Redox-*Signalling*, der Regulation der Genexpression und der Immunabwehr essentiell ist [2]. In diesem Fall wird von „oxidativen Eustress“ in Abgrenzung zu „oxidativen Distress“ gesprochen [2, 111]. Zellen, die „oxidativen Distress“ ausgesetzt sind, können ihren Redox-Status temporär oder dauerhaft ändern, um die zelluläre Redox-Homöostase wieder herzustellen. Man spricht hierbei von Adaptation („adaptativer Stress“), die durch Induktion von antioxidativen Schutzmechanismen hervorgerufen wird. Ist jedoch eine Adaptation nicht möglich, kommt es zu ROS-induzierten Zellschäden und Zelltod [2, 112, 113].

1.3.1 DNA-Schäden

Die oxidative Schädigung der DNA kann zur Modifizierung von Purin- und Pyrimidin-Basen und infolgedessen zu Punktmutationen, Strang- und Chromosomenbrüchen führen [29]. Eine schädigende Wirkung ist von der jeweiligen reaktiven Spezies abhängig. $\text{O}_2^{\bullet-}$ und H_2O_2 reagieren relativ schwach mit DNA-Basen. $\bullet\text{OH}$ hingegen kann mit allen vier DNA-Basen eine Vielzahl von Produkten bilden. Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) wiederum greift selektiv Guanin an [114, 115].

Von den DNA-Basen bzw. deren entsprechenden Nukleosiden ist die Purinbase Guanin auf Grund ihres niedrigen Ionisierungspotenzials die instabilste und damit der Hauptangriffspunkt für ROS. Das Endprodukt der Oxidation ist 8-Oxoguanin (8-OxoG), das entsprechende Nukleosid 8-Oxo-2-Deoxyguanosin (8-OxodG) [116, 117]. Wird 8-OxodG nicht entfernt, kommt es zu Fehlpaarungen während der DNA-Replikation. Guanosin paart sich regulär mit Cytosin, Thymidin mit Adenosin. Wenn sich 8-OxodG jedoch fälschlicherweise mit Adenosin paart, wird die Basensequenz der Nukleinsäurenkette in der Folge irreversibel verändert. Durch diesen

Vorgang der Guanin→Thymin-Transversion (G→T-Transversion) kann es zum Funktionsverlust des Gens und infolge dessen zur malignen Entartung der Zelle kommen [115, 118]. Für ROS-induzierte DNA-Schäden ist die mitochondriale DNA (mtDNA) besonders anfällig. In Untersuchungen mit mtDNA wurde sowohl eine erhöhte Mutationsrate als auch eine erhöhte Konzentration von 8-Hydroxy-Deoxyguanosin nachgewiesen [119]. Ursachen dafür sind eine erhöhte Konzentration an mtROS, dem Fehlen von schützenden Histonen und von Introns sowie einer geringeren Reparaturkapazität im Vergleich zu genomischer DNA [120, 121].

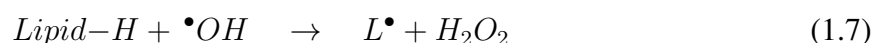
1.3.2 Oxidation von Proteinen

Oxidationen von Proteinen gehen initial mit der Abspaltung eines Wasserstoffatoms entweder aus dem Kohlenwasserstoff-Grundgerüst oder einer Aminosäure-Seitengruppe einher. Das freie Elektron ist dabei meist an einem Kohlenstoffatom lokalisiert. Zwei derartige Radikale können sich anschließend in einer Radikalreaktion zu einem Protein-Protein-Komplex zusammenschließen. Desweiteren kann es zu Inter- und Intraeptidbindungen durch Bildung von Disulfidbrücken bei der Oxidation zweier Cystein-Sulphydryl-Gruppen kommen. Die während der Lipidperoxidation entstehenden radikalischen Aldehyde können Konformationsänderungen von Proteinen hervorrufen und somit zur Modifikation der Proteinaktivität und zu funktionellen Beeinträchtigungen führen [26, 52, 122].

Oxidierter Proteine und Enzyme werden physiologisch über die Proteolyse in den Proteasomen entfernt. Werden Proteasomen unter erhöhtem oxidativen Stress in ihrer Funktion gestört, kann es zu einer Akkumulation oxidierter Proteine und Enzyme kommen, welche die zelluläre Integrität beeinträchtigen können und zur Apoptose bzw. Nekrose führen [123].

1.3.3 Lipidperoxidation

Die Lipidperoxidation wird durch Abspaltung eines Wasserstoffatoms von der Methylengruppe einer membrangebundenen oder freien Fettsäure durch reaktive ROS oder RNS initiiert. In dieser Reaktion entsteht ein Lipidradikal (L^\bullet) (Glg. 1.7). L^\bullet reagiert mit O_2 und bildet ein Lipidperoxyradikal (LOO^\bullet) (Glg. 1.8). Die Kettenreaktion der Lipidperoxidation wird fortgesetzt, indem LOO^\bullet mit einer Fettsäure zu einem Lipidperoxid ($LOOH$) reagiert (Glg. 1.9) [26]. Dabei entsteht wiederum ein L^\bullet , welches den Zyklus erneut starten kann.



Diese Kettenreaktion kann durch Interaktion zweier Radikale, bzw. durch Reaktion der Radikale mit Antioxidantien wie Vitamin E (Glg. 1.15) terminiert werden [124]. Lipidperoxidation führt zur Bildung toxischer Produkte, wie Epoxide, Aldehyde und Ketone. Durch Peroxidation von Linolen-, Arachidon- oder Docosahexaensäuren kann MDA, von Linolen- und Arachidonsäureperoxiden hingegen 4-HNE gebildet werden [30, 125]. Beide Aldehyde können Schäden durch Vernetzungen zwischen Proteinen und DNA verursachen [26]. Außerdem führt die Lipidperoxidation zur Verringerung der Membran-Fluidität, die den Austausch von Phospholipiden zwischen beiden Lipidschichten erleichtert. Desweiteren kann eine erhöhte Permeabilität gegenüber Substanzen, die eine ungeschädigte Lipiddoppelmembran nicht bzw. nur über spezifische Kanäle (K^+ und Ca^{2+} -Kanäle) durchdringen können, die Folge sein. Neben der Proteinschädigung kann durch Lipidperoxidation eine Inaktivierung von Rezeptoren, Enzymen und Ionenkanälen erfolgen [26].

1.4 Das antioxidative System

Zur Aufrechterhaltung der Redox-Homöostase sind Zellen in der Lage, auf eine erhöhte ROS-Produktion mit einer verstärkten Bildung endogener Antioxidantien zu reagieren. Antioxidantien können auf verschiedenen Ebenen in den oxidativen Prozess, z. B. durch Einfangen der initialen reaktiven Spezies und von Peroxylradikalen, der Bindung von Metallionen und Entfernung oxidativ geschädigter Biomoleküle, eingreifen. Dadurch können sie die Oxidation organischer Moleküle verzögern, vor oxidativen Stress schützen oder oxidativen Schaden beseitigen [123, 126]. Das antioxidative System umfasst sowohl endogene, enzymatische Antioxidantien (Abs. 1.4.2) wie auch exogene, vorwiegend mit der Nahrung aufgenommene, niedermolekulare Stoffe (Abs. 1.4.3). Das Antioxidanz mit der höchsten physiologischen Konzentration im Blut ist Harnsäure (Urat) [53, 127, 128]. Die Definition schließt außerdem Proteine wie das Plasmaalbumin, das Chaperon-Reparatursystem und ROS-Inhibitoren ein [123].

1.4.1 Nrf2-induzierte antioxidative Mechanismen

Nrf2 ist ein Redox-sensitiver Transkriptionsfaktor und wichtiger Regulator des antioxidativen und zytoprotektiven Systems. Er interagiert mit dem *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1), einem Cystein-reichen Protein, dass unter konstitutiven Bedingungen die Ubiquinierung von Nrf2 und dessen anschließenden Abbau im Proteasom (Abb. 1.5) vermittelt. Die Cysteinreste des Keap1 reagieren empfindlich auf Änderungen des Redox-Status der Zelle [5, 129]. Bei Exposition gegenüber externen, toxischen Einflüssen, UV- und ionisierender Strahlung wie auch intrinsischen Stress, durch zelluläres ROS, proinflammatorische Zytokine und Elektrophile werden die Cystein-Sulfhydrylgruppen von Keap1 oxidiert. Es ist dann nicht mehr in der Lage die Degradation von Nrf2 effektiv zu fördern. Der Transkriptionsfaktor wird stabilisiert, trans-

loziert in den Kern und aktiviert die Transkription eines breiten Spektrums antioxidativer und zytoprotektiver Gene, die ein *antioxidant response element* (ARE) in ihrem Promotor enthalten (Abb. 1.5) [5, 129].

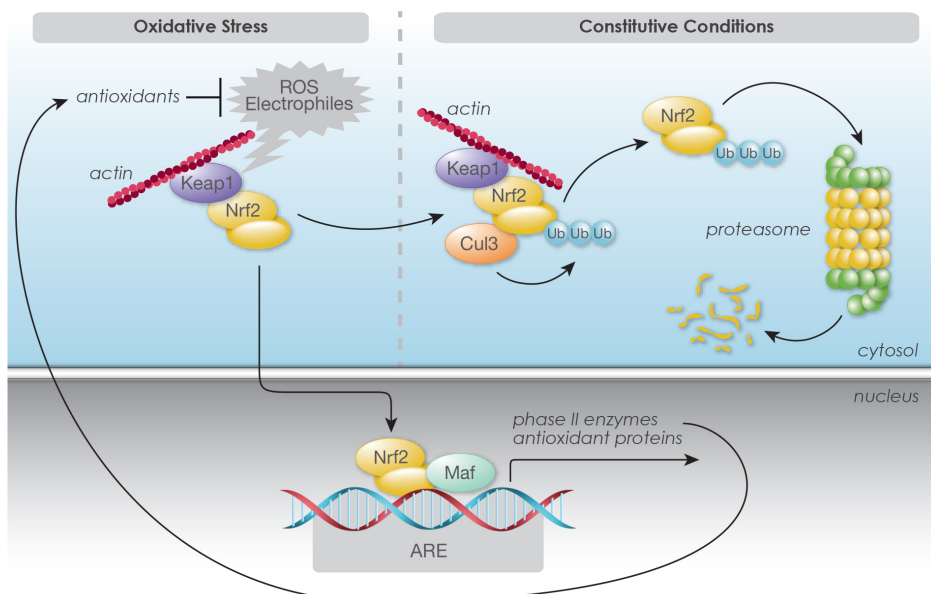


Abbildung 1.5: Nrf2-Signalweg. Nrf2 ist ein Transkriptionsfaktor, der über den Cul3 mit Keap1, einem Cystein-reichen Protein, interagiert. Unter konstitutiven Bedingungen vermittelt Keap1 die Ubiquitinierung von Nrf2 und dessen anschließenden Abbau im Proteasom. Die Cysteinreste des Keap1 agieren als Sensoren, die empfindlich auf die Änderung des Redox-Status der Zelle reagieren. Unter oxidativem und elektrophilem Stress kann Keap1 die Nrf2-Degradierung nicht mehr effektiv fördern. Nrf2 wird stabilisiert, transloziert in den Zellkern und bindet an ARE via Heterodimerisierung mit einem Maf-Protein [130]. Dies führt zur Aktivierung oder verstärkten Expression von antioxidativen und Phase II Enzymen [129]. Elektrophile sind Moleküle, die ein oder zwei Elektronen von einem Nukleophilen (z. B. Aromat, Amin, Alkohol) übernehmen. Dabei wird ein an den nukleophilen Reaktionspartner gebundenes Wasserstoffatom durch das Elektrophil ersetzt. Oxidantien hingegen übernehmen von einem Reduktant ein oder zwei Elektronen, ohne jedoch ein neues Addukt zu bilden [131]. Modifiziert nach May (Cayman Chemical) [129]. Abk.: Cul3 - Cullin 3 protein, Keap1 - Kelch-like ECH-associated protein 1, Nrf2 - nuclear factor E2-related factor 2, ARE - antioxidant response element, Maf - kleines Maf Protein, Ub - Ubiquitin

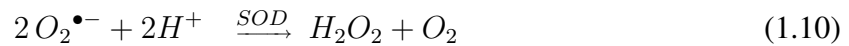
Zu den durch Nrf2 regulierten Genen zählen endogene Antioxidantien und Phase II Enzyme [6, 20, 132]. Die Phase II Abwehr umfasst zytoprotektive Proteine, welche die Biotransformation von Xenobiotika (z. B. Chemotherapeutika) und deren toxischer Metabolite fördern und zur Entfernung aus dem Organismus führen. Dazu zählen u. a. GPX, Glutathion-Reduktase (GR), Glutathion-S-Transferasen (GST), NADPH-Quinon-Oxidoreductase-1 (NQO1), NRH-Quinon-Oxidoreductase-2 (NQO2), Hämoxigenase 1 (HO-1), Thioredoxin (Trx) aber auch Metallothione und Ferritin. Darüber hinaus wird durch Nrf2 die Expression von entzündungshemmenden Enzymen und Reparaturproteinen aktiviert [5, 129, 133].

1.4.2 Endogene Antioxidantien

Superoxid-Dismutasen

Superoxid-Dismutasen (SOD) sind Metalloenzyme und werden nach dem Metallanteil im katalytischen Zentrum in Kupfer/Zink- (Cu/ZnSOD oder SOD1), Mangan- (MnSOD oder SOD2)

und Eisen- (FeSOD) Superoxid-Dismutasen unterteilt [134, 135]. FeSOD und MnSOD sind nahe miteinander verwandt. Im Gegensatz zu Cu/ZnSOD zeigen sie eine hohe Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz und Strukturhomologien [136]. Superoxid-Dismutasen dismutieren $O_2^{\bullet-}$ zu H_2O_2 und O_2 (Glg. 1.10). Diese Reaktion läuft sehr schnell ab ($k_{SOD} \approx 6,4 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$), sodass intrazellulär gebildetes $O_2^{\bullet-}$ bereits am Ort des Entstehens abgefangen werden kann [137].



Die Cu/ZnSOD besitzt zwei Proteinuntereinheiten mit je einem Metallion als Zentrum: Ein Cu-Ion als eigentliches katalytisches Zentrum und ein Zn-Ion zur Stabilität des Moleküls. Es ist ein für Hitze und Proteasen relativ unempfindliches Molekül [138] und hauptsächlich im Zytoplasma von eukaryotischen Zellen, aber auch in Lysosomen, Peroxisomen, Chloroplasten und im mitochondrialen Intermembranraum lokalisiert [16, 139, 140]. Cu/ZnSODs sind durch Cyanid hemmbar [32, 141].

Die MnSOD wurde in Mitochondrien und im Zytoplasma von Prokaryonten nachgewiesen. Das Enzym ist das wichtigste Antioxidanz zur Reduktion von $O_2^{\bullet-}$ in der mitochondrialen Matrix [16]. Die MnSOD ist relativ instabil gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen und kann durch $ONOO^-$ und $\bullet NO$ inhibiert werden [141]. Eine eisenhaltige FeSOD wird in Prokaryoten und Chloroplasten vorgefunden [32].

Katalasen

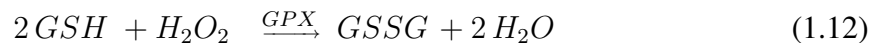
Katalasen (Cat) sind hämhaltige Enzyme, welche die Umsetzung von H_2O_2 zu O_2 und H_2O katalysieren (Glg. 1.11). Sie sind vor allem in den Peroxisomen und Glyoxisomen lokalisiert, wo eine Reihe von H_2O_2 -generierenden Enzymreaktionen stattfinden. Im Zytosol, im ER und in den Mitochondrien sind die Cat-Aktivitäten deutlich geringer [139].



Die Enzymaktivität ist über einen weiten Bereich linear zu der lokalen H_2O_2 -Konzentration, wodurch eine kontrollierte H_2O_2 -Konzentration der Zelle erhalten bleibt [139]. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Degradierung von H_2O_2 ist sehr hoch und wird letztlich durch Diffusion von H_2O_2 an das katalytische Zentrum begrenzt ($k_{Cat} \approx 1,7 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$) [139]. Aminotriazol ist ein irreversibler Inhibitor der Katalase [142].

Glutathion

Glutathion ist ein Tripeptid-Thiol (γ -L-Glutamyl-L-Cysteinyl-Glycin) mit antioxidativer Wirkung. Aufgrund der hohen intrazellulären Konzentrationen (0,5 - 10 mmol/L) zählt es zu den wichtigsten nichtenzymatischen, endogenen Antioxidantien [143, 144]. Innerhalb der Zellen existiert es in zwei verschiedenen Formen; der reduzierten Sulfhydryl-Form (GSH) und als Glutathion-Disulfid (GSSG), der oxidierten Form. Unter physiologischen Bedingungen liegen ca. 90 % des Glutathion in reduzierter Form vor. Oxidativer Stress führt zur Verschiebung des zellulären Thiol-Gleichgewichts. Es kommt zur Akkumulation von GSSG und folglich zu einem Abfall der GSH/ GSSG Ratio. Der GSH/ GSSG-Status gilt als Marker für intrazellulären oxidativen Stress [143, 145]. GSH kann in einer nichtenzymatischen Reaktion direkt mit freien Radikalen wie $O_2^{\bullet-}$, $\bullet NO$, $\bullet OH$ und LOO^{\bullet} reagieren. Das Antioxidanz dient jedoch hauptsächlich als Elektronendonator bei der Reduktion von Peroxiden durch Glutathion-Peroxidasen (GPX) [131, 144, 146].



In der durch GPX katalysierten Reaktion wird nach Oxidation eine Disulfidbrücke zwischen zwei Tripeptiden gebildet und H_2O_2 zu H_2O (Glg. 1.12) bzw. $ONOO^-$ zu NO_2^- und H_2O reduziert [115]. GSH wird intrazellulär durch die Reduktion von GSSG regeneriert (Glg. 1.14). Diese Reaktion wird durch die Glutathion-Reduktase (GR) katalysiert, die den Transfer von Elektronen von NADPH auf GSSG vermittelt [131, 143].

1.4.3 Exogene Antioxidantien

Exogene Antioxidantien sind niedermolekulare Substanzen, die hauptsächlich mit der Nahrung aufgenommen werden. Zu den bedeutendsten gehören Vitamin C, Vitamin E und β -Caroten (Vorstufe von Vitamin A) sowie sekundäre Pflanzenstoffe wie Carotenoide (β -Carotin, Lycopin, Lutein) und Polyphenole (einschließlich der Flavonole, Isoflavonoide und Catechine) [126, 147, 148]. Sie schützen vor oxidativer, stressinduzierter Zellschädigung, indem sie ein Elektron an das Radikal abgeben und es dadurch neutralisieren [149].

Vitamin E

Vitamin E [α -*Tocopherol* (Toc)] ist das wichtigste lipidlösliche Antioxidanz in zellulären Membranen, im sarkoplasmatischen Retikulum (SR) und Blutplasma. Es kann durch höhere Pflanzen und Cyanobakterien, aber nicht durch tierische Organismen synthetisiert werden. Deswegen muss Toc mit der Nahrung aufgenommen werden und gehört somit zu den essentiellen Vitaminen.

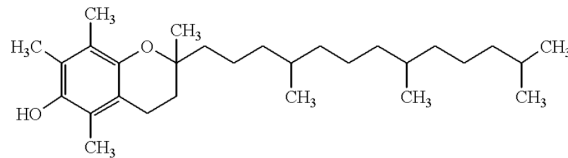
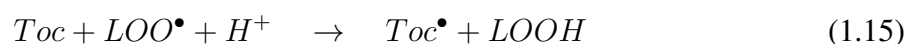


Abbildung 1.6: Chemische Struktur von α -Tocopherol. Als biologisch aktivstes Vitamin E Derivat kann α -Tocopherol aufgrund der phenolischen Hydroxygruppe am aromatischen Chromatring mit dem Lipidperoxylradikal (LOO^\bullet), Superoxid ($O_2^{\bullet-}$) und dem Hydroxylradikal ($^\bullet OH$) reagieren und somit zu einem Kettenabbruch der Lipidperoxidation führen [124, 150]. Es wirkt als Radikalfänger, indem es selbst zu reaktionsträgen, mesomeriestabilisierten Tocopheryl-Radikalen (Toc^\bullet) reagiert (Glg. 1.15).

Toc ist ein potenter Radikalfänger, da es aufgrund der phenolischen Hydroxygruppe am aromatischen Chromatring (Abb. 1.6) besonders mit LOO^\bullet zu korrespondierenden $LOOH$ und Tocopheryl-Radikalen (Toc^\bullet) reagiert (Glg. 1.15) [150–152]. Dadurch kann Toc die Kettenreaktion der Lipidperoxidation terminieren (Glg. 1.7 bis 1.9) und die oxidative Schädigung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren [*polyunsaturated fatty acids* (PUFA)] in Membranlipiden und Lipoproteinen verhindern [124, 150, 153]. Darüber hinaus wirkt Toc in seiner Eigenschaft als Wasserstoffdonator als Radikalfänger von $O_2^{\bullet-}$ und $^\bullet OH$. Gegenüber nichtradikalischen Oxidantien ist es kein effektiv wirksames Antioxidanz [153].



Toc^\bullet ist ein mesomeriestabilisiertes Radikal und unter normalen Bedingungen nicht reaktiv genug, um selbst die Lipidperoxidation zu initiieren oder zu verstärken [124]. In der Reaktion von Toc^\bullet mit Vitamin C wird Toc wiederhergestellt; es entsteht ein Ascorbylradikal (Asc^\bullet) (Glg. 1.16) [154]. Wird Toc^\bullet , aufgrund unzureichender Mengen effektiver Co-Antioxidantien wie Vitamin C, nicht vollständig reduziert, kann es selbst pro-oxidativ wirken [149, 152, 155]. Pro-Oxidantien können den Nrf2-Signalweg aktivieren und somit zur einer erhöhten Genexpression endogener Antioxidantien und zytoprotektiver Enzyme führen. Toc^\bullet aber auch Asc^\bullet gelten als starke Nrf2-Aktivatoren [5, 156]. Akkumulieren diese Radikale können sie jedoch selbst zu oxidativen Schäden führen [156, 157].

Vitamin C

Vitamin C [Ascorbinsäure (Asc)] ist, im Gegensatz zu Vitamin E, ein wasserlösliches Antioxidanz und vor allem im Zytoplasma vorzufinden. Unter physiologischen Bedingungen ist es an einer Vielzahl von Hydroxylierungen als Reduktionspartner und Elektronendonator z. B. im Rahmen der Biosynthese von Kollagen, Carnithin, Katecholaminen und Peptidneurohormonen beteiligt. Durch antioxidative Reaktionen oder innerhalb der Biosynthese kann Asc zu dem Intermediat Asc[•] und weiter zur Dehydro-Ascorbinsäure oxidiert und durch die Dehydro-Ascorbat-Dehydrogenase in Asc rezykliert werden [158].

Da das Asc[•] ein relativ stabiles Radikal ist, wird es in der Analytik als Markersubstanz für das Monitoring von oxidativem Stress in biologischen Systemen verwendet [159, 160]. Zum Beispiel konnte M. Karrer mittels ESR-Spektroskopie nachweisen, dass im Alkohol-Trinkversuch das zeitliche Profil der Blutalkoholkonzentration synchron zur Konzentration der im Blut gemessenen Asc[•] verläuft [161]. Neben dem Recycling von Vitamin E (Glg. 1.16) wirkt Asc der Alkylierung von Proteinen durch Lipidperoxidation entgegen, hemmt die Aktivierung von NADPH-Oxidasen und die Induktion der iNOS [162]. Vitamin C kann jedoch durch Reduktion von Fe³⁺ zu Fe²⁺ oder durch Akkumulation von Asc[•] in Abwesenheit von Co-Antioxidantien wie Vitamin E pro-oxidativ wirken [163, 164].

1.5 O₂-Sensing und ROS im respiratorischen System

Bei der aeroben Respiration dient O₂ als terminaler Elektronenakzeptor am Ende einer Serie von Redox-Reaktionen, welche die mitochondriale ATP-Synthase antreiben und letztlich zur oxidativen Phosphorylierung von ADP zum energiereicheren ATP führen (Abs. 1.2.2).

Luftatmende, im Tiefland lebende Tiere sind optimal an einen pO₂ von ≈ 21 kPa angepasst. Der zelluläre O₂-Verbrauch ist jedoch an die Diffusion von O₂ in das Gewebe gekoppelt. Die regionale Verteilung des pO₂ folgt demnach einem Konzentrationsgradienten von den oberen Luftwegen (≈ 21 kPa) bis zum Zytosol (1 - 2 kPa) [165, 166]. Darüber hinaus ist der arterielle pO₂ bei adulten Säugern (≈ 13 kPa) mehr als doppelt so hoch wie der pO₂ von Föten (≈ 5 kPa) [99]. Hypoxie ist somit ein relativer Begriff. Jeremy Ward (2008) definiert ihn als einen Umstand, unter welchem entweder durch eine verminderte O₂-Zufuhr oder einen erhöhten O₂-Verbrauch die normale Funktion des Gewebes beeinträchtigt wird [99]. Respiratorische und kardiovaskuläre Erkrankungen sind gemeinhin mit Hypoxaemie und Hypoxie im Gewebe assoziiert, welche auch bei Gesunden z. B. in großer Höhe auftreten kann [167–170]. Die Fähigkeit, sich an Veränderungen der O₂-Verfügbarkeit zu adaptieren, erlaubt es dem Körper, eine adäquate O₂-Zufuhr zum jeweiligen Zielgewebe aufrechtzuerhalten.

1.5.1 Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV)

Von Euler und Liljestrand beschrieben bereits 1946, dass eine akute Hypoxie zur Vasokonstriktion pulmonaler Gefäße führt. Sie fanden bei Untersuchungen des pulmonal-arteriellen Kreislaufes von Katzen heraus, dass in Ventilationsphasen mit geringer O₂-Konzentration (10 %) der pulmonal-arterielle Druck [*pulmonal arterial pressure* (PAP)] ansteigt. Der Anstieg des PAP war reversibel und kehrte in Raumluft-Ventilationsphasen wieder auf den Ausgangswert zurück. Weitergehende Untersuchungen zeigten, dass der Druckanstieg auf die Kontraktion der kleinen Pulmonalarterien (PA) zurückzuführen war. Von Euler und Liljestrand stellten die Hypothese auf, dass die pulmonale Vasokonstriktion die Antwort auf eine Hypoxie und Teil eines Selbstregulationsmechanismus sei, der den pulmonalen kapillären Blutfluss an die alveoläre Ventilation anpasst [171].

Nach heutigem Kenntnisstand führt eine akute und prolongierte alveoläre Hypoxie der gesamten oder von Teilen einer Lunge zu einer lokalisierten Vasokonstriktion der kleinen präkapillaren Pulmonalarterien [23, 172]. Dieses Phänomen wird hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV) oder von Euler-Liljestrand-Mechanismus genannt. Im Effekt führt die HPV zur Umleitung des Blutflusses weg von unzureichend ventilierten Lungenabschnitten hin zu denjenigen Bereichen mit höherem pO₂. Es wird vermutet, dass die HPV zu etwa zwei Dritteln vom alveolären pO₂ und zu einem Drittel vom gemischtvenösen pO₂ abhängig ist und damit eine Verminderung der venösen Beimischung über die Anpassung der lokalen Perfusion an die lokale Ventilation bewirkt [23], wodurch in der Konsequenz der systemische pO₂ angehoben wird. Klinische Relevanz hat die HPV insbesondere in der Entstehung der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie (PH) und der Rechtsherz-Insuffizienz infolge der unphysiologischen Druckbelastung des rechten Herzens (*Cor pulmonale*) bei Patienten mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) oder der obstruktiven Schlafapnoe [167–169, 173].

Die HPV ist ein hochkonservierter Mechanismus und bei nahezu allen Säugetieren als auch bei diversen Reptilien nachweisbar [23, 172, 174]. Bei Knochenfischen wie der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) oder dem Kabeljau (*Gadus morhua*) verengen sich unter Hypoxie entsprechend die Kiemengefäße während sich die systemischen Gefäße ebenso wie bei Säugern weiten. Aus bisher unbekanntem Grund verhält es sich bei rezenten Formen der fossilen Cyclostomata (Rundmäuler), den kiementragenden, fischähnlichen Neunaugen (*Petromyzon sp.*) und den Schleimaalen (*Eptatretus sp.*) genau umgekehrt: Unter Hypoxie kontrahieren sich hier die systemischen Gefäße während sich die Vorkiemengefäße erweitern [175]. Ein deutlicher Anstieg des pulmonal-arteriellen Druckes als Reaktion auf hypoxische Umgebungsbedingungen konnte außerdem bei der am Boden lebenden Pekingente (*Anas platyrhynchos*), nicht jedoch bei der Streifengans (*Anser indicus*), einem Zugvogel, der in Höhen von bis zu 9 000 m fliegt, gemessen werden [176]. Burton et al. (1968) zeigten, dass auch Küken des Haushuhns (*Gallus gallus domesticus*) sehr empfindlich auf Hypoxie reagieren und bei generalisierter chronischer

Hypoxie während eines Langzeitaufenthalts in großen Höhen (>3 800 m) eine pulmonal-arterielle Hypertonie entwickeln [177].

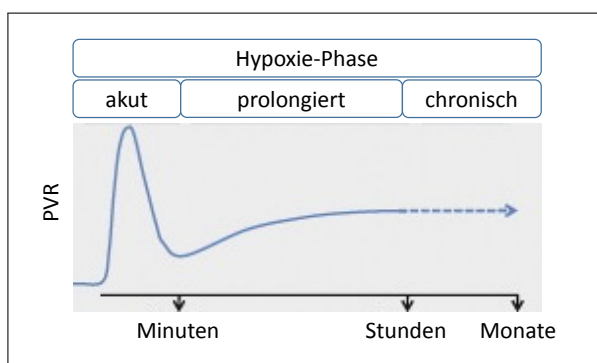


Abbildung 1.7: Einfluss der Hypoxie auf die Konstriktion der pulmonalen Widerstandsgefäße. Die Reaktion der pulmonalen Arteriolen auf Hypoxie verläuft biphasisch. In der ersten, akuten Phase kommt es innerhalb von Sekunden zu einer starken Vasokonstriktion und folglich auch zu einer Erhöhung des pulmonal-vaskulären Strömungswiderstandes (PVR) sowie zu einem Anstieg des pulmonal-arteriellen Druckes (PAP). Nach weiteren 5 bis 15 Minuten flacht die Kurve wieder ab. Bei anhaltender Hypoxie folgt als zweite, die prolongierte Phase, die durch eine erneute Vasokonstriktion gekennzeichnet ist. Die prolongierte alveoläre Hypoxie kann sich bereits nach wenigen Stunden bis Tagen zur chronisch-hypoxischen Phase verfestigen, die im weiteren Verlauf zur Hypoxie-induzierten pulmonale Hypertonie (PH) führen kann (gestrichelte Linie). Modifiziert nach Ward und McMurty [178]. Abk.: PAP - pulmonal arterial pressure, PVR - pulmonary vascular resistance

Die HPV verläuft biphasisch, wobei zwischen einer akuten Phase (Phase 1) und einer prolongierten Phase (Phase 2) unterschieden wird (Abb. 1.7). Während der akuten Phase, d. h. einem Auftreten der alveolären Hypoxie innerhalb von Sekunden, kommt es zu einer starken Vasokonstriktion und folglich zu einer Erhöhung des pulmonal-vaskulären Strömungswiderstandes [*pulmonary vascular resistance* (PVR)] und als Funktion der Widerstandserhöhung auch zu einem Anstieg des PAP. Die akute Phase erreicht innerhalb weniger Minuten nach Hypoxieeintritt ihr Maximum und klingt dann rasch wieder ab. Bei fortbestehender Hypoxie von mehreren Minuten bis Stunden folgt die prolongierte Phase. Sie ist durch einen erneuten Anstieg der Vasokonstriktion gekennzeichnet [23, 172, 178, 179].

Die prolongierte alveoläre Hypoxie verfestigt sich nach wenigen Stunden bis Tagen zur chronisch-hypoxischen Phase [23, 178].

Die durch den von Euler-Liljestrand-Mechanismus bewirkte Anpassung der Perfusion an die lokalen Ventilationsverhältnisse wird bei Vorliegen einer generalisierten alveolären Hypoxie fehlgeleitet, da unter diesen Bedingungen die Vasokonstriktion in der gesamten Lunge stattfindet. Hält die generalisierte Hypoxie über Wochen oder Monate an, werden Umbauprozesse in den Gefäßwänden angestoßen. Dieser als vaskuläres *Remodelling* der kleinen PA bezeichnete Prozess umfasst die Proliferation der glatten Muskelzellen der Media und die Einwanderung von Fibroblasten aus der Adventitia in die Media, was zu einer Mediaverdickung führt. Zusätzlich findet eine *de-novo*-Muskularisierung kleiner, unter Normoxie nicht muskularisierter Gefäße statt. Diese chronische Verengung der Lungengefäße bewirkt eine Erhöhung des PVR und damit sowohl eine Reduktion des Herzzeitvolumens als auch einen chronischen Anstieg des PAP. Über die damit verbundene Rechtsbelastung kann dies zu einer Hypertrophie des rechten Ventrikels und im weiteren Verlauf zur Hypoxie-induzierten PH führen [180–182].

1.5.2 O₂-Sensoren und Mediatoren einer HPV

Als zugrundeliegende Mechanismen werden zum einen der direkte Einfluss der Hypoxie auf die glatten pulmonalen Gefäßmuskelzellen, der mit der Proliferation von Fibroblasten, Hemmung des endothelialen Zellwachstums und Stimulation des pulmonal-arteriellen Zellwachstums einhergeht und zum anderen eine hypoxisch bedingte Freisetzung vasoaktiver Mediatoren als ursächlich diskutiert [183–186].

Pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen [*pulmonary arterial smooth muscle cells* (PASMC)] der kleinen PA wurden als der Zelltyp identifiziert [187], der hauptsächlich zur HPV beiträgt, da diese sensibel auf eine Änderung des pO₂ ansprechen. Sie reagieren bei akuter Hypoxie (pO₂ 25 bis 50 mmHg) mit Kontraktion, wohingegen arterielle glatte Muskelzellen (SMC) anderer Organe unter Hypoxie dilatieren [187–189]. Letztere verhalten sich somit ähnlich wie die SMC des *Ductus arteriosus*, welche unter normoxischen Bedingungen den fötalen Umgehungskreislauf der Lunge schließen [170, 190]. Da isolierte PASMC unter akuter Hypoxie ebenfalls mit Kontraktion und einem Anstieg des intrazellulären Ca²⁺-Levels reagieren, gilt dieser Zelltyp im Kontext einer akuten Hypoxie sowohl als Sensor- als auch Effektorzelltyp [188, 191]. Als mögliche O₂-Sensoren werden darüber hinaus zelluläre ROS- und RNS-Quellen, darunter nicht-phagozytische NADPH-Oxidasen (Abs. 1.2.1) und Mitochondrien (Abs. 1.2.2), aber auch NO-Synthasen (Abs. 1.2.3) diskutiert [179, 192–199].

Die Rolle des pulmonalen Endotheliums bei der HPV ist nicht vollständig verstanden. Endotheliale Mediatoren sind offensichtlich nicht während der akuten, jedoch der prolongierten Phase involviert [200]. Endothelzellen produzieren vasoaktive Substanzen, welche die darunter liegende Gefäßmuskulatur beeinflussen. Der Tonus verändert sich sowohl durch vasodilatierende Substanzen wie dem *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF), •NO, Prostacyclin und Prostaglandin I₂ als auch durch vasokonstriktorisches wirkende Substanzen wie Serotonin und Endothelin-1 [23, 44, 173, 186]. Unter Hypoxie tritt ein Ungleichgewicht zwischen verschiedenen Wachstumsfaktoren und vasoaktiven Substanzen auf, die den Tonus und das Zellwachstum beeinflussen. Die Produktion und/oder Freisetzung vasodilatativer Mediatoren wird zu Gunsten vasokonstriktiver Mediatoren verschoben [201].

1.6 Zielstellung

Die vorliegende Dissertation ist in zwei Hauptteile gegliedert, denen jeweils eine Einführung vorangestellt ist, welche auf das zentrale Thema des jeweiligen Kapitels fokussiert.

Der erste Teil (Kapitel 3) umfasst die Etablierung der ESR-Spektroskopie zum Nachweis der ROS- und RNS-Bildung durch murine pulmonal-arterielle Zellen und humaner Leukozyten in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit (BALF). Dem vorangestellt wird die Charakterisierung von *Spin probes* und *Spin traps* unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses der Umgebungsbedingungen (O_2 -Konzentration, Temperatur, pH-Wert).

Darauf aufbauend werden zur Aufklärung möglicher (patho-)physiologischer Mechanismen einer HPV die Auswirkungen von Hypoxie-induziertem oxidativen Stress auf murine pulmonale Zellen unter Variation der Dauer und Intensität der Hypoxieexposition untersucht. Der Fokus liegt hierbei auf pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen, da diese als Effektor- und Sensorzelltyp einer HPV gelten. Es herrscht zwar weitestgehend ein Konsens darüber, dass ROS/RNS als Signalmoleküle (*second messenger*) eine bedeutende Rolle bei einer zellulären Antwort auf Hypoxie zukommt, jedoch besteht bislang keine einheitliche Meinung darüber, ob eine vermehrte oder verminderte Freisetzung von reaktiven Spezies zur Induktion einer HPV führt. Unter der Annahme, dass Zellen in der Lage sind, auf eine erhöhte ROS-Produktion mit einer verstärkten Bildung endogener Antioxidantien zu reagieren und somit die Redox-Homöostase aufrechtzuerhalten, werden des Weiteren mögliche Auswirkungen von oxidativen Stress auf die Expression Nrf2-regulierter, endogener Antioxidantien aber auch der Einfluss von Vitamin E untersucht.

Um physiologische Reaktionen am intakten Organ nachvollziehen zu können, wird am Ende des ersten Teils ein Pilotexperiment zur Etablierung einer ESR-Umgebung für eine isolierte, ventilerte und blutfrei-perfundierte Lunge vorgestellt. Ziel ist hier, anhand von über die gesamte Versuchsdauer kontinuierlich und hochaufgelöst gemessener Zeitreihen den von der Beatmungsphase abhängigen Perfusionsdruck mit den ROS-Transienten im ESR-Signal in Beziehung zu setzen.

Das Ziel der klinischen Studie im zweiten Teil (Kapitel 4) ist, einen möglichen Zusammenhang zwischen einer histopathologisch bestimmten akuten Abstoßungsreaktion des Lungentransplantats und der mittels ESR-Spektroskopie detektierten $O_2^{\bullet-}$ -Konzentration in der BALF von lungentransplantierten Patienten zu untersuchen. Aufgrund der Variabilität der Klassifikation der Biopsien sowie der großen Heterogenität der Studienpopulation wird nicht allein auf die $O_2^{\bullet-}$ -Konzentration als potentieller diagnostischer Marker fokussiert, sondern auch Routinelabor-Parameter wie die Zusammensetzung der Leukozytenpopulationen, Kontamination der Probe durch Blut oder auch der Hämosiderin-Score betrachtet.

Kapitel 2

Methoden

2.1 Zellbiologische Methoden

In der vorliegenden Dissertation wurden pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen [*murine pulmonary arterial smooth muscle cells* (mPASMIC)] von männlichen C57BL/6J Wildtyp (WT)-Mäusen, murine Lungenfibroblasten (MLF) von WT und Nrf2-KO Tieren, *C57BL/lcrf-a^t mouse lung carcinoma metastasis* (CMT)-Zellen sowie humane BALF-Leukozyten untersucht. Das Ethikvotum der Ethikkommission Gießen (Abs. 4.3) sowie die Tierversuchsgenehmigungen des Regierungspräsidiums Gießen (Abs. 2.1.2) liegen vor.

2.1.1 Zellkultur

Kultivierung von murinen pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen

Die Isolation von mPASMIC erfolgte durch die technischen Assistentinnen Carmen Homberger und Elisabeth Kappes wie bei Waypa et al. (2011) beschrieben und von Malczyk (2017) modifiziert [196, 202]. Die isolierten Gefäßstücke wurden in SMC-Medium I aufgenommen und auf Zellkulturschalen ausgesät (Aussaat 1, Passage 0). Innerhalb von fünf bis zehn Tagen wuchsen mPASMIC aus den isolierten Gefäßstücken. Für eine weitere Aussaat wurden die Gefäßstücke von der Kulturschale abgenommen, in *Dulbecco's phosphate-buffered saline* (DPBS) gewaschen und auf eine neue Kulturschale in frisches SMC-Medium übertragen (Aussaat 2, Passage 0). Nach weiteren drei bis fünf Tagen erfolgte eine dritte Aussaat (Aussaat 3, Passage 0). Die Aussaaten 1 bis 3 wurden maximal 18 Tage nach der Isolation mit 1-fach Trypsin von den Platten gelöst, bei 338 g (1200 rpm) für 5 min zentrifugiert und die Zellzahl in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Es wurden 5×10^3 bis 1×10^4 pro cm^2 auf die Kulturschalen ausgesät (Passage 1) [202]. Je nach Fragestellung wurde bei einer Konfluenz 70 bis 90 % das Prozedere von der Trypsinierung bis zur Aussaat in neue Zellkulturschalen wiederholt, um Zellen der Passagen 2 und 3 zu kultivieren. Die Kultivierung erfolgte, wenn nicht anders beschrieben,

im Brutschrank bei 21 % O₂, 5 % CO₂, Rest N₂ und 37 °C in befeuchteter Atmosphäre. Die Kultivierungsdauer und der pO₂ konnten je nach Fragestellung variiert werden.

Kultivierung von murinen Lungenfibroblasten

Die durch den Kooperationspartner Prof. Harald von Melchner, Abteilung für Molekulare Hämatologie des Universitätsklinikums der Goethe-Universität Frankfurt/Main zur Verfügung gestellten MLF von WT und Nrf2-KO Mäusen wurden durch dessen Mitarbeiter wie von Itoh et al. [203] beschrieben von vier Monate alten Mäusen isoliert und nach dem von Zalvide et al. [204] etablierten Protokoll durch Transformation mit dem *Simian Virus 40 large T Antigen* immortalisiert [205, 206]. Die MLF wurden in *Dulbecco's modified Eagle's Medium* (DMEM) unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FKS), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (1 % Pen/Strep) kultiviert. Da der Vektor für die Immortisierung ein *Doxycyclin-driven SV40-Large T antigen* enthält, wurde dem Medium außerdem 1:1000 Doxycyclin Hydrochlorid zugegeben. Die MLF wurden bei 21 % O₂, 5 % CO₂, Rest N₂ und 37 °C in T75 Zellkulturflaschen kultiviert.

Kultivierung murinen Lungenkarzinom-Epithelzellen (CMT167-Zelllinie)

Bei den verwendeten Lungenkarzinom-Epithelzellen handelt es sich um Zellen der CMT167-Zelllinie, die ursprünglich aus C57BL/1CRF-Mäusen isoliert wurden. Die Zellen wurden in Waymouth's Medium mit 2 mM Glutamin, 10 % FKS und 1 % Pen/Strep bei 21 % O₂, 5 % CO₂, 74 % N₂ und 37 °C in T75 Zellkulturflaschen kultiviert.

Passagieren von Zellen

Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen mit DPBS gewaschen. Nach Entfernen des DPBS wurden die Zellen mit ≈2 ml 1-fach Trypsin für 1 - 5 min bei 37 °C inkubiert. Nachdem diese sich von der Oberfläche der Platten abgelöst haben, wurde die Reaktion des Trypsins durch Zugabe von ≈8 ml Kulturmedium abgestoppt und bei 338 g (1200 rpm) für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen in frisches Kulturmedium aufgenommen und in eine neue Zellkulturschale bzw. -flasche übertragen.

Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer (Hämozytometer)

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte lichtmikroskopisch mittels Neubauer Zählkammer. Es wurden 10 µl Zellsuspension eingesetzt und ein Großquadrat ausgezählt. Die Zellzahl wurde mit dem Kammerfaktor (2,5) und der Flüssigkeitsmenge (in µl), in welcher die Zellen suspendiert waren, multipliziert.

Überprüfung der Zell-Viabilität mittels Trypanblau

Zur Bestimmung der Viabilität wurden 20 µl Zellsuspension (verdünnt in Ca²⁺/Mg²⁺-freien DPBS) mit 20 µl 0,4 %-iger Trypanblau-Lösung versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Farbstoff nicht ins Zellinnere vitaler Zellen gelangt, nehmen abgestorbene und perforierte Zellen Trypanblau auf und werden dadurch tiefblau angefärbt. Die Auszählung der lebenden und apoptotischen Zellen erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer.

2.1.2 Versuchsgenehmigungen

Alle Tierexperimente und Eingriffe wurden entsprechend der EU Richtlinie 86/609/EWG zum Schutz von Versuchstieren durchgeführt und wurden zuvor durch das Regierungspräsidium Gießen genehmigt. Die Tierversuchsanträge und Anzeigen können unter den in Tabelle 2.1 angegebenen Aktenzeichen eingesehen werden.

Aktenzeichen	Versuch
A34_2011	Zellisolation und isoliert-perfundierte Lunge
A115_2014	Zellisolation
A07_2016	Chronische Hypoxie-Exposition
JLU460_M	Fütterungsversuch Vitamin E

Tabelle 2.1: Aktenzeichen und Genehmigung des Regierungspräsidiums Gießen.

2.2 Protein histochemische Methoden

2.2.1 Proteinaufreinigung aus Lungengewebe und mPASC

Für die Herstellung des Homogenats wurden ≈20 mg Lungen- bzw. Lebergewebe von *Sprague-Dawley*[®] *Outbred* Ratten in flüssigem Stickstoff mit Mörser und Stößel zermahlen. Die Proben wurden in 2 ml Schraubverschlussgefäße gegeben, die bereits mit Keramikkügelchen (Ø 1,4 mm) gefüllt waren. Danach wurden 500 µl Krebs-Henseleit Puffer (KHB) (Zusammensetzung Abs. D) und 1 µl Protease-Inhibitor-Cocktail *cOmplete* (Sigma-Aldrich, München) zugefügt. Das Gewebe wurde in einem Homogenizer (PRECELLYS R24) für 2 x 30 s bei 6 800 g homogenisiert. Die Gewebesuspension wurde abgenommen und nach 10 min Equilibrierung auf Eis für 10 min bei 14 000 rpm (Micro 200R) bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und für die Proteinanalyse eingesetzt. Bei Verwendung von mPASC anstatt Homogenat für die Western-Blot-Analyse wurden 150 µl Zelllyse-Puffer und 1 µl Protease-Inhibitor-Cocktail zugefügt. Alle weiteren Schritte bis zur Proteinaufreinigung erfolgten wie vorab für das Gewebe beschrieben.

2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinmenge von Homogenat oder Zellsuspension erfolgte nach der Bradford-Methode [207] und wurde mittels Bio-Rad-Protein Assays nach dem Standardprotokoll durchgeführt [208]. Für die Erstellung der Eichgerade wurden jeweils 5 µl BSA-Lösung in aufsteigender Konzentration (0 - 10 µg/ml) eingesetzt. Die Messung der Absorption erfolgte bei 750 nm mittels *Microplate Reader* (Tecan Infinite M200, Grödig, Österreich).

2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot

Für die Western-Blot-Analysen wurden 20 µg/µl des Protein-enthaltenden Überstands eingesetzt, mit 10x Laemmli-Puffer versetzt und 10 min bei 96 °C erhitzt. Die Proteine wurden auf einem 12 %-igen Gel, bestehend aus einem Sammelgel und einem Trenngel (Zusammensetzung Abs. D.12), aufgetragen und die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese über 60 min bei 100 V durchgeführt. Das negativ geladene Natriumdodecylsulfat (SDS) in den Gelen wirkt denaturierend. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes können die Proteine aufgrund ihrer Ladung zur Anode wandern, wodurch eine Auftrennung je nach Molekulargewicht erfolgt. Dabei wandern kleine Proteine schneller zur Anode.

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden anschließend auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran unter Nutzung des Semi-Dry-Western-Blot-Systems (Keutz, Reiskirchen) transferiert (100 V, 75 min). Die Membran wurde mit 6 %-igem Magermilchpulver (w/v) in *Tris-buffered saline Tween20* (TBST)-Puffer für 60 min geblockt, bevor sie über Nacht bei 4 °C mit einem Primär-Antikörper inkubiert wurde [anti-Superoxid-Dismutase-1 (anti-SOD1), anti-Superoxid-Dismutase-2 (anti-SOD2), anti-Katalase (anti-Cat), Abcam, Cambridge, UK]. Die Primär-Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:1 000 eingesetzt. Als *Housekeeping*-Protein (konstitutiv exprimiertes, nicht reguliertes Protein) wurde anti-β-Aktin (Sigma-Aldrich, München) in einer Verdünnung von 1:50 000 eingesetzt. Nach dreimaligem Waschen mit TBST-Puffer wurde die Membran für 60 min mit Meerrettich-Peroxidase [*horseradish peroxidase* (HRP)] gekoppeltem, sekundären Antikörper (AK) (Verdünnung 1:5 000, je nach Herstellerangaben *anti-rabbit* oder *anti-mouse* AK, Promega) inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für 15 min gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte mit einem *Amersham ECL Plus Western Blotting Detection System*. Wenn mehr als ein Protein auf derselben Western-Blot-Membran untersucht werden sollte, wurde die PVDF-Membran mit einer β-Mercaptoethanol-haltigen *Stripping*-Lösung behandelt, um Primär- bzw. Sekundär-AK zu entfernen.

2.3 Klinische Methoden

2.3.1 Bronchoalveoläre Lavage

Die bronchoalveoläre Lavage (BAL) ist ein Verfahren der klinischen Routinediagnostik, bei dem mit Hilfe eines Fiberbronchoskops *epithelial lining fluid* (ELF) in methodisch bedingt variabler Verdünnung aus den peripheren Atemwegen, letztlich den Alveolen gewonnen wird. Sie wurde durch Fachärzte des Universitätsklinikum Gießen und Marburg (UKGM) durchgeführt. Im Regelfall wurden 150 ml steriler, physiologischer NaCl-Lösung zum Spülen des Mittellappens oder der Lingula der transplantierten Lunge eingesetzt, da der Gewinn an Zellen und Flüssigkeit dort am größten ist. Nach dem Absaugen wurde sowohl das instillierte als auch das zurückgewonnene Volumen dokumentiert. Dieses Volumen wird im Folgenden als bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit (BALF) bezeichnet. Die BALF wurde ungekühlt in das Routinelabor der Infektiologie des UKGM, Prof. Dr. Lohmeyer, gebracht.

2.3.2 Biopsie und Histopathologie

Sofern kein klinischer Verdacht auf eine Infektion bestand, wurden über einen Arbeitskanal des Fiberbronchoskops nach Entnahme der BALF mit einer kleinen Biopsiezange jeweils unilateral von allen Lungenlappen Biopate mit einem Volumen im Bereich von wenigen mm³ entnommen. Die histologische Aufarbeitung des Biopsiematerials wurde am Institut für Pathologie des UKGM (Prof. Gattenlöhner) vorgenommen und nach den derzeitigen Richtlinien der *International Society for Heart and Lung Transplantation* (ISHLT) klassifiziert [209, 210]. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl die akute, zelluläre Abstoßung (ISHLT-A) als auch der Grad der bronchialen Entzündung bzw. das Vorliegen einer lymphozytären Bronchitis/Bronchiolitis (ISHLT-B und ISHLT-BR) untersucht. Die Klassifikationen A, B und BR sind explizit ordinalskaliert (Tab. 4.1). Je nach Ausmaß perivaskulärer, mononukleärer Infiltrate und begleitender Parenchymveränderungen werden dort vier Schweregrade der akuten Abstoßung unterschieden. Eine akute Abstoßung ab dem Grad A2 oder ab B1 bzw. B1R gilt als therapie-relevant [210]. Obwohl die ISHLT-BR-Klassifikation als Nachfolger von ISHLT-B intendiert war, verwendet das Institut für Pathologie des UKGM auch weiterhin die ISHLT-B-Klassifikation, aufgrund ihres als klinisch relevant betrachteten, größeren Unterscheidungsvermögens. Vielmehr gibt es die Einstufung nach der revidierten Klassifikation ISHLT-BR, die in ISHLT-B enthalten ist und aus ihr – empirisch ausnahmslos – direkt folgt (Glg. 2.1), zur Vergleichbarkeit zusätzlich an.

$$ISHLT_{BR}(ISHLT_B) = \begin{cases} B_0 & \text{wenn } ISHLT_B = B_0 \\ B_{1R} & \text{wenn } ISHLT_B \in B_1, B_2 \\ B_{2R} & \text{wenn } ISHLT_B \in B_3, B_4 \end{cases} \quad (2.1)$$

2.3.3 Zytologie der humanen bronchioalveolären Lavage-Flüssigkeit

Die zytologische Analyse der BALF wurde durch das Routinelabor der Infektiologie des UKGM 15 bis 60 min nach der Bronchoskopie durchgeführt. Die BALF wurde für 8 min bei 1 400 rpm und 20 °C zentrifugiert (Verifuge 3.0 R, Heraeus, Osterode). Der Überstand wurde abgenommen, in 50 ml *Falcons* für weitere Analysen gesammelt und bei -80 °C gelagert. Anschließend wurde das Zellpellet in RPMI-1640 Medium (inklusive 10 % FKS) resuspendiert. 100 µl der Zellsuspension

wurden in einen *Cytospin*-Aufsatz einer Zytocentrifuge (*Cytospin 4*, Thermo Fisher, Waltham, USA) pipettiert, bei 500 rpm, 5 min und 20 °C auf einen Objektträger sedimentiert und an der Luft getrocknet. Anschließend wurde eine Pappenheim-Färbung (Abs. 2.3.3.2) durchgeführt. Danach erfolgte die Bestimmung der Gesamtzellzahl der Leukozyten in der BALF sowie des prozentualen Anteils an Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten und Makrophagen. Die Differentialzytologie basiert auf Grundlage der Auszählung von 100 Leukozyten/BALF, deren Zusammensetzung stark variieren kann. Für lungengesunde Nichtraucher werden auf den Laborbefunden des Infektionslabors des UKGM die in Tab. 2.2 dokumentierten Grenzwerte angegeben.

Zelltyp	Anteil [%]
Neutrophile	< 13
Makrophagen	> 85
Lymphozyten	< 2
Eosinophile	< 1

Tabelle 2.2: Grenzwerte der Leukozytenanteile der BALF. Infektionslabor des UKGM, vergleiche Reynolds (1987) [211].

2.3.3.1 Erythrozyten-Zelllyse

Wenn die BALF aufgrund einer größeren Menge an Erythrozyten blutig tingiert erschien, wurden diese zunächst lysiert, da sie die Differenzierung der Leukozyten optisch stören. Je nach geschätzten Erythrozyten-Anteil wurden zur BALF 15 bis 30 ml Lysispuffer zugefügt und, wie auch die unauffälligen BAL-Proben, für 8 min bei 1 400 rpm und 20 °C zentrifugiert. Der Überstand Erythrozyten-Lyse-Puffer-haltige Überstand wurde abgenommen. Das Zellpellet wurde in RPMI-1640 Medium resuspendiert, gepoolt und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die osmotisch sehr empfindlichen Erythrozyten können aus der Probe durch kurzzeitiges Einbringen der Zellen in eine hypotonen Lösung (Erythrozyten-Lyse-Puffer, Tab. D.9) entfernt werden. Durch die niedrige Salzkonzentration im Lysispuffer nehmen die Zellen Wasser aus der Lösung auf und schwellen an. Während die Leukozyten die zusätzliche Wasseraufnahme verkraften, platzen die Erythrozyten.

2.3.3.2 Differenzierung von Leukozyten mittels Pappenheim-Färbung

Die May-Grünwald-Giemsa-Färbung (Pappenheim-Färbung) ist eine auf die Darstellung des Zytoplasmas spezialisierte Färbung, welche morphologische Unterschiede zwischen den verschiedenen Zellpopulationen lichtmikroskopisch kontrastiert. Die Färbelösungen beinhalten jeweils einen basischen und einen anionischen Farbstoff. Die May-Grünwald-Lösung besteht aus Eosin-Methylenblau, die Giemsa-Lösung aus Azur-Eosin-Methylenblau, wodurch Zytoplasma und Kern basophiler Granulozyten als auch Lymphozyten blau, Erythrozyten und eosinophilen Granulozyten orange bis rot dargestellt werden. Zellkerne neutrophiler Granulozyten erscheinen violett, Kerne der Monozyten blau-violett.

Für den ersten Färbeschritt wurden die Zellen zunächst mit 500 µl unverdünnter May-Grünwald-Färbelösung (Merck, Darmstadt) bedeckt und für 5 min inkubiert. Im Anschluss wurden 500 µl DPBS zur Lösung gegeben und eine weitere Minute inkubiert (Färbung 1). Die Lösung wurde abgenommen und der Objektträger kurz mit DPBS gespült. Anschließend wurde dieser mit 500 µl 1:20 verdünnter Giemsa-Lösung (Merck, Darmstadt) bedeckt und für 20 min inkubiert (Färbung 2). Zuletzt wurden die Zell-Präparate zweimal vorsichtig mit 1 ml DPBS gewaschen und luftgetrocknet. Die Färbung als auch die lichtmikroskopische Klassifizierung von jeweils 100 Leukozyten wurde im Routinelabor der Infektiologie des UKGM bei 1 000facher Vergrößerung durch die hämatologisch-technische Assistentin Elena Roth vorgenommen.

2.3.3.3 Bestimmung des Hämosiderin-Scores

Neben der Differentialzytologie wurde außerdem Hämosiderin durch eine *Berliner Blau*-Färbung (Sigma-Adrich, München) nachgewiesen. Der durch das Routinelabor der Infektiologie des UKGM ermittelte Hämosiderin-*Score* bezieht sich auf eine Zellzahl von 100 Leukozyten und setzt sich aus der Anzahl der Hämosiderin-beladenen Makrophagen sowie deren individueller Eisenlast zusammen.

2.3.3.4 Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie [*fluorescence activated cell scanning* oder *fluorescence activated cell sorting* (FACS)] ist es möglich, einzelne Zellen anhand ihrer Lichtstreuungseigenschaften und emittierten Fluoreszenz zu analysieren. Vorwärtsstreulicht [*forward scatter* (FSC)] entsteht durch Beugung des Lichts an der Oberfläche, während Seitwärtsstreulicht [*side scatter* (SSC)] durch Beugung an Membranen und Vesikeln im Zellinneren entsteht. Damit kann auf Größe und Granularität der Zellen geschlossen werden. Neben der Bestimmung der morphologischen Eigenschaften können Antigene mittels Fluorochrom-markierten Antikörpern (Tab. 2.3) nachgewiesen werden [212]. Die Fluoreszenzfarbstoffe Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridinin-Chlorophyll (PercP) und Allophycocyanin (APC) wurden so gewählt, dass sich die

Emissionspektren möglichst nicht überlappen, damit falsch-positive und falsch-negative Messergebnisse vermieden werden [212]. FITC, PE und PercP wurden mit einem Argon-Laser (488 nm) und APC mit einem Helium-Neon-Laser (633 nm) angeregt und in Wellenlängen wieder emittiert, die spezifisch für das jeweilige Fluorochrom sind (Tab. 2.3).

Fluorochrom	Ex-Max/Em-Max [nm]	Fluoreszenz-Kanal
FITC	494 / 520	grün
PE	496 / 578	gelb
PercP	490 / 677	rot
APC	650 / 785	infrarot

Tabelle 2.3: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe mit Exitations- und Emissions-Maxima.

In Tabelle 2.4 sind die für die Zelldifferenzierung in der BALF genutzten Antigene der Leukozyten entsprechend der CD-Nomenklatur (*Cluster of Differentiation*) oder *Antigen Cluster Designation* aufgelistet [213].

Name	Zelluläre Expression	Antigen
CD3	T-Zellen	Assoziiert mit Antigenrezeptor von T-Zellen
CD4	T-Helferzellen	Co-Rezeptor für MHC class II Moleküle
	Monozyten (nur Mensch)	Rezeptor für gp120 von HIV-1 und HIB-2
	Makrophagen (nur Mensch)	Rezeptor für gp120 von HIV-1 und HIB-2
CD8	Zytotoxische T-Zellen	Co-Rezeptor für MHC class I Moleküle
CD16	Neutrophile, NK-Zellen, Makrophagen	Fc γ RIII-Rezeptor
CD19	B-Zellen	Co-Rezeptor für B-Zell -Rezeptor
CD25	regulatorische T-Zellen (konstitutiv)	α -Kette des IL-2-Rezeptors
	aktivierte T-Zellen	α -Kette des IL-2-Rezeptors
CD45	Alle hämatopoetischen Zellen	Tyrosinphosphatase
CD56	NK-Zellen	Adhäsionsmolekül

Tabelle 2.4: Oberflächen-Antigene zur Lymphozyten-Differenzierung mittels FACS. Die Oberflächen-Antigen wurden so ausgewählt, dass sie spezifisch für eine bestimmte Lymphozyten-Population sind. Diese wurden mittels Fluorochrom-markierten Antikörpern mittels FACS nachgewiesen.

2.3.3.5 Immunophänotypisierung von BALF-Lymphozyten

Das Infektionslabor des UKGM führte eine Immunophänotypisierung der Lymphozyten in B-Lymphozyten (CD19⁺), T-Helferzellen (CD4⁺), zytotoxische T-Zellen (CD8⁺) und NK-Zellen (CD56⁺, CD16⁺) ab einem Lymphozytenanteil von ≥ 6 bis 8 % an der Gesamtzellzahl in der BALF durch. Die beiden nachfolgenden Abbildungen zeigen beispielhaft für einen Ltx-Patienten

die nach dem FACS-Sorting erhaltenen Graphen zur Bestimmung des prozentualen Anteils der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (Abb. 2.1) sowie der B-Zellen und NK-Zellen (Abb. 2.2).

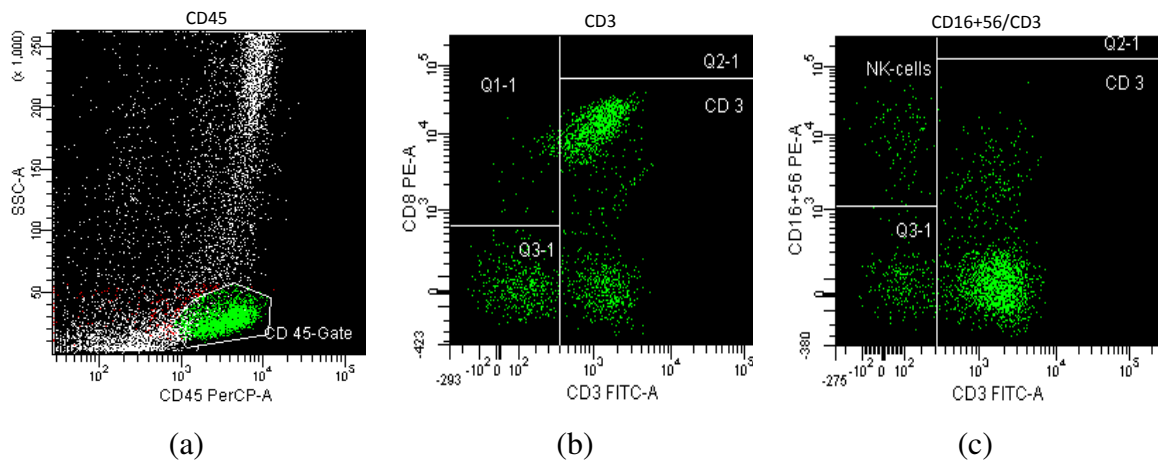


Abbildung 2.1: Immunophänotypisierung von T-Lymphozyten. Lymphozyten der BALF wurden durch Färbung deren Oberflächenantigens CD45 (links) identifiziert. T-Lymphozyten wurden als CD3-positiv definiert (Mitte) und in CD4-positive T-Helferzellen und CD8-positive zytotoxische T-Zellen unterschieden (rechts).

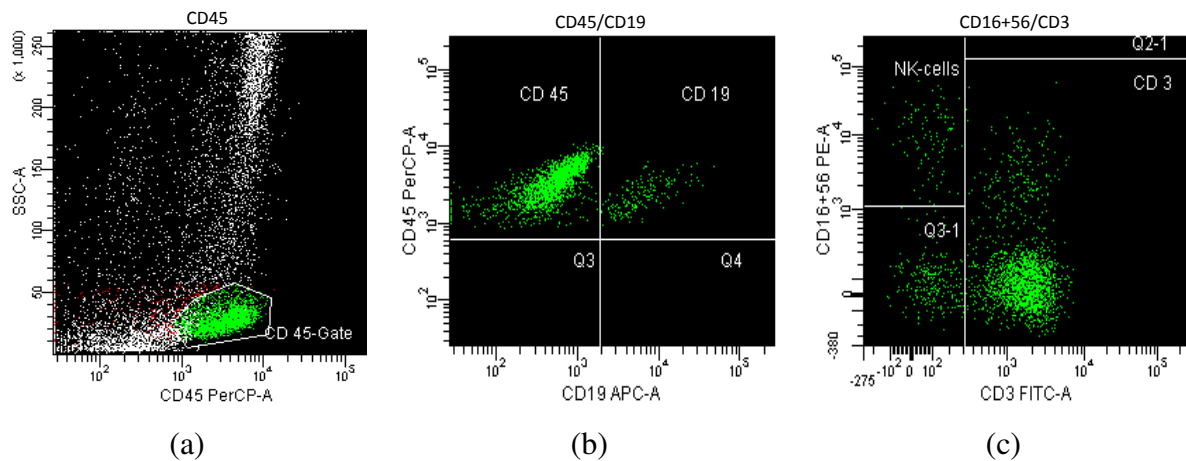


Abbildung 2.2: Immunophänotypisierung von B-Lymphozyten und NK-Zellen. Die Lymphozyten der BALF wurden durch Färbung deren Oberflächenantigens CD45 (links) identifiziert. B-Lymphozyten (Mitte) wurden als CD19-positiv; die NK-Zellen (rechts) als CD3-negativ, CD16- und CD56-positiv definiert.

2.4 Fluoreszenzbasierte Methoden zum ROS-Nachweis

2.4.1 Fluoreszenzsonden

Nachweis von zytosolischen H_2O_2 mittels DCFDA

2',7'-Dichlorofluorescein Diacetat (DCFDA) ist eine Fluoreszenzsonde zum Nachweis von intrazellulären H_2O_2 . DCFDA ist ein zellpermeables Ester und wird durch zelluläre Esterasen zu dem nicht fluoreszierenden Intermediat DCFH deacetyliert, das durch ROS zu dem fluoreszierenden Produkt *Dichlorofluorescein* (DCF) oxidiert wird. Die Oxidation zu DCF erfolgt in zwei Schritten. Im Ersten wird ein DCF-Radikal gebildet. Dieser Schritt kann neben H_2O_2 durch andere reaktive Spezies im Wege der *Ein-Elektron-Reduktion* katalysiert werden. Dazu gehören Stickstoffdioxid (NO_2), das Hydroxyl-Radikal ($\bullet\text{OH}$), das Kohlenstoffradikal ($\text{CO}_2\bullet$) und die hypochlorige Säure (HOCl). Das Exitationsmaximum von DCF liegt bei 485 nm; das Emissionsmaximum bei 535 nm [214, 215].

Nachweis von zytosolischen $\text{O}_2^{\bullet-}$ mittels Dihydroethidium (DHE)

DHE ist die reduzierte Form des verbreitet als DNA-anfärbenden Farbstoffs genutzten Ethidium-Bromid. Es wird als die derzeit spezifischste Fluoreszenzsonde zur Detektion von zytosolischen $\text{O}_2^{\bullet-}$ [216] angesehen. DHE ist zellpermeabel und reagiert in Gegenwart von intrazellulären $\text{O}_2^{\bullet-}$ zu Dihydroxyethidium (2-OH-E), dessen Exitationsmaximum bei 535 nm und Emissionsmaximum bei 635 nm liegt. DHE selbst zeigt eine blaufluoreszente Färbung im Zytoplasma. Die oxidierte Form 2-OH-E, welche mit der DNA interkaliert, fluoresziert rot [217, 218].

Nachweis von mitochondrialen $\text{O}_2^{\bullet-}$ mittels MitoSOX

MitoSOX wird zur Detektion von mitochondrialen $\text{O}_2^{\bullet-}$ angewandt. Da diese Fluoreszenzsonde ein kationisches Derivat von DHE ist, ist die Reaktion mit der von DHE in Gegenwart von $\text{O}_2^{\bullet-}$ vergleichbar. Die auf die Mitochondrienmatrix gerichtete Sonde reagiert jedoch deutlich schneller mit $\text{O}_2^{\bullet-}$ zu 2-Hydroxymitoethidium (2-OH-mito-E), welches ebenfalls wie 2-OH-E bei einer Wellenlänge von 510 nm angeregt wird und bei 580 nm emittiert. Analog zu DHE kann MitoSOX unspezifisch mit anderen Oxidantien zu Mito-Ethidium (Mito-E) reagieren, dessen Fluoreszenzspektrum sich mit dem von 2-OH-mito-E überschneidet [214]. In lebenden Zellen kann laut Robinson und Kollegen bei einer Exitation von 400 nm mitochondriales $\text{O}_2^{\bullet-}$ eindeutiger quantifiziert werden [219], da das Signal des unspezifischen Fluoreszenzproduktes deutlich reduziert ist.

2.4.2 Durchführung der Fluoreszenzmessungen

Murine PASMCM (Passage P₂) wurden entweder für 120 h unter normoxischen (21 % O₂, 5 % CO₂, Rest N₂) oder 120 h unter hypoxischen (1 % O₂, 5 % CO₂, Rest N₂) Bedingungen bei 37 °C inkubiert. 24 h vor Beginn der Fluoreszenzmessung wurden 10 000 mPASMCM/Well auf eine 96-Well Platte (schwarz, transparenter Boden, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) ausgesät und in M199-Medium kultiviert. Alle weiteren Schritte wurden lichtgeschützt durchgeführt. Unmittelbar vor dem Experiment wurden für DCFDA, DHE und MitoSOX 5 mM Stammlösungen (gelöst in DMSO) hergestellt. Das Medium wurde abgenommen. Um intrazelluläres H₂O₂ zu detektieren, wurden die Zellen für 45 min bei 37 °C in 200 µl DCFDA-Lösung (5 µM) inkubiert. Zum Nachweis von zytosolischem O₂^{•-} wurden mPASMCM für 20 min bei 37 °C in 200 µl DHE-Lösung (5 µM) und von mitochondrialen O₂^{•-} für 10 min bei 37 °C in 200 µl MitoSOX-Lösung (5 µM) inkubiert. Danach wurden die Lösungen abgenommen, die Zellen einmal in DPBS gewaschen und 100 µl KHB auf die mPASMCM gegeben. Die Fluoreszenzmessungen wurden mit einem *Microplate Reader* (Tecan Infinite M200, Grödig, Österreich) bei den unter Abs. 2.4.1 angegebenen Wellenlängen durchgeführt.

2.5 ESR-Spektroskopie

Um ROS/RNS im biologischen System nachweisen zu können, wurden verschiedene ESR-Techniken entwickelt, auf deren Grundlagen detailliert in der Einleitung von Kapitel 3 „Nachweis von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies“ (Abs. 3.1) eingegangen wird. Dazu zählen u. a. der Einsatz von sogenannten *Spin probes* und *Spin traps* (Abs. 3.1.6), die sich im Wesentlichen in der Art der detektierten reaktiven Spezies, der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen dieser und der *Spin probe* bzw. *Spin trap* sowie der Stabilität des Reaktionsproduktes unterscheiden.

Bezeichnung	k (O ₂ ^{•-}) [M ⁻¹ s ⁻¹]	t _{1/2} O ₂ ^{•-} -Addukt / Nitroxid	Typ
BMPO	77	20-23 [min]	<i>Spin trap</i>
DEPMPO	90	14-18 [min]	<i>Spin trap</i>
CMH	1,2 × 10 ⁴	mehrere Stunden	<i>Spin probe</i>
CPH	3,2 × 10 ³	mehrere Stunden	<i>Spin probe</i>
PPH	0,84 × 10 ³	mehrere Stunden	<i>Spin probe</i>
MitoTEMPO-H	1,0 × 10 ³	mehrere Stunden	<i>Spin probe</i>
TEMPONE-H	1,2 × 10 ⁴	mehrere Stunden	<i>Spin probe</i>

Tabelle 2.5: *Spin traps* und *Spin probes*, deren Reaktionsgeschwindigkeit (k) in Gegenwart von O₂^{•-} sowie die Halbwertszeit (t_{1/2}) deren O₂^{•-}-Addukte (*Spin traps*) bzw. Nitroxide (*Spin probes*) [220–226].

In Tab. 2.5 sind die Reaktionsgeschwindigkeiten einiger *Spin probes* bzw. *Spin traps* mit O₂^{•-} und die Halbwertszeit der O₂^{•-}-Addukte von BMPO und DEPMPO sowie der Nitroxide der *Spin probes* aufgelistet. In Abb. 2.3 sind die chemischen Strukturen der *Spin probes* CMH,

CPH, PPH und MitoTEMPO-H (oberer Teil) und deren korrespondierende Nitroxide (unterer Teil) dargestellt.

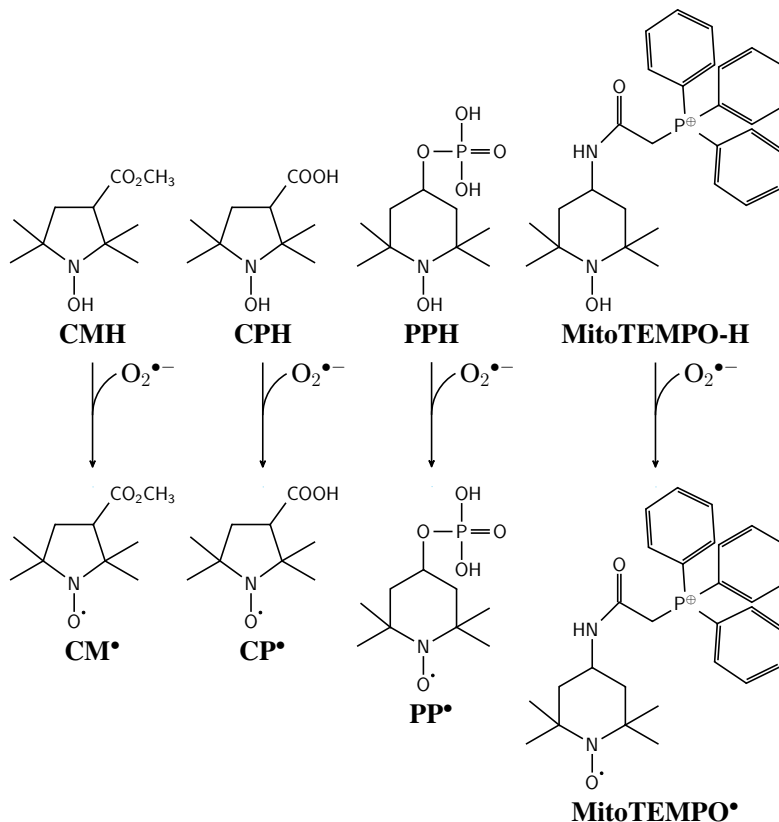


Abbildung 2.3: Chemische Strukturen der verwendeten Spin probes und deren Oxidationsprodukte. Die ESR-stummen Spin probes CMH, CPH, PPH und MitoTEMPO-H reagieren in Gegenwart von $O_2^{\bullet-}$ zu den stabilen Nitroxiden CM-Radikal (CM•), CP-Radikal (CP•), PP-Radikal (PP•) und MitoTEMPO-Radikal (MitoTEMPO•), die mittels ESR-Spektroskopie nachgewiesen werden können. Das ungepaarte Elektron an dem Stickstoffatom benachbarten Sauerstoff ist für das ESR-Signal verantwortlich.

Die chemischen Strukturen der in dieser Arbeit getesteten *Spin traps* und deren in Gegenwart von $O_2^{\bullet-}$ gebildeten Oxidationsprodukte sind in Abb. 2.4 dargestellt.

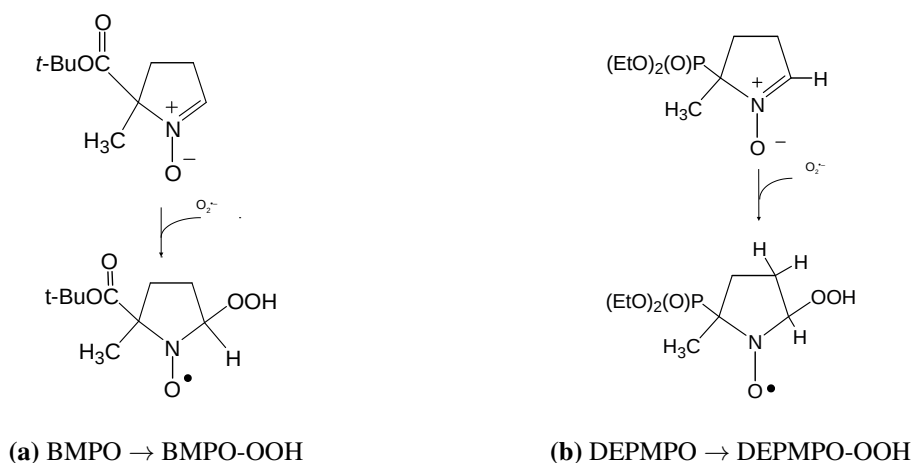


Abbildung 2.4: Chemische Strukturen der verwendeten Spin traps und deren Oxidationsprodukte. Durch die Reaktion der Spin traps BMPO und DEPMPO mit $O_2^{\bullet-}$ werden die Addukte (a) BMPO-OOH mit einer $t_{1/2}$ von 22 min oder (b) DEPMPO-OOH mit einer $t_{1/2}$ von 18 min gebildet und können so durch ESR-Spektroskopie nachgewiesen werden.

2.5.1 ESR-Probenvorbereitung in normoxischer Umgebung

Die eingesetzten *Spin probes*, *Spin traps* sowie die stabilen, für Standardreihen eingesetzten Nitroxide CM[•] und CP[•], wurden in mit Argon begastem KHB (Zusammensetzung Tab. D.11, pH 7,4) gelöst. Sofern nicht anders beschrieben, wurde standardmäßig die *Spin probe* CMH (0,5 mM) und die membrangängige Superoxid-Dismutase Polyethylen-glycol (pSOD) (50 U/ml, gelöst in KHB) für die ESR-Probenvorbereitung zellhaltiger Proben eingesetzt. Um die intra- und extrazelluläre O₂^{•-}-Produktion quantifizieren zu können, wurden Parallelansätze sowohl mit CMH (0,5 mM) allein als auch CMH und pSOD durchgeführt.

2.5.1.1 Erstellung einer CM[•]- und CP[•]-Standardreihe

Unter Verwendung von kommerziell erhältlichen, stabilen CM[•] (Noxygen, Elzach) bzw. stabilen CP[•] (Noxygen, Elzach) wurden CM[•]- oder CP[•]-Standardreihen im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 500 µM (CM[•]-Standard) bzw. 0,01 bis 10 000 µM (CP[•]-Standard) erstellt. Die Substanzen wurden in mit Argon begastem KHB gelöst.

2.5.1.2 ESR-Probenvorbereitung von pulmonal-arteriellen Zellen der Maus

Murine PASMC, MLF und CMT-Zellen wurden zweimal in DPBS gewaschen und mittels Trypsin (1-fach) von der Oberfläche der Zellkulturplatte bzw. -flasche gelöst. Die enzymatische Reaktion wurde mit FKS (10 %) abgestoppt, das zellhaltige Medium in *Falcons* gesammelt und anschließend für 5 min bei 1200 rpm und 20 °C zentrifugiert (Zentrifuge Rotanda 460R, Hettich, Tuttlingen). Nach der Zentrifugation wurde der Zellüberstand verworfen und das Zellpellet in KHB aufgenommen. Alle für Zellexperimente verwendeten Lösungen wurden vor Verwendung auf 37 °C aufgewärmt. Die Zellzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammer ausgezählt und auf 100 000/300 µl pro ESR-Versuchsansatz normalisiert, sofern nicht anders angegeben. Die Festlegung auf diese Zellzahl resultiert auf Grundlage der in Abb. 3.22 dargestellten Ergebnisse. Wurden wie bei den meisten ESR-Experimenten mPASMCs verwendet, erfolgte die Kultivierung der Zellen bis zur Passage P₂. Ausgenommen davon ist das Experiment in Abs. 3.2.3.4.

Die *Spin probes* CMH, CPH, PPH und MitoTEMPO-H wurden jeweils in einer Endkonzentration von 0,5 mM eingesetzt. Es wurden jeweils Parallelansätze sowohl mit der jeweiligen *Spin probe* allein als auch mit *Spin probe* und SOD (50 U/ml, gelöst in KHB) bzw. pSOD (50 U/ml, gelöst in KHB) durchgeführt. Die native SOD wird zur Bestimmung des extrazellulären O₂^{•-}-Anteils verwendet, da diese die Zellmembranen nicht oder nur langsam durchdringen kann. Durch Verwendung der mit Polyethylen-glycol konjugierten und dadurch gut membrangängigen pSOD ist es jedoch möglich, auch intrazelluläres O₂^{•-} nachzuweisen.

Die zellhaltigen Proben wie auch zellfreien Kontrollen wurden nach Zugabe von SOD bzw. pSOD zunächst für 90 min bei 21 % O₂, 0 % CO₂, Rest N₂ und 37 °C inkubiert. Die Paral-

Parallelansätze wurden anstatt mit SOD bzw. pSOD mit dem entsprechend zusätzlichen Volumen KHB unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurde der Probe die *Spin probe* zugefügt und für weitere 30 min inkubiert. Um BMPO (10 mM) und DEPMPO (10 mM) zu testen, wurde eine Zeitreihe gemessen (Abs. 3.2.6). Die beiden *Spin traps* wurden zusammen mit MLF (100 000/300 µl) für 0, 10, 15, 20 und 30 min unter Normoxie (21 % O₂, 0 % CO₂, Rest N₂) bei 37 °C inkubiert und direkt im Anschluss im flüssigen Zustand gemessen.

Die flüssigen ESR-Proben wurden nach Beendigung der Inkubationszeiten auf Eis gestellt und direkt im Anschluss gemessen. Bei den meisten Experimenten wurden die Proben jedoch in 1 ml Spritzen (B. Braun, Melsungen) gefüllt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und die ESR-Messungen (Abs. 2.5.3) zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt. Die Lagerung der ESR-Proben erfolgte bei -80 °C.

2.5.1.3 ESR-Probenvorbereitung Lungen- und Lebergewebe

Das Gewebe wurde zunächst wie im beschriebenen Abs. 2.2.1 beschriebenen Standardprotokoll homogenisiert. An Stelle des Lyse-Puffers wurde das Gewebe in 500 µl KHB aufgenommen. Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration mittels Bradford-Methode durchgeführt. Es wurde jeweils 100 µl Gewebesuspension pro 300 µl ESR-Probenansatz eingesetzt. Die Proben wurden nach Zugabe von pSOD für 60 min bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Nach Zufügen von CMH (0,5 mM) erfolgte eine Inkubation für weitere 30 min bei 37 °C. Im Anschluss wurden die Proben in 1 ml (B. Braun, Melsungen) Spritzen gefüllt und in Flüssigstickstoff schockgefroren.

2.5.1.4 ESR-Probenvorbereitung bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit

Durch das Routinelabor der Infektiologie des UKGM wurde der komplette Überstand nach Zentrifugation der BALF sowie das BALF-Restmaterial der nicht für die Differentialzytologie benötigten zellhaltigen Fraktion für die klinische Studie (Kapitel 4) zur Verfügung gestellt. Der Überstand wurde direkt nach dem Erhalt bei -20 °C eingefroren.

Die durch das Routinelabor bereits aus der BALF aufbereiteten und in RPMI-1640 Medium (inkl. 10 % FKS) resuspendierten Zellen (Abs. 2.3.3) wurden 5 min bei 1200 rpm und 20 °C zentrifugiert (Zentrifuge Rotanda 460R, Hettich, Tuttlingen). Im Anschluss wurde das Medium abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde in KHB resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt und auf 3×10^6 /ml eingestellt. Pro ESR-Versuchsansatz wurde eine Zellkonzentration von 300 000/300 µl eingesetzt. Die Festlegung auf eine Zellzahl von 300 000 pro ESR-Ansatz als Standardprotokoll für die Probenvorbereitung der BALF-Zellpopulationen erfolgte auf Grundlage von Vorversuchen. Alle weiteren Schritte erfolgten analog zu der im Abs. 2.5.1.2 für pulmonal-arterielle Zellen beschriebenen ESR-Probenvorbereitung. Die zellhaltigen Proben wie auch zellfreien Kontrollen wurden nach Zugabe von pSOD (50 U/ml) zunächst für 90 min bei 21 % O₂, 0 % CO₂, Rest N₂ und 37 °C inkubiert. Die Parallelansätze

wurden anstatt mit pSOD mit dem entsprechend zusätzlichen Volumen KHB unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurde CMH (0,5 mM) zugefügt und für weitere 30 min bei 21 % O₂, 0 % CO₂, Rest N₂ und 37 °C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeiten wurden die Proben in 1 ml Spritzen (B. Braun, Melsungen) gefüllt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur ESR-Messung (Abs. 2.5.3) gelagert.

Der BALF-Überstand des Routinelabors sowie die für den ESR-Versuch nicht benötigte, in KHB gelöste, Zellsuspension wurde der Arbeitsgruppe (AG) Mayer des ECCPS für weitere Analysen im Rahmen der oben genannten klinischen Studie zur Verfügung gestellt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C im Gefrierfach des Labors von AG Mayer gelagert.

2.5.2 ESR-Probenvorbereitung unter hypoxischen Bedingungen

Alle ESR-Experimente im Kontext des Einflusses hypoxischer Bedingungen auf die ROS/RNS- und O₂^{•-}-Bildung pulmonal-arterieller Zellen wurden in einer Hypoxiekammer (*hyoxic glove chamber*, Coy Laboratory Inc., Michigan, USA) durchgeführt. Es wurden hierbei mPASMCM oder MLF (100 000/300 µl) eingesetzt. Im Unterschied zu den in Abs. 2.5.1 für normoxische Proben beschriebenen Protokoll wurden die Zellen entweder für die letzten 5 min der Versuchszeit (akute Hypoxie) oder 3 h (prolongierte Hypoxie), 48 h bzw. 120 h (chronische Hypoxie) bei einer Atmosphäre von 1 % O₂, 0 % CO₂, Rest N₂ und 37 °C inkubiert. Alle Arbeitsschritte wurden in der Hypoxiekammer durchgeführt, um eine Reoxygenierung zu vermeiden. Es ist anzumerken, dass die O₂-Konzentration von nominal 1 % während einer akuten Hypoxieexposition im zellhaltigen Puffer nicht erreicht wird, sondern zwischen 4 % bis 5 % liegt [227].

2.5.3 ESR-Parameter

Geräteparameter für Messungen von flüssigen Proben

Die cw-ESR Messungen wurden mit dem EMXmicro Spektrometer (Bruker BioSpin, Rheinstetten) im X-Band (ca. 9.4 GHz) bei Raumtemperatur (20-22 °C) und eingeschalteter Klimaanlage durchgeführt. Wenn flüssige Proben in 50 µl Kapillaren gemessen wurden, wurden sie wegen der einfacheren Handhabbarkeit in dem auch zur Messung von gefrorenen Proben verwendeten, hier jedoch ungekühlten *Dewar* (Magnetech, Berlin), einem ESR-Probenhalter aus doppelwandigem Quarzglas, eingestellt. Hochaufgelöste Zeitreihenmessungen („online Messungen“) wurden mit Hilfe eines als *AquaX* bezeichneten Kapillarbündels der Firma Bruker BioSpin durchgeführt, welches anstelle des *Dewars* im Resonator festgeklemmt wurde. Insofern nicht anders angegeben, wurden für flüssige Proben grundsätzlich folgende Geräteparameter verwendet: *g-Factor* 2,0063, *Center Field* 3353-3367 G, *Microwave Power* 2 mW, *Receiver Gain* 30 dB, *Time Constant* 10,24 ms, *Number of Averages* 6, *Sweep Time* 10,02 s, *Sweep Width* 200,0 G, *XPoints* 3000, *Modulation Amplitude* 2,0 G, *Modulation Frequency* 100 kHz.

Geräteparameter für Messungen von gefrorenen Proben

Die X-Band Messungen wurden ebenfalls mit dem Bruker EMXmicro ESR-Spektrometer bei Raumtemperatur (20-22 °C) und eingeschalteter Klimaanlage durchgeführt. Der *Dewar* wurde vor jeder Probenmessung manuell mit flüssigem N₂ gekühlt. Zur Vermeidung von Kondensation durch H₂O aus der Umgebungsluft im Resonator und am auch außen kalten *Dewar* wurde der Resonator zusätzlich mit Stickstoff begast. Bis auf den Verstärkungsfaktor (*Receiver Gain*), die Modulationamplitude (*Modulation Amplitude*) und die Auflösung des Magnetfelds (*XPoints*) entsprachen die Geräteparameter denjenigen von flüssigen Proben. Wegen des weit geringeren Signals von gefrorenen im Vergleich zu flüssigen Proben wurde ein *Receiver Gain* von 50 dB, und wegen der sehr viel größeren Linienbreite auch eine größere Modulationsamplitude von 3 G gewählt. Letztere Einstellung erzwingt wiederum eine gröbere Abstufung des durchfahrenen Magnetfelds (*XPoints* 2000). Die Änderung der Modulationsamplitude zielt auf ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis [*Signal to Noise Ratio* (SNR)], welches bei festen Proben grundsätzlich geringer ist als bei flüssigen.

Erfassung der Messqualität

Die Qualität einer Messung ist von der Qualität der Probe, den Umgebungsbedingungen und dem korrekten *Tuning* abhängig. Vor Beginn der Messung wurde separat für jede Probe der *Q*-Wert (*Q-Value*) ermittelt. Dieser Wert gibt Auskunft über die Güte des Schwingkreises, der aus Mikrowellen-Quelle und dem mit der Probe versehenen Resonator besteht. Über diesen Wert werden die pro Messung leicht differenten Umgebungsbedingungen wie z. B. Temperatur, Kondensation, leicht differente Probengeometrie oder -lage als auch die Qualität des manuellen *Tunings* erfasst. Ein niedriger *Q-Value* impliziert ein niedriges Signal/Rausch-Verhältnis, weniger reflektiertes Signal und damit eine geringere Empfindlichkeit des Messsystems.

2.6 ILU-ESR Pilotexperiment

2.6.1 Präparation der isolierten, ventilierten und perfundierten Lunge

Die Präparation der isolierten, ventilierten und blutfrei-perfundierten Mauslunge erfolgte durch Alexandra Erb. C57Bl/6J Mäuse wurden durch intraperitoneale Injektion von Ketamin (40-160 mg/kg KG) und Xylanzin (8-32 mg/kg KG) anästhesiert. Durch eine intraperitoneale Gabe von Heparin (1000 I.E./kg KG) wurde die Blutgerinnung verhindert. Mit Ausbleiben der nozizeptiven Reflexe wurden die Tiere in Rückenlage in senkrechter Position fixiert und zunächst intubiert. Dazu wurde das Fell von caudal nach cranial inzidiert und die Trachea durch das Entfernen von Muskelschlauch und Speicheldrüsen freigelegt. Danach wurde ein Tubus über einen Schnitt in die Trachea eingeführt mit einer Ligatur fixiert und an die Beatmungspumpe

angebunden. Um den Kollaps der Arteriolen während der Präparation zu verhindern, wurde die Lunge über den Tubus künstlich mit Überdruck [positiver end-expiratorischer Druck (PEEP)] von 3 cm Wassersäule mit normoxischem Gasgemisch (21 % O₂, 5,3 % CO₂, Rest N₂) ventiliert. Nach Öffnung des Abdomens wurde das Sternum fixiert, das Diaphragma geschlitzt und lateral geöffnet. Um das Herz-Lungen-Paket freizulegen, wurde der Thorax durch einen medialen Schnitt am Sternum geöffnet, die Rippen lateral eingeschnitten, aufgebogen und seitlich fixiert. Der auf dem Herz liegende Thymus und das Perikard wurden entfernt. Um die nun freiliegende Pulmonalarterie (PA) wurde eine Ligatur gelegt. Zuerst wurde der linke Ventrikel an der Herzspitze punktiert und dann der rechte Ventrikel eingeschnitten. Anschließend wurde über den rechten Ventrikel ein Katheter bis in die PA eingeführt und mit der bereits verlegten Ligatur fixiert. Um die Entstehung von Ödemen weitestgehend zu vermeiden, wurde die Lunge vorsichtig aus dem Thorax präpariert.

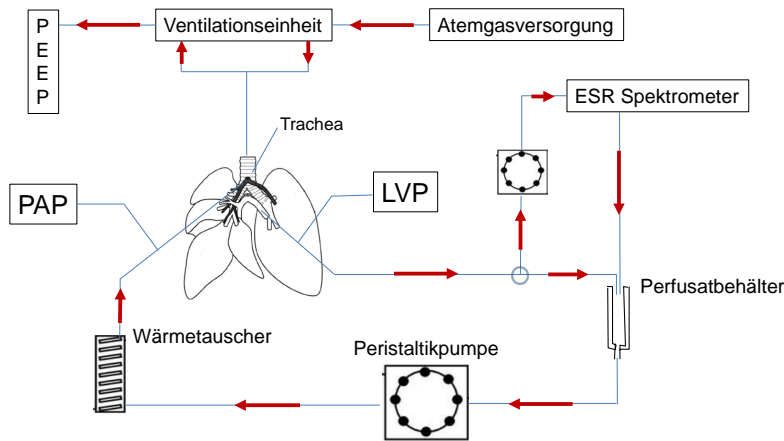
Die Lunge wurde mit 4 °C kaltem Perfusat bei geringer Durchflussrate (0,2 ml/min) gespült, während ein weiterer Katheter über die Inzision im linken Ventrikel eingeführt wurde. Anschließend wurde die Lunge mit warmen Perfusat (37 °C) bei moderaten Durchfluss blutleer gespült. Für den ILU-ESR-Versuch wurde ein Zirkulationsvolumen von 16 ml eingesetzt. Über die nächsten 20 min wurde die Ventilation, die Fließgeschwindigkeit des Perfusats und die Temperatur des Perfusatsystems langsam auf die vorab festgelegten Sollwerte gebracht. Die Fließgeschwindigkeit wurde über die Peristaltikpumpe (ISM834A V2.10, Ismatec, Glattbrugg, Schweiz) auf einen konstanten Wert von 2 ml/min eingestellt. Die PEEP-Beatmung erfolgte bei einer Atemzugsfrequenz von 90 pro Minute durch eine Beatmungspumpe (MiniVent 845, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten). Das Atemzugsvolumen im Bereich von $\approx 200 \mu\text{l}$ wurde an das Körpergewicht adaptiert (Sollwert $10 \mu\text{l/g KG}$). Nach dem Erreichen stabiler Druckwerte wurde das Experiment gestartet. Mittels der *PulmoDyn*-Software (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) wurden in Form einer hochaufgelösten Zeitreihe mit einem Abtastintervall von zwei Sekunden der Beatmungsdruck, der Linksventrikuläre Druck (LVP), der Pulmonal-arterielle Druck (PAP) sowie das Nassgewicht des Herz-Lungen Pakets aufgezeichnet (Abb. 3.43). Um den Einfluss akuter Hypoxie zu untersuchen, wurde die Mauslunge abwechselnd für 10 min mit hypoxischen (1 % O₂, 5,3 % CO₂, Rest N₂) und 15 min mit normoxischen Gasgemisch ventiliert.

2.6.2 Durchführung eines ILU-ESR-Experiments

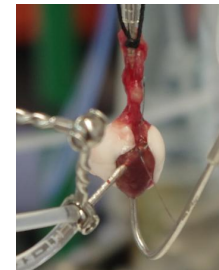
Die Durchführung der Experimente erfolgten im geschlossenen, rezirkulierenden Perfusionssystem (Abb. 2.5a). Aus einem doppelwandigen, mit Warmwasser bei 37 °C beheizten Behälter wurde das Perfusat mittels einer Peristaltikpumpe (ISM834A V2.10, Ismatec, Glattbrugg, Schweiz) gefördert und durch einen räumlich nahe der Lunge angeordneten Wärmetauscher (Herstellung Glasbläser-Werkstatt, Justus-Liebig-Universität Gießen (JLU) Gießen) zugeleitet. Von dort gelangte die Perfusionslösung in den pulmonal-arteriellen Katheter. Vor dem Übergang in die PA

wurde über einen zweiten Schlauch der PAP abgegriffen. Über die *venae pulmonales* erreichte das Perfusat den linken Ventrikel und den linksventrikulären Katheter, wo auch der LVP abgegriffen wurde. Die Drucke wurden mit Drucksensoren erfasst, mittels Instrumentenverstärker (TAM-A, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) verstärkt, über Analog/Digitalwandler (DT 9800, Data Translation, Bietigheim-Bissingen) digitalisiert und durch die *PulmoDyn*-Software während des gesamten Versuchs im Abstand von zwei Sekunden aufgezeichnet (Abb. 2.5a).

Während der größere Anteil des Perfusats bei niedrigem Druck direkt zum Perfusatbehälter (Herstellung Glasbläser-Werkstatt, JLU Gießen) geleitet wurde, wurde ein kleines Perfusatvolumen mittels eines zweiten, auf die Peristaltikpumpe (Flussrate 2ml/min) aufgesetzten Pumpschlauchs über zwei etwa 2,5 m lange Polytetrafluorethylen (PTFE)-Schläuche von 500 μm Innendurchmesser (Postnova Analytics, Landsberg) durch das im ESR-Resonator positionierte *AquaX* (Bruker BioSpin, Rheinstetten) und von dort zurück zum Perfusatbehälter gefördert.



(a) Schematischer Versuchsaufbau ILU-ESR



(b) Mauslunge und Herz mit Kathetern

Abbildung 2.5: (a) Schematischer Versuchsaufbau ILU-ESR Experiment. Die Lunge wird mittels Ventilatoreinheit über die Trachea beatmet. Zwischen Linksherzkatheter und Perfusatbehälter wurde das ESR-Spektrometer in das Perfusionssystem eingebunden. Die Pfeile zeigen die Fließrichtung des Perfusats im System an. Modifiziert nach Schäfer [228].

(b) Herz-Lungen-Paket einer isolierten, ventilerten und perfundierten Mauslunge. Das Lungengewebe erscheint weiß, das davor abgebildete Herz rot. Links im Bild ist der Pulmonalkatheter mit angeschlossenen Schläuchen und mechanischer Halterung aus verwundenen Edelstahl-drähten erkennbar. Der U-förmig gebogene Katheter rechts im Bild ist mit dem linken Ventrikel verbunden. Von oben in die Lunge führt ein mit einer schwarzen Ligatur fixierter und abgedichteter Beatmungskatheter in die Trachea. Abk.: PAP - pulmonalarterieller Druck, LVP - linksventrikulärer Druck, PEEP - positiver end-expiratorischer Druck

Die Verbindung zum ESR-Spektrometer bedingte eine Verzögerung von etwa 90 s gegenüber dem tatsächlichen Geschehen in der Lunge. Mittels der *Xenon*-Software der *ESR-Workstation* wurde über die gesamte Versuchsdauer eine Zeitreihe von Einzelspektren im Abstand von durchschnittlich 13,4 s erfasst. Die Aktivierung der automatischen Feinabstimmung vor jedem Einzelspektrum stellte dabei die Vergleichbarkeit der Empfindlichkeit (Q-Wert, Glg. 3.4) und damit auch die der Signalhöhen sicher. Ein optimierter Versuchsaufbau für eine ILU-ESR-Experiment wird anhand von Abb. 5.4 diskutiert.

2.7 Mathematische und statistische Methoden

2.7.1 Korrelationsanalysen nach Pearson, Spearman und Kendall

Mit der Korrelationsanalyse kann der Zusammenhang zwischen zwei Variablen quantifiziert und statistisch bewertet werden. Um statistische Aussagen über die Stärke des Zusammenhangs treffen zu können, wird der aus den vorliegenden Stichproben der Korrelationskoeffizient r nach Pearson berechnet. Die Werte können zwischen -1 (perfekte negative Korrelation) bis $+1$ (perfekte positive Korrelation) liegen. Ist r nahe bei 0 liegt keine Korrelation vor. Voraussetzungen ist die Annahme eines linearen Zusammenhangs und das Vorliegen einer Normalverteilung beider Variablen.

Sind die Variablen nicht normalverteilt oder besteht kein linearer Zusammenhang, können alternativ Rangkorrelationskoeffizienten ρ nach Spearman oder τ nach Kendall berechnet werden. Infolge der Rangbildung brauchen die beiden Variablen nur noch einen monotonen Anstieg aufzuweisen, linear muss er nicht mehr sein (Beispiel: $4^3 \rightarrow \text{Rang } 1$, $5^3 \rightarrow \text{Rang } 2$ usw.) [229]. Spearmans ρ nutzt die Rangdifferenz und ist deshalb nur auf Ordinalskalen anwendbar; die Ränge sollten hier also in eine Ordnung gebracht werden können, innerhalb derer ein Größenvergleich sinnvoll ist. Kendalls τ ist neben Nominalskalen auch auf intervallskalierte Datensätze anwendbar, die Bindungen aufweisen, außerdem ist diese Methode auch für sehr kleine Stichprobengrößen geeignet. Auf den gleichen Datensatz angewandt ist der Wert von τ etwas kleiner als der Wert von ρ . Bindungen oder eng. *ties* liegen oft bei gerundeten Daten vor, wenn mehr als ein Wert der einen Variable auf einen Wert der anderen Variable abgebildet wird.

2.7.2 Varianzanalyse und lineare Regression

Bis auf wenige Ausnahmen sind die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente so angelegt, dass ein direkter Vergleich zwischen einer Anzahl an Experimentalgruppen ermöglicht wird, welche sich möglichst nur in jeweils einer Eigenschaft unterscheiden. Zu diesen Eigenschaften gehört etwa der Zelltyp, der Genotyp oder auch die Behandlung. Wann immer möglich, wurde Zell- oder Gewebematerial von wenigstens fünf Versuchstieren je Gruppe eingesetzt und die Messungen selbst in Doppelbestimmungen durchgeführt.

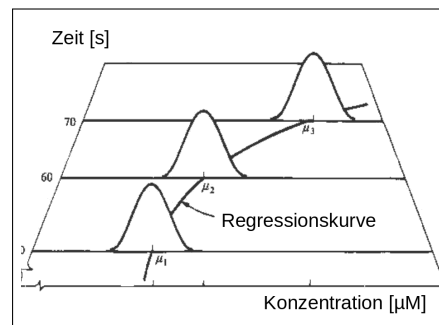
Ein balanciertes Design ist eine der Grundvoraussetzungen der traditionellen Varianzanalyse [*analysis of variance* (ANOVA)], deren Verletzung bei Präsenz von Interaktionen die Berechnung der Fehlergrenzen stark verändern kann. Eine weitere Voraussetzung sind homoskedastische (gleich große) Varianzen innerhalb aller beteiligten Versuchgruppen. Eine dritte Forderung besteht in der Normalverteilung der Residuen, d.h. in der Normalverteilung der Differenz der Messwerte zu den jeweiligen Gruppenmittelwerten (*conditional means*). Eine gern missachtete Voraussetzung besteht aber auch darin, dass Doppelbestimmungen geeignet gemittelt werden

müssen, weil sonst die Standardfehler der Gruppenmittelwerte zu klein berechnet werden. Dadurch wiederum können Gruppenunterschiede als signifikant herausgestellt werden, die es in Wirklichkeit nicht sind.

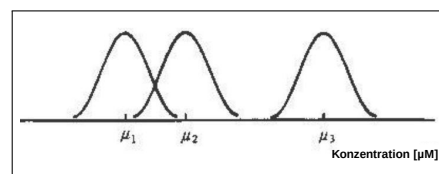
Zwischen der Varianzanalyse nach dem ANOVA-Schema und einer linearen oder nichtlinearen Regression besteht ein enger Zusammenhang (Abb. 2.6). Ein wesentlicher Unterschied zur linearen als auch zur nichtlinearen Regression besteht darin, dass die Faktorstufen einer ANOVA nominalskaliert sein können, also kein natürliches Ordnungskriterium aufweisen. Im Beispiel ist der nichtlineare Anstieg der Konzentration über die Zeit auf drei Gruppen eingedampft, und allein der mittlere Unterschied ist noch von Interesse. In der Darstellung nur angedeutet ist auch eine mit ansteigender Konzentration einhergehende heteroskedastische Verbreiterung der Verteilung der Residuen um die Gruppenmittelwerte.

Als Alternative zur veralteten *aov*-Routine in *R* wurde teils die Funktion *lmer* aus der R-Bibliothek *lme4* [231] eingesetzt, welche (analog zur SAS Prozedur *MIXED*) in der Lage ist, auch mit ungleichen Gruppengrößen umzugehen. *lmer* berechnet ein lineares Modell mit gemischten Effekten. Gemischt bedeutet hier, dass sowohl feste Effekte als auch Zufallseffekte berücksichtigt werden, wobei im Rahmen einer Varianzanalyse ein fester Effekt einem Gruppenmittelwert nebst Standardfehler entspricht und durch einen Zufallseffekt z. B. das durch die Mehrfachbestimmung und andere, unerkannte Effekte verursachte Rauschen erfasst wird, deren Mittelwert mit Null angenommen wird. Bei ausreichend hoher Probenzahl können darüber hinaus auch zufällige Effekte berücksichtigt werden, welche durch eine zeitlich schwankende Empfindlichkeit des Messsystems verursacht werden. Speziell bei ESR-Messungen gefrorener Proben kann z. B. durch eine unterschiedliche Probengeometrie, Umgebungstemperatur und Witterung (\rightarrow Kondensation im Resonator) der separat messbare Q-Wert (QValue) des Systems aus Probe und Resonator und somit die Empfindlichkeit des Spektrometers für jede Probe leicht unterschiedlich sein, was auch zu unterschiedlichen Signalhöhen führt.

Zur Nachbildung einer *one-way* (einfaktoriellen) ANOVA mittels *lmer* wurde jeweils ein *cell-means* Modell erstellt und die berechneten Gruppeneffekte mit Hilfe der Funktion *glht()* aus der *multcomp*-Bibliothek [232] entsprechend dem jeweiligen Versuchsplan untereinander verglichen. Problematisch bleibt aber auch hier eine heteroskedastische Varianzverteilung, die



(a) Nichtlineare Regression



(b) ANOVA

Abbildung 2.6: ANOVA als verkürzte Projektion einer Regressionsanalyse. Wie hier leicht zu ersehen, ist die ANOVA eine verkürzte Projektion einer Regressionsanalyse, die in diesem Beispiel auch die Komplikation (oder Chance) eines nicht linearen Zusammenhangs zwischen der Konzentration und der Zeit übersehen kann, einfach weil sie sich nur für Gruppenunterschiede interessiert. Modifiziert nach Olbrich [230].

sich erfahrungsgemäß bereits bemerkbar macht, sobald sich die Gruppenmittelwerte etwa um einen Faktor von drei unterscheiden.

Beispiel

Ein *cell-means* Modell kann in einer Zeile abgehandelt werden:

```
fm <- lme4::lmer(Amplitude ~ Genotype:Treatment -1
                + (1|Genotype:Treatment:AnimalID)
                + (1|QValue), data = df)
```

Hierbei steht die Interaktion der Faktoren *Treatment* und *Genotype* für die Behandlungsgruppen und Genotypen der Versuchstiere. Der Term (1|Genotype:Treatment:AnimalID) beschreibt als Zufallseffekt den individuellen Einfluss der Versuchstiere, was im Ergebnis dazu führt, dass über Doppelbestimmungen je Versuchstier gemittelt wird. Der Zufallseffekt (1|QValue) könnte die oben angesprochene schwankende Güte adressieren. Der formale Term -1 unterdrückt die Ausgabe des *Intercepts* (Schnittpunkt mit der Ordinate), da ansonsten die erste Faktorstufen diese Rolle übernehmen und der Rest als Differenz zum *Intercept* berechnet würde. Das kann im Kontext aber sinnvoll sein, wenn diese Faktorstufe eine Kontrollgruppe repräsentiert. Mit `data = df` wird mit *df* ein sogenanntes *data frame* übergeben, welches eine $m \times n$ Matrix darstellt. Darin entspricht jede Zeile einem Datenpunkt, während die Spalten den Messwert als auch damit verbundene Informationen angeben; in diesem Fall also die gemessene Amplitude, den Genotyp des Versuchstieres, dessen Behandlung (*Treatment*), die das Versuchstier identifizierende Bezeichnung *AnimalID* und den Wert des Q-Wertes.

Die Ausgabe ist das hier in einer *fm* benannten Variable gespeicherte Modell, das einerseits zur Darstellung der Gruppeneffekte nebst deren Fehlergrenzen verwendet werden kann und andererseits zwecks Berechnung von Gruppendifferenzen zusammen mit einer Liste der geplanten Null-Hypothesen (H_0) an die Funktion *glht()* übergeben wird:

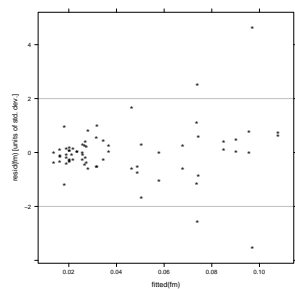
```
H0 <- c('GenotypeWT:TreatmentHypoxia - GenotypeWT:TreatmentNormoxia = 0'
        , 'GenotypeAOX:TreatmentHypoxia - GenotypeAOX:TreatmentNormoxia = 0')
gm <- multcomp::glht(fm, linfct=H0)
su <- multcomp::summary(gm, adjust='bonferroni')
```

Das oben in der Variablen *gm* gespeicherte Ergebnis des Gruppenvergleichs würde neben den jeweiligen Fehlergrenzen die Unterschiede der Gruppenmittelwerte zwischen Hypoxie- und Normoxiebehandlung innerhalb der Gruppe der Wildtyp-Tiere und außerdem den Unterschied innerhalb der Gruppe der AOX-transgenen Tiere zwischen Hypoxie und Normoxie enthalten. Das Ergebnis der *glht*-Methode kann über die *summary*-Methode des in der Variablen *gm* gespeicherten Objekts für die Anzahl der Vergleiche z. B. nach Bonferroni korrigiert werden. Deren hier *su* benanntes Ergebnis wiederum kann dann als Grundlage der graphischen Darstellung

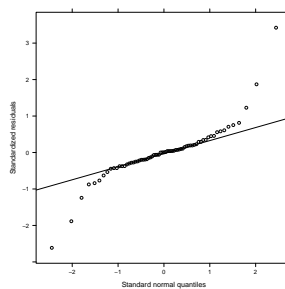
der Größe der Gruppendifferenzen nebst deren Standardfehler, Vertrauensintervalle und Signifikanzniveaus eingesetzt werden. Im einfachen Fall der linearen Beziehung von nicht korrelierten Effekten würde $glht$ den Standardfehler der Gruppendifferenzen aus den Standardfehlern der in die Differenz eingehenden Effekte als Wurzel aus der Summe der Fehlerquadrate nach Gauß berechnen: $E_{diff} = \sqrt{\sum_{i=1}^n e_i^2}$.

2.7.3 Varianzhomogenität und Normalverteilung der Residuen

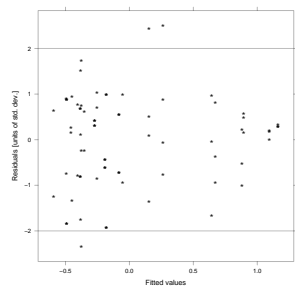
Wie bereits erwähnt, basiert sowohl eine ANOVA als auch eine traditionelle lineare Regression auf der Annahme von normalverteilten Residuen. Diese Voraussetzung ist aber oft nicht erfüllt. Teilweise ist dies bedingt durch einen unerkannten oder nicht ausreichend berücksichtigten Einflussfaktor, einen für die Anzahl der Fragestellungen eigentlich zu kleinen Datensatz oder durch eine mit dem Gruppenmittelwert ansteigende, heteroskedastische Verteilung der Varianzen, die sich praktisch bereits bemerkbar macht, sobald sich die Messwerte um einen Faktor von drei voneinander unterscheiden. Eine aussagekräftige Prüfung auf normalverteilte Residuen besteht in der Darstellung der Residuen des Modells in einem sogenannten Quantile-Quantile-Plot (QQ-Plot); Abb. 2.7 zeigt Beispiele.



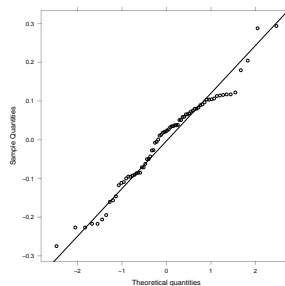
(a) Heteroskedastische Varianzverteilung



(b) QQ-Plot nicht normalverteilter Residuen.



(c) Homoskedastische Varianzverteilung



(d) QQ-Plot näherungsweise normalverteilter Residuen

Abbildung 2.7: Homoskedastisch, heteroskedastisch und normalverteilte Residuen (a) Darstellung der standardisierten Residuen gegen die gefitteten Werte. Das Diagramm zeigt ein erkennbar sich nach rechts öffnendes Keilmuster, welches darauf hinweist, dass eine heteroskedastische Varianzverteilung vorliegt (umso größer die gefitteten Werte umso größer auch die Residuen). (b) Bei exakt normalverteilten Residuen sollten sich alle Residuen genau auf der eingezeichneten Geraden befinden. Hier jedoch liegen ca. 1/3 der Datenpunkte weit ab. In diesem Fall war es auf eine fehlerhafte Zuordnung der Proteinbestimmung zurückzuführen und entsprechend einfach zu korrigieren. (c) Unregelmäßige verteilte Residuen bei homoskedastischer Varianzverteilung. (d) Näherungsweise normalverteilte Residuen. **x-Achse:** Fitted values, **y-Achse:** Residuals [units of std. dev.] Abk.: QQ-Plot - Quantile-Quantile-Plot

2.7.4 Linearisierende Transformationen

Manchmal liegen sehr breite und schiefe Verteilungen der Messwerte vor, deren Residuen unter einer linearen Regression keiner Normalverteilung folgen. In solchen Fällen kann versucht werden, anstatt der Messgröße ihren Logarithmus einzusetzen, um eine symmetrische Verteilung der Messgröße zu erreichen. Logarithmierung kontrahiert Bereiche mit großen Werten und expandiert Wertebereiche zwischen 0 und 1. Die durch Logarithmierung erhaltene log-Normalverteilung stellt dann eine Normalverteilung der Logarithmen der Messgröße $\log(x)$ dar. Sie ist ebenfalls durch die zwei Parameter Mittelwert ($\mu_{\log(x)}$) und Streuung ($\sigma_{\log(x)}$) gekennzeichnet. Damit wird anstelle eines arithmetischen Mittelwerts ein *geometrischer* Mittelwert berechnet, was einem auf der Log-Skala berechneten arithmetischen Mittelwert entspricht: $\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \log(Y_i)$.

Eine nicht-normale Verteilung der Residuen ist nicht das einzige statistische Problem. Da *Spin probes* wie CMH nicht allein mit $O_2^{\bullet-}$ reagieren, wird zusätzlich zur Messung in Anwesenheit von CMH jede Probe auch in Anwesenheit von SOD oder pSOD gemessen. Die Differenz der beiden Werte ist dann ein Maß für die $O_2^{\bullet-}$ -Konzentration. Der zusätzliche Arbeitsschritt bedingt eine zusätzliche Messunsicherheit, z. B. durch Pipettierfehler, was bei Bildung der Differenz aus den *Peak-to-Peak* (P2P)-Amplituden manchmal zu gering negativen Werten führen kann, woran log-Transformation scheitert. Bei einem negativ unendlichen Wert von $\log(0)$ ist es auch keine gute Idee, diese Werte einfach auf 0 zu setzen, und ein ähnliches Argument gilt für Werte nahe 0. Wenn Versuchsgruppen schwach besetzt sind, können negative Werte nicht einfach ausgelassen werden. In solchen Fällen kann versucht werden, die Messreihe nach rechts zu verschieben, in dem zu allen Messwerten eine Zahl λ_2 addiert wird, deren Wert anhand der Ergebnisse der in der R-Bibliothek MASS [233] enthaltenen Funktion *boxcox* iterativ so bemessen werden kann, dass der Parameter λ_1 einer sonst auszuführenden Box-Cox Transformation [234] (Glg. 2.2) wie in Abb. 2.8 nahe bei Null zu liegen kommt.

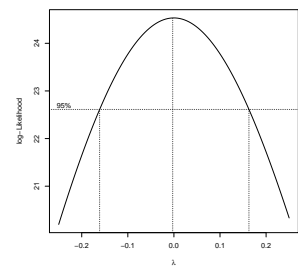


Abbildung 2.8: Ermittlung der Lage des λ_1 -Parameters anhand der R-Funktion `MASS::boxcox`.

$$y(\lambda_1, \lambda_2) = \begin{cases} \frac{(y+\lambda_2)^{\lambda_1}-1}{\lambda_1} & \text{wenn } \lambda_1 \neq 0 \\ \log(y + \lambda_2) & \text{wenn } \lambda_1 = 0 \end{cases} \quad (2.2)$$

Eine mit $\lambda_1 = 0$ ausgeführte Box-Cox Transformation ist aber eine log-Transformation, gleich zu welcher Basis. Da der dekadische Logarithmus leichter nachvollziehbar ist, kann anschließend nach folgender Anweisung transformiert werden

$$z = f(x) = \log_{10}(x + \lambda_2) \quad (\text{Vorwärtstransformation}) \quad (2.3)$$

$$x = g(z) = 10^z - \lambda_2 \quad (\text{Rückwärtstransformation}) \quad (2.4)$$

Die Rückwärtstransformation betrifft nicht die Berechnung der Gruppenunterschiede und Signifikanztests, sondern wird allein zur graphischen Darstellung der Gruppenmittelwerte und der zugehörigen Standardfehler durchgeführt. Hierbei wird der zurücktransformierte Standardfehler aus $g(z + \sigma_z) - g(z)$ berechnet, wobei z und σ_z den vom Modell ausgegebenen Gruppenmittelwert und Standardfehler auf der transformierten Skala sein sollen. Die der Darstellung von Gruppendifferenzen zugrundeliegenden, von der Funktion `multcomp::glht()` zurückgegeben Werte lassen sich hingegen nicht zurücktransformieren, da es sich um eine Addition von mindestens zwei logarithmierten Größen handelt, deren Fehlergrenzen innerhalb der `glht()` Routine nach Gauß quadratisch addiert wurden. Ihre Darstellung als Effektdiagramm kann daher nur auf einer logarithmischen Skala erfolgen.

2.7.5 Generalisierte lineare Modelle

Eine Alternative zur klassischen linearen Regression und der dort aus den oben angesprochenen Gründen manchmal erforderlichen erscheinenden Transformation der Messwerte bilden generalisierte lineare Modelle (*generalized linear model* (glm)), bei denen die Bedingung von normalverteilten Residuen aufgehoben wird und u. a. einer Binomial-, Poisson-, Gamma- oder einer inversen Gaußverteilung entsprechen kann. Im Gegensatz zur traditionellen linearen Regression, die eine homoskedastische Verteilung der Varianzen annimmt, kann bei Gamma-Modellen die Varianz der Residuen exponentiell anwachsen, was bei chemometrische Daten häufig der Fall ist, wenn der überstrichene Wertebereich groß ist. Weil sie eigentlich keine Messwerte kleiner oder gleich 0 enthalten können, sind chemometrische Daten rechtsschief und damit prinzipiell nicht normalverteilt, obwohl eine Normalverteilung passen kann, wenn der Median weit genug rechts von 0 zu liegen kommt. Gamma-Modelle werden meist mit einer logarithmischen Linkfunktion verwendet. Sie können aber auch mit der Linkfunktion *identity* verwendet werden, womit die Prädiktoren *arithmetische* Mittelwerte repräsentieren. Innerhalb der R-Umgebung sind wenigstens zwei Implementierungen verfügbar: `glmer` aus dem R-Paket `lme4` [231], welches generalisierte, gemischt-lineare Modelle implementiert, und `glm` aus dem Basispaket `stats`, welches gegenüber `glmer` den Vorzug hat, dass es fast immer konvergiert, aber keine Zufallseffekte unterstützt. Die Berechnung der Effekte kann auch für diese beiden Spielarten mittels `multcomp::glht` vorgenommen werden.

2.7.6 Nichtlineare Regression

Methoden der nichtlinearen Regression sind prinzipiell in der Lage, die beobachteten Daten als nichtlineare Funktion einer Kombination eines oder mehrerer Prädiktoren zu erklären, was im Effekt bedeutet, dass eine beliebig gekrümmte Kurve so an die Daten angepasst werden kann, dass alle Datenpunkte minimale Abstände von dieser Kurve haben.

Weil dieser Ansatz auf die Lösung einer Differentialgleichung hinausläuft, sind für die Prädiktoren Startwerte anzugeben, die es dem Gleichungslöser ermöglichen, die Prädiktoren iterativ ihren wahren Werten anzunähern, ohne dass unendliche oder undefinierte Ausdrücke wie $0/0$ auftreten, die zum Abbruch der Berechnung führen, oder das Modell entweder überhaupt nicht oder erst nach sehr langer Rechenzeit konvergiert. Aus diesem Grund sind im *R* Paket *stats* als Teil der Grundausstattung jeder *R*-Umgebung eine Anzahl selbststartender Modelle definiert, welche die erforderlichen Startwerte in einer Hilfsfunktion berechnen. Eines davon beschreibt eine zunächst exponentiell ansteigende Kurve, die im späteren Verlauf horizontal gegen einen Grenzwert strebt und unter dem Namen *SSasymptOff* angesprochen werden kann [235]. Es hat folgende Form:

$$y(x) = \varphi_1 [1 - e^{-e^{\varphi_2}(x-\varphi_3)}] \quad (2.5)$$

wobei $y(x)$ die z. B. zu den Zeitpunkten x gemessenen Rohwerte darstellt und φ_1 die Lage der Asymptote bei $x \rightarrow \infty$ repräsentiert.

φ_2 steht für den natürlichen Logarithmus einer Geschwindigkeitskonstante, die in Beziehung zur Halbwertszeit $t_{0,5} = \frac{\ln 2}{e^{\varphi_2}}$ steht. φ_3 entspricht dem Zeitpunkt, zu dem $y = 0$ ist. Der typische Verlauf dieser Funktion und die Lage der Parameter sind in Abb. 2.9 zusammengefasst. Eine von mehreren Methoden zur Anpassung der Koeffizienten $\varphi_{1...3}$ an eine zur Grundform wenigstens ungefähr passenden Zeitreihe besteht in der Verwendung der *nonlinear least square (nls)*-Funktion. Ein Aufruf von *nls* mit zu den Zeitpunkten t gemessenen Konzentrationen C könnte so aussehen:

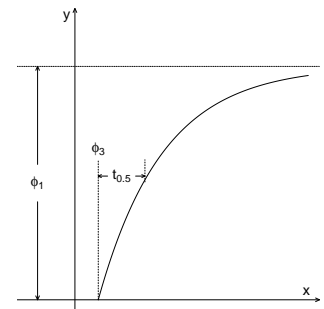


Abbildung 2.9: *SSasymptOff*-Parameter: φ_1 (oder *Asym*): Lage der horizontalen Asymptote bei $x \rightarrow \infty$, φ_3 (oder *c0*): (Zeit-)punkt, zu dem $y = 0$ ist. Pinheiro und Bates [235, S. 513]

```
fm <- stats::nls(C ~ SSasymptOff(t, phi1, phi2, phi3), data=df)
```

wobei mit *df* ein sogenanntes *data frame* übergeben wird, welches ähnlich einem Tabellenblatt für jeden Zeitschritt eine Zeile enthält und die Spalten C und t aufweist. Der oben *fm* benannten Ergebnisvariablen wird nach erfolgreichem Ablauf ein an den Konzentrationsverlauf über die Zeit angepasstes Modell zugewiesen, welches einen modellierten Wert für jeden gemessenen Konzentrationswert enthält. Aus dieser Variablen lassen sich über den Aufruf *fitted(fm)* die modellierten Werte, und mittels *residuals(fm)* die Residuen extrahieren. Letzteres resultiert in einem Vektor, der im Beispiel für jeden Zeitschritt die Differenz zwischen den modellierten Werten und den tatsächlich gemessenen Werten bereitstellt. Er enthält Information darüber, was das „gefittete“ Modell gerade nicht erklärt. Wenn C also ein Vektor der gemessenen Konzentrationen ist und *fm* das gefittete Modell, dann gilt $C == fitted(fm) + residuals(fm)$ – was im Kontext als Vektoroperation, als elementweise Addition bzw. Vergleich zu lesen ist.

2.7.7 Kinetik erster Ordnung

In der Pharmakokinetik folgt die Elimination eines Wirkstoffes oder dessen Metaboliten aus dem Blutplasma dann einer Kinetik erster Ordnung, wenn die pro Zeiteinheit entfernte Substanzkonzentration proportional zur aktuell bestehenden Substanzkonzentration $C(t)$ im Blut ist:

$$\frac{dC(t)}{dt} = -k_e \cdot C(t) \quad (2.6)$$

mit der Geschwindigkeitskonstanten k_e für eine Konzentrationsänderung. Die Integration von Glg. 2.6 liefert die Konzentration $C(t)$ zu jedem Zeitpunkt t :

$$C(t) = C(0) \cdot e^{-k_e t} \quad (2.7)$$

wobei $C(0)$ die durch die infundierte Wirkstoffmenge und das Plasmavolumen festgelegte Anfangskonzentration sein soll. Damit kann z. B. der zeitliche Verlauf nach Verabreichung einer intravenösen Kurzinfusion berechnet werden, von der etwas vereinfachend angenommen wird, dass die dadurch verabreichte Substanzmenge in vernachlässigbar kurzer Zeit gleichmäßig im zirkulierenden Blutvolumen verteilt wird [236]. Für ein Modell erster Ordnung lässt sich k_e durch die Beziehung

$$T_{e_{\frac{1}{2}}} = \ln 2 / k_e \quad (2.8)$$

in eine Halbwertszeit $T_{e_{\frac{1}{2}}}$ umrechnen, womit k_e die Einheit $1/s$ hat.

2.7.8 Anpassung von Dichtefunktionen an empirische Verteilung

Im Kontext der Erstellung von Referenzbereichen, die z. B. Gesunde von Erkrankten unterscheiden sollen, wird anhand der lokal archivierten Labordaten die Dichtefunktion einer theoretischen Verteilung an diese angepasst und auf dieser Basis anschließend nebst Modus und Median die 0,0025 und 0,0975 Quantile berechnet. Konkret wurde im Rahmen der klinischen Studie (Abs. 4) versucht, anhand der auf ein Intervall zwischen 0 und 1 skalierten prozentualen Anteile der BALF-Leukozytenfraktionen die Dichtefunktion einer Beta-Verteilung anzupassen. Dies kann z. B. mittels der Funktion *fitdistr* aus *R*-Paket *MASS* [233] vorgenommen werden. Die Schwierigkeit der Anpassung einer Beta-Verteilung an die Leukozyten-Subpopulationen liegt vor allem darin begründet, dass die empirischen Verteilungen entweder nach rechts (Makrophagen) oder nach links geneigt sind (Neutrophile, Lymphozyten) oder sehr selten vorkommen (Eosinophile).

Allerdings war es mit Hilfe der im Anhang (Abs. C.1) dokumentierten, aus einer informellen Veröffentlichung [237] des *Frontier*-Projekts [238] abgeleiteten *R*-Funktionen immerhin

möglich, zumindest an den Anteil der Makrophagen eine theoretische Dichtefunktion anzupassen. Obwohl sich diese Dichtefunktion der hier so genannte *rskewed*-Verteilung ausweislich der QQ-Plots auch mit gutem Erfolg verwenden lässt, das Komplement (also den zu 100 % fehlenden Teil) der Neutrophilen und Lymphozyten zu *fit*ten, ist eine getrennte Modellierung der Dichtefunktionen für einzelne Subpopulationen der Leukozyten und Lymphozyten insgesamt fragwürdig, weil sie teils eng mit einander korreliert sind.

Eine Alternative zur Anpassung einer theoretischen Dichtefunktion besteht im wiederholten Ziehen von zufälligen Stichproben aus den vorliegenden Daten als grundlegende Technik einer Klasse von statistischen Methoden, die unter dem Oberbegriff *Bootstrapping* zusammengefasst werden. Eine solche Methode ist im R-Paket *bayesboot* verfügbar [239].

2.7.9 Modifizierte Doppelintegration eines Nitroxidspektrums

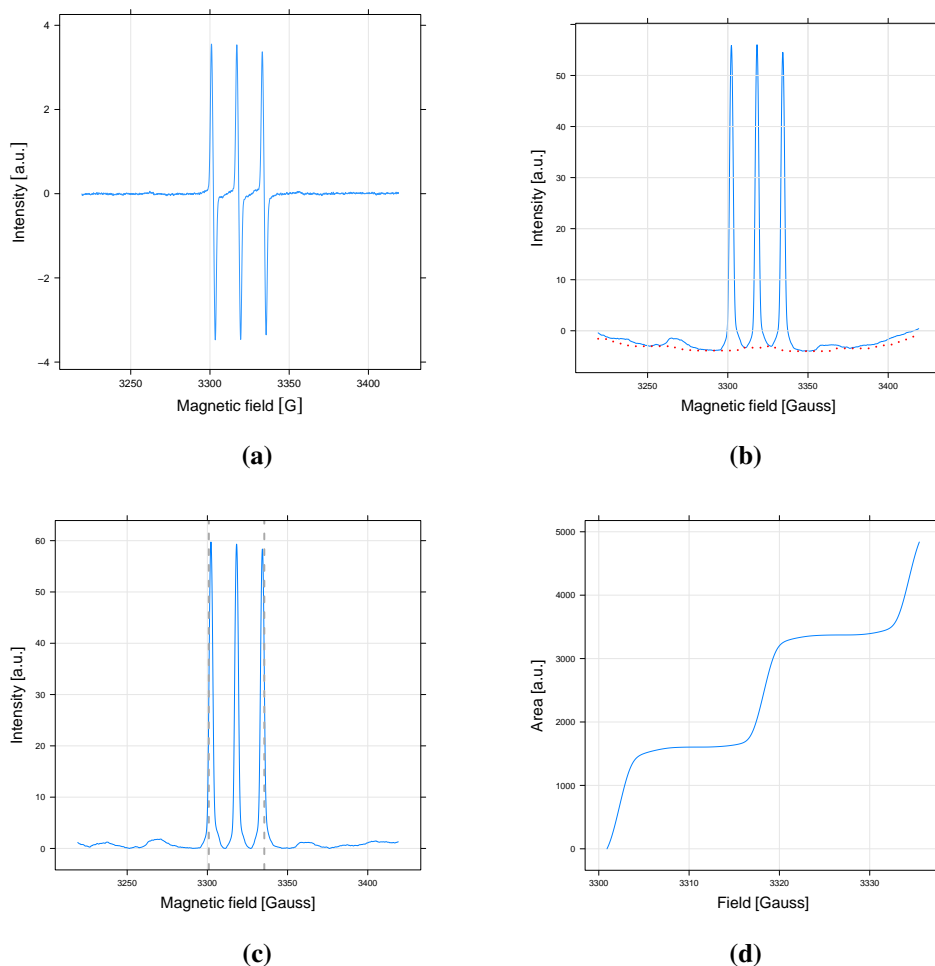


Abbildung 2.10: Zur Verringerung der O_2 -Abhängigkeit modifizierte Doppelintegrationsmethode eines flüssig gemessenen Nitroxidspektrums. (a) Differenzspektrum nach Basislinienkorrektur (b) Aus Differenzspektrum per numerischer Integration erhaltenes Absorptionsspektrum inklusive des rot eingezeichneten fortlaufenden Minimums über ca. 10% der Datenpunkte. Die durch O_2 bedingte Linienverbreiterung drückt sich u. a. darin aus, dass die Minima zwischen den Linien weit entfernt von Null zu liegen kommen. (c) Absorptionsspektrum nach Abzug des fortlaufenden Minimums (d) Zweite Integration mit zwischen den Absorptionlinien nur noch gering ansteigendem (idealerweise horizontalem) Verlauf.

ESR-Spektren flüssig gemessener Proben sind stark von der O₂-Konzentration in der Probe abhängig, woran die nicht horizontal verlaufenden Signalanteile außerhalb und zwischen den Linien des Differenzspektrums (Abb. 2.10a) erheblichen Anteil haben. Die nachfolgend beschriebene Herangehensweise ist hinsichtlich der Dämpfung des O₂-bedingten Signalanteils etwa um den Faktor zwei besser als die *SpinFit*-Methode (Abs. 3.2.2.3). Nach Basislinienkorrektur durch ein lineares Modell wird das Differenzspektrum mittels der *R*-Funktion *stats::diffinv* [240] zunächst einmal integriert. An das so erhaltene Absorptionsspektrum (Abb. 2.10b) wird mittels der *R*-Funktion *caTools::runmin* [241] ein fortlaufendes Minimum über ca. 10 % der Datenpunkte angepasst (rot gestrichelte Kurve) und die um diese Werte verminderten Intensitäten des Absorptionsspektrums (Abb. 2.10c) in den Grenzen der beiden äußeren Linien (senkrechte, grau gestrichelte Linien) ein zweites Mal integriert. Das Maximum dieses Integrals ergibt auch hier ein Flächenmaß für die Spinkonzentration, welches gegenüber der regelrecht ausgeführten Doppelintegration um die Fläche zwischen den Minima des Absorptionsspektrums und der Basislinie vermindert ist (Abb. 2.10d).

2.7.10 Sensitivität und Spezifität (ROC und AUC)

Diagnostische Tests werden in Klinik und Pharmakologie anhand deren Sensitivität und Spezifität beurteilt. Die Sensitivität oder Richtig-positive-Rate [*true positive fraction* (TPF)] bezeichnet den Anteil der Test-positiven Personen unter allen Erkrankten einer Stichprobe, und somit die Wahrscheinlichkeit, dass ein diagnostischer Test die tatsächlich Erkrankten richtig als krank erkennt.

		Goldstandard	
		Nicht Erkrankt	Erkrankt
Testergebnis	Negativ	a (TN)	c (FN)
	Positiv	b (FP)	d (TP)
	Gesamt	$n_1 = a+b$	$n_2 = c+d$

Tabelle 2.6: Häufigkeiten für n_1 Patienten ohne Erkrankung und n_2 Patienten mit Erkrankung nach [242]. TP: true positive, FP: false positive, TN: true negative, FN: false negative

Die Spezifität oder Richtig-negative-Rate [*true negative fraction* (TNF)] beschreibt den Anteil der Test-negativen Personen unter allen Nichterkrankten einer Stichprobe, und folglich die Wahrscheinlichkeit, dass Nichterkrankte im Kontext korrekt als gesund zu identifizieren [243]. Eine hohe Sensitivität wird angestrebt, wenn eine Erkrankung mit hoher Sicherheit ausgeschlossen, eine hohe Spezifität hingegen, wenn eine Erkrankung mit großer Sicherheit bestätigt werden soll [243]. Im Beispiel

der Erkennung einer Abstoßungsreaktion eines Transplantats würde eine aufgrund einer zu geringen Sensitivität nicht erkannte Abstoßung zu einer verzögerten oder falschen Behandlung und möglicherweise zum Tod des Patienten führen. Im Fall einer zu geringen Spezifität würde es lediglich eine unnötig durchgeführte Bronchoskopie bedeuten. Zur Darstellung dieser Größen wird oft eine Kontingenztabelle (oder Konfusionsmatrix) verwendet, die für ein dichotomes Testergebnis wie Tab. 2.6 strukturiert ist [242]. Die Rate der richtig Positiven kann darin als $d/(c+d)$ berechnet werden; die Rate der richtig Negativen ist $a/(a+b)$.

ROC-Kurven sind graphische Darstellungen der Rate der richtig positiven Einstufungen (Sensitivität) in Abhängigkeit von der Rate der falsch positiven (Spezifität). Die Fläche zwischen Diagonale und Kurve (AUC, Abb. 2.11b) kann zum Vergleich der Aussagekraft zweier diagnostischer Tests verwendet werden.

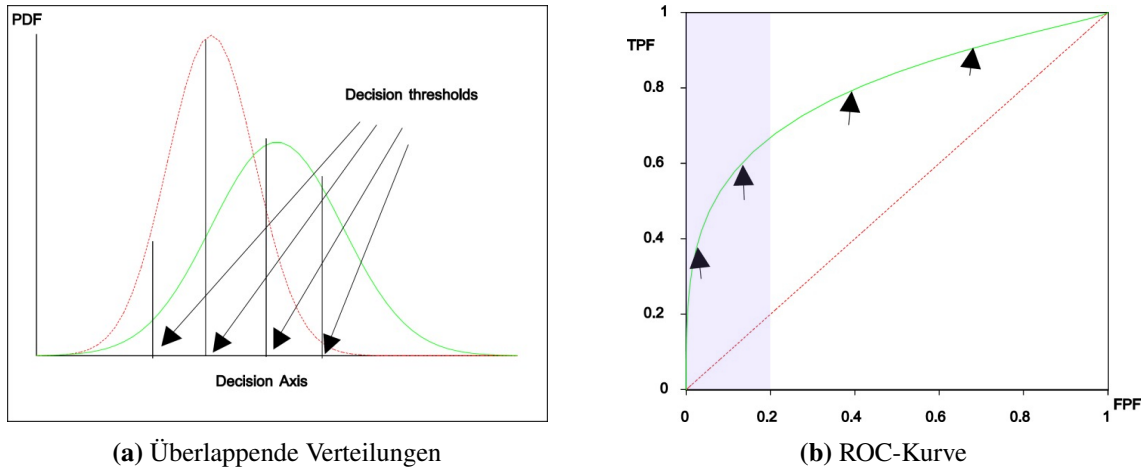


Abbildung 2.11: Prinzip der ROC-Analyse. (a) Zwei überlappende Verteilungen (Wahrscheinlichkeitsdichten eines binomialen Modells) für nicht Erkrankte (linke Kurve, rot) und Erkrankte (rechte Kurve, grün) sowie vier willkürlich gewählte Schwellwerte (decision thresholds oder cut-offs). Auf der hier als Entscheidungsachse bezeichneten Abszisse würden die unterschiedlich dicht zu liegen kommenden Messwerte des Kandidaten-Tests aufgetragen. (b) Aus den beiden sich hier weit überdeckenden Verteilungen ermittelte ROC-Kurve. Der Bereich zwischen der grünen Kurve und der roten Linie ist die AUC. Die Pfeilspitzen kennzeichnen die in (a) eingezeichneten Schwellwerte. Blau hinterlegt ist ein Bereich, in dem (abhängig vom Anwendungsfall) die Spezifität als akzeptabel angesehen werden könnte. Modifiziert nach Hajian [242]. Decision axis - Entscheidungsachse, Decision thresholds - Entscheidungsschwellen. PDF - probability density function (Wahrscheinlichkeitsdichte), TPF - true positive fraction (Sensitivität), FPF - false positive fraction (1-Spezifität)

Üblicherweise werden die Ergebnisse einer als „Goldstandard“ vollständig korrekt angenommenen Referenzmethode mit den Resultaten der konkurrierenden verglichen. Im Idealfall erreicht die AUC den Wert eins, was bedeuten würde, dass jedes einzelne Ergebnis mit dem des Vergleichstests übereinstimmt. Ein solches Ergebnis könnte dann auftreten, wenn sich (anders als in Abb. 2.11a) die Verteilungen der Wahrscheinlichkeitsdichte für den positiven und negativen Fall nicht überdecken würden. Die Fläche ist 0,5, wenn Übereinstimmungen nur zufallsbedingt auftreten. Sie kann auch kleiner als 0,5 werden, wenn der jeweilige Testkandidat hinreichend konsequent das Gegenteil des „Goldstandards“ vorhersagt. Gewöhnlich bedeutet dies, dass einer der Datensätze logisch invertiert vorliegt.

Der ROC-Algorithmus berechnet die Kurve, indem jeder einzelne vom Kandidaten-Test ausgegebene Messwert als Schwellwert S angenommen und für jedes S sowohl die Richtig-positive-Rate als auch die Falsch-positive-Rate nach Glg. 2.9 und 2.10 berechnet wird. Dabei soll $f_p(x)$ die Wahrscheinlichkeitsdichte der gemäß „Goldstandard“ an der Stelle x als positiv, und $f_n(x)$ die Wahrscheinlichkeitsdichte der als negativ eingestuft Fälle sein. Ein so für jeden Schwellwert S aus TPF(S) und FPF(S) erhaltenes Wertepaar entspricht einem einzelnen Punkt der ROC-Kurve.

$$TPF(S) = \int_{x=S}^{\infty} f_p(x) dx \quad (2.9)$$

$$FPF(S) = \int_{x=S}^{\infty} f_n(x) dx \quad (2.10)$$

Im klinischen Kontext bedeutsam sind ROC-Kurven jedoch nur innerhalb eines schmalen Ausschnitts, der sich auf der Abszisse von einer Spezifität von 1 ($\rightarrow FPF = 0$) bis zu einer als gerade noch tolerierbar angesehenen Rate an falsch positiven Ergebnissen erstreckt. Lediglich zur Verdeutlichung dieses Gedankens wurde in Abb. 2.11b dieser Bereich für eine als tolerierbar angenommene Falsch-positive-Rate [*false positive fraction* (FPF)] von 0,2 blau hinterlegt. In diesem Bereich sollte ein praktisch bedeutsamer Test bessere Ergebnisse erbringen als eine durch Kenntnis der Prävalenz geführte ärztliche Intuition („Häufiges ist häufig, Seltenes selten!“), die eben nicht leicht zu übertreffen ist, wenn die Prävalenz einer Erkrankung sehr gering oder sehr hoch ist.

2.7.11 Klassifizierung anhand eines Entscheidungsbaums

Der Entscheidungsbaum wird mittels C5.0 Algorithmus [244], einem Verfahren des maschinellen Lernens, automatisch aus gesammelten Erfahrungswerten abgeleitet. Der Parameter, anhand welchem eine bestmögliche Diagnose einer schweren akuten Abstoßungsreaktion (AR) getroffen werden kann, bildet hierbei den Wurzelknoten des Entscheidungsbaums. Je geringer die Aussagekraft eines Parameters hinsichtlich einer schweren AR ist, umso größer ist der Abstand zum Wurzelknoten.

Kapitel 3

Nachweis von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies

3.1 Einleitung

Es existieren nur wenige endogen stabile ROS und RNS. Dazu gehören Semiubiquinon (QH[•]), das Tocopheryl-Radikal (Toc[•]), das Ascorbylradikal (Asc[•]), die 3,4-Dihydroxycimtsäure (Kaffeensäure), Melanin sowie Phenoxyradikale sterisch gehinderter Phenole, wie sie bei sekundären Pflanzenstoffen (z. B. Flavanoide, Pflanzenpigmente) vorkommen [154, 245–248]. Die meisten biologisch relevanten reaktiven Spezies weisen hingegen, aufgrund der hoher Reaktivität und zahlreicher zellulärer Mechanismen ROS/RNS zu entfernen, eine Halbwertszeit von Nanosekunden bis wenigen Sekunden auf. Darauf beruhend kommen diese *in vivo* lediglich in picomolaren oder geringen nanomolaren Konzentrationen vor. Aufgrund der zusätzlich hohen Diversität und subzellulären Lokalisation ist der spezifische Nachweis von ROS/RNS schwierig. Deswegen sind Sonden erforderlich, die möglichst nahe an der ROS/RNS-Quelle akkumulieren, sehr schnell mit reaktiven Spezies reagieren, um u. a. mit Antioxidantien konkurrieren zu können und stabile Produkte bilden, welche quantifiziert werden können [225].

Die Anforderungen an eine geeignete Nachweismethode sind zum einen eine hohe Sensitivität, d.h. die Fähigkeit, sehr kleine Quantitäten zu detektieren und zum anderen eine hohe Selektivität, um zwischen verschiedenen ROS und RNS unterscheiden oder räumlich auflösen zu können. Für eine sensitive Detektion ist auch ein hoher Kontrast zwischen dem eigentlichen Signal und dem unerwünschten Rauschen (SNR) erforderlich. Außerdem sollten Artefakte wie beim sogenannten *Redox cycling* ausgeschlossen werden; z. B. bilden in Gegenwart von O₂^{•-} gebildete Radikale der Chemilumineszenzsonde Lucigenin in Gegenwart von O₂ zusätzliches O₂^{•-}, was die Messung verzerrt [249]. Zu den geläufigsten Methoden zählen: Chemolumineszenz, Fluoreszenzspektroskopie, der Nachweis spezifischer Oxidationsprodukte mittels mit *high-performance liquid chromatography* (HPLC) und der Nachweis von reduziertem Cytochrom c

bei 550 nm [23, 220, 224]. Als „state of the art“ gilt derzeit die ESR-Spektroskopie [248–250].

3.1.1 Grundprinzipien der ESR-Spektroskopie

Elektronen-Spin-Resonanz (ESR) Spektroskopie ist eine Methode, um paramagnetische Substanzen zu quantifizieren oder deren Struktur aufzuklären. Paramagnetisch sind solche Stoffe, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen aufweisen. Dazu zählen freie organische Radikale, Übergangsmetallionen in Metalloenzymen (z. B. Häm) und Proteinen mit radikalischen Kofaktoren (z. B. QH^\bullet) oder Materialien mit Fehlstellen im Kristallgitter [251]. Aber auch Materialien diamagnetischer Systeme (d. h. ohne unpaare Elektronen), wie Lipiddoppelschichten oder Proteine, können durch Einschleusen paramagnetische Reportergruppen mittels ESR untersucht werden [252–254]. Dies wird u. a. dadurch erzielt, indem diamagnetische Metallionen durch paramagnetische Spezies ersetzt oder sogenannte *side specific Spin labels* (Abs. 3.1.6) eingeführt werden. Durch diese Technik kann die Fluidität, Viskosität, Polarität und die molekulare Struktur der unmittelbaren Umgebung des ungepaarten Elektrons sowie die Molekularbewegung aufgeklärt werden [254].

Das grundlegende Prinzip der ESR basiert auf der Interaktion eines ungepaarten Elektrons mit einem externen magnetischen Feld (Zeeman Effekt). Das Absorptionssignal resultiert dabei aus den Übergängen zwischen energetisch unterschiedlichen Energiezuständen der ungepaarten Elektronen nach Anlegen eines Magnetfeldes. Sie haben aufgrund ihres Eigendrehimpulses, der auch als „Spin“ bezeichnet wird, ein magnetisches Moment [255]. Das magnetische Moment eines Elektrons (μ) hat zwei Möglichkeiten der Orientierung im Magnetfeld (B). Der energiearme Grundzustand entspricht der Anziehung im äußeren Magnetfeld und wird als parallel bezeichnet. Bei Absorption elektromagnetischer Strahlung findet ein Übergang vom parallelen α - zum antiparallelen β -Zustand statt (Abb. 3.1).

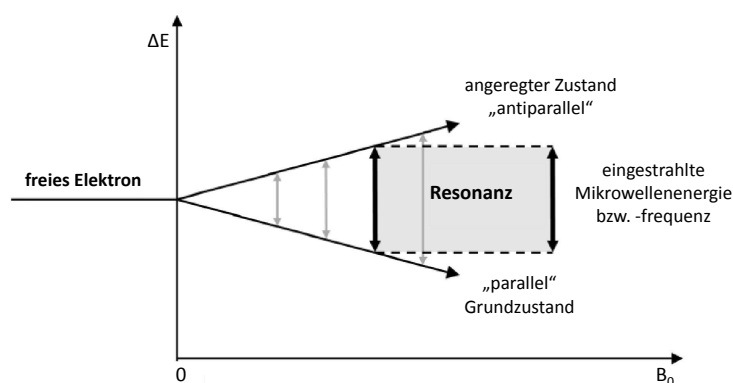


Abbildung 3.1: Energieänderung des Elektronenspins als Funktion des magnetischen Feldes. Eine Absorption (Resonanz) tritt nur dann auf, wenn die Energiedifferenz ΔE zwischen dem angeregten und Grundzustand bei einer bestimmten Magnetfeldstärke B_0 der Energie der konstant eingestrahlten Mikrowellenfrequenz ν entspricht. Diese Aufspaltung der Energieniveaus der Elektronenspins im Magnetfeld wird auch als Zeeman-Effekt bezeichnet. Modifiziert nach Müller [255].

Eine maximale Absorption tritt gemäß Glg. 3.1 dann auf, wenn die Energiedifferenz (ΔE)

zwischen dem angeregten und dem Grundzustand bei einer vorgegebenen Magnetfeldstärke der Energie der konstant eingestrahlten Mikrowellenfrequenz entspricht. Das Ausmaß der Absorption kann in Form einer Intensitätsänderung der vom Resonator reflektierten Strahlung gemessen werden [160]. Die Differenz zwischen diesen beiden Energieniveaus hängt linear von der Stärke des magnetischen Feldes ab. Ohne anliegendes Magnetfeld ist die Energiedifferenz gleich Null.

$$\Delta E = \hbar\nu = g\mu_B B_0 \quad (3.1)$$

mit

ΔE	Energiedifferenz zwischen zwei Spin-Zuständen [J]
\hbar	Reduziertes Plancksches Wirkungsquantum ($\approx 6,626 \times 10^{-34}$ [Js])
ν	Frequenz der elektromagnetischen Strahlung in Hertz [1/s]
g	g-Faktor [] (auch Zeeman-Splitting- oder Landé-Faktor), $\approx 2,0023$ für freie Radikale
B_0	Feldstärke des äußeren Magnetfeldes in Tesla [T]
μ_B	Bohr'sches Magneton ($\approx 0,9274 \times 10^{-23} \frac{J}{T}$)

Aus Glg. 3.1 geht auch hervor, dass das Aufsuchen der Resonanzbedingung prinzipiell durch Variation des Magnetfeldes bei konstanter Frequenz oder durch Variation der eingestrahlten Frequenz bei konstantem Magnetfeld erfolgen kann.

Weil die Abstimmung von Mikrowellenquellen über einen weiten Frequenzbereich technisch aufwendig ist, halten die meisten der derzeit erhältlichen Geräte die Frequenz konstant und variieren anstatt dessen die Stärke des Magnetfeldes, obwohl die mit der Frequenzmodulation der Mikrowellenquelle einhergehende drastische Verkürzung der zum Abtasten eines Einzelspektrums benötigten Zeit große Vorteile bieten würde, nachdem die zum Durchfahren des Magnetfelds je *Scan* erforderliche Zeit im Sekundenbereich liegt. In dieser Zeit kann ein frequenzmoduliertes Spektrometer mehrere hundert Mittellungen (*averages*) durchführen oder entsprechend hochaufgelöste Zeitreihen erfassen, da je *Scan* nur noch ca. 20 ms (anstatt ca. 10 s) benötigt werden.

Zwecks Rauschunterdrückung wird das Magnetfeld zusätzlich mit einer Frequenz von etwa 100 kHz moduliert. Diese Technik führt

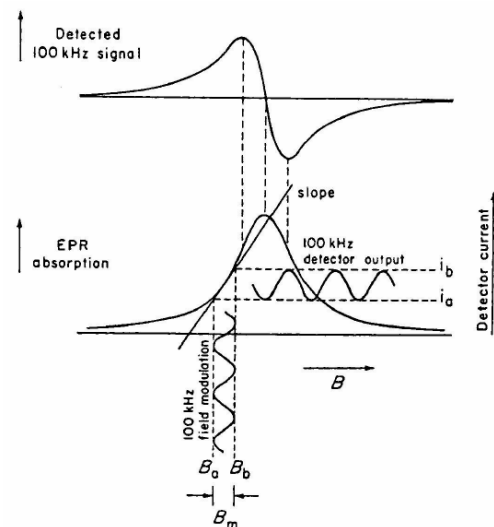


Abbildung 3.2: Technik der rauscharmen Detektion eines ESR-Spektrums. Dem im Verlauf eines field sweeps von links nach rechts in kleinen Stufen anwachsendem, starken Magnetfeld B wird ein schwaches magnetisches Wechselfeld mit einer Frequenz von ≈ 100 kHz überlagert (vertikales Signal B_m). Die dadurch differentielle Abtastung des eigentlichen Absorptionsspektrums (EPR-absorption) erzeugt in der Detektordiode einen zur ersten Ableitung des Absorptionsspektrums proportionalen Strom (Detector current) und letztlich den dieser Ableitung entsprechenden, oben im Diagramm dargestellten Kurvenzug (Detected 100 kHz signal). Die Extrema im detektierten Signal entsprechen dabei den zwei Wendepunkten an der rechten und linken Flanke des Absorptionsspektrums, wo der Betrag der Steigung (slope) jeweils maximal wird [253, 256]. Modifiziert nach Jeschke [253].

letztlich dazu, dass nicht die über dem magnetischen Feld Lorentz-verteilte Absorption der Probe, sondern deren erste Ableitung gemessen wird. Wie Abb. 3.2 andeutet, entsprechen deren Extrema den Wendepunkten der Absorptionskurve bei halber Intensität. Wenn das Magnetfeld zunimmt, muss zur Einhaltung der Resonanzbedingung auch die Frequenz ansteigen, wohingegen der g-Faktor konstant bleibt (Glg. 3.1). Dessen Wert wird durch die Struktur des entkoppelten Elektronen-Orbitals und des lokalen Umfeldes, z. B. durch die Eigenschaften der paramagnetischen Substanzen, nicht jedoch durch externe Bedingungen bestimmt.

Nicht nur der g-Faktor, sondern auch das ungepaarte Elektron ist sehr sensitiv gegenüber der lokalen Umgebung, einschließlich der Nuklei der benachbarten Atome, welche ebenfalls ein magnetisches Moment haben. Die Interaktion zwischen ungepaarten Elektron und Nukleus wird *Hyperfine-Interaktion* oder *Hyperfine-Splitting* genannt. Hierdurch ergeben sich je nach Kernspinqantenzahl mehrere Spektrallinien, deren Lage durch Glg. 3.2 beschrieben und in Abb. 3.3 für ein Nitroxid dargestellt wird [257, 258].

$$\hbar\nu = g \mu_B B_0 + a m_I \quad (3.2)$$

mit

- \hbar Reduziertes Plancksches Wirkungsquantum ($\approx 6,626 \times 10^{-34}$ [Js])
- ν Frequenz der elektromagnetischen Strahlung in Hertz [1/s]
- g g-Faktor []
- B_0 Feldstärke des äußeren Magnetfeldes [T]
- μ_B Bohr'sches Magneton ($\approx 0,9274 \times 10^{-23} \frac{J}{T}$)
- a *Hyperfine-Splitting*-Konstante [J]
- m_I Kernspinqantenzahl []

Bei Nitroxiden resultieren aus der Interaktion eines ungepaarten Elektrons ($S = \frac{1}{2} \rightarrow m_s = -\frac{1}{2}, +\frac{1}{2}$) mit dem benachbarten Stickstoffatom mit $I = 1 \rightarrow m_I = -1, 0, 1$ drei Spektrallinien (Abb. 3.3) [254].

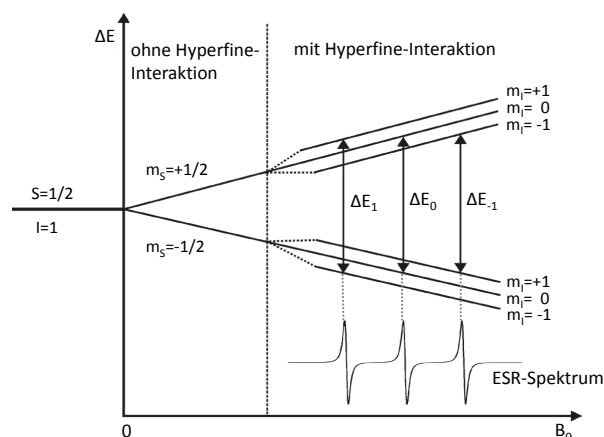


Abbildung 3.3: Hyperfine-Interaktionen und ESR-Spektrum eines Nitroxids. Das für Nitroxide typische Spektrum mit drei Spektrallinien resultiert aus der Interaktion eines ungepaarten Elektrons (Elektronenspin $S = \frac{1}{2}$) mit dem Kernspin ($I = 1$) eines Stickstoffatoms. Elektronenspin-Quantenzahl: $m_s = -1/2$ für parallelen Zustand und $m_s = +1/2$ für antiparallelen Zustand, Kernspinqantenzahl: $m_I = -1, 0, 1$

3.1.2 Aufbau und Funktionsweise eines cw-ESR-Spektrometers

Die wichtigsten Komponenten des in dieser Arbeit verwendeten *continuous wave* (cw)-ESR-Spektrometers sind in Abb. 3.4 dargestellt. Ein cw-Spektrometer arbeitet mit ständig an der Probe anliegender Mikrowellenstrahlung von gleichbleibender Amplitude. Davon zu unterscheiden sind Geräte, welche sowohl die Amplitude als auch die Frequenz modulieren und ähnlich *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR)-Spektrometern auch im Pulsbetrieb arbeiten können [*electron nuclear double resonance* (ENDOR)], und die wegen ihrer im Vergleich zur NMR-Technik sehr viel größeren Empfindlichkeit die Elektronenspins quasi als Beobachter der Kernspins einsetzen.

Als Mikrowellenquelle dient eine Gunn-Diode. Deren Strahlung wird in einen Proben- und einen Referenzarm aufgespalten. Ein Teil gelangt über den Referenzarm mit dem Phasenschieber (*Bias*) direkt auf die Detektionsdiode. Der größere Teil der Strahlung passiert den Abschwächer, der sich im Probenarm befindet. Mittels des Abschwächers kann die konstante Leistung der Mikrowellenquelle reduziert und somit an die durch Probengeometrie, Aggregatzustand und chemische Zusammensetzung bedingten Erfordernisse der Messung angepasst werden.

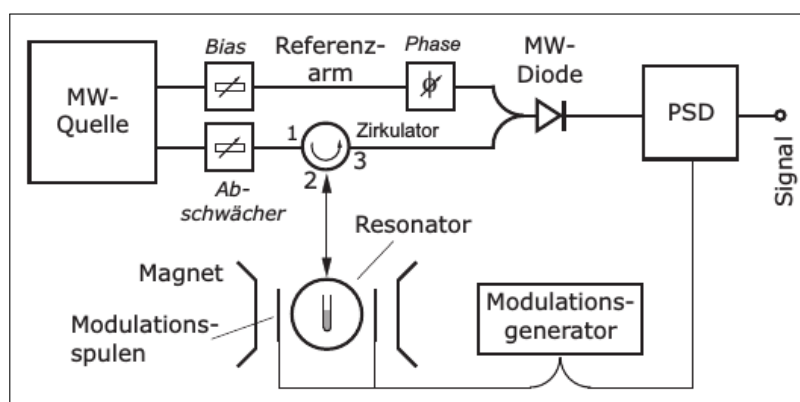


Abbildung 3.4: Vereinfachte Darstellung eines cw-ESR-Spektrometers. Abk.: MW-Quelle: Mikrowellenquelle, Bias: Phasenschieber, MW-Diode: Detektionsdiode, PSD (Phase Sensitive Detector): phasensensibler Gleichrichter, die Zahlen 1 bis 3 benennen Port 1, 2 und 3 des Zirkulators. Modifiziert nach Jeschke [257].

Die Abschwächung wird so gewählt, dass die Probe mit einer maximaler Leistung bestrahlt wird, bei der noch keine Sättigungseffekte auftreten. Über den Zirkulator und einen meist als Hohlleiter ausgeführten Wellenleiter wird die Mikrowellenstrahlung in einen auch als Kavität bezeichneten Hohlraumresonator geleitet, wo sie mit der Probe in Wechselwirkung tritt. Der Resonator konzentriert die magnetische Komponente des elektromagnetischen Wechselfeldes in der Probe und schwächt dabei die elektrische Komponente so weit als möglich ab, um die Verluste klein zu halten. Ein Zirkulator ist ein Bauelement der Antennentechnik, welches es ermöglicht, eine Antenne gleichzeitig im Sende- und Empfangsbetrieb zu halten, ohne dass der Sender die Empfangsstufe sättigt oder gar zerstört. Im Schaltbild leitet der Zirkulator fast die gesamte Hochfrequenz (HF)-Energie des MW-Senders von Port 1 an die an Port 2 anstelle einer Antenne angeschlossene Kavität weiter und gleichzeitig das in umgekehrter Richtung aus der

Kavität reflektierte Signal über Port 3 an die als Detektor fungierende Diode. In entgegengesetzter Richtung wird die HF sehr stark gedämpft. Im Effekt ist das Bauelement also vergleichbar mit der Einbahnstraßenregelung eines Verkehrskreisels, wobei die Photonen der HF-Strahlung in der Rolle der Fahrzeuge zu denken sind. Im Unterschied zum Kreisverkehr ist aber auf dem direkten Weg zwischen Port 1 und Port 3 der Wellenwiderstand ebenfalls sehr hoch, sodass die über den Zirkulator geleitete Strahlung der MW-Quelle die Detektordiode fast nur als Reflektion aus dem Resonator von Port 2 aus erreichen kann.

Eine in Abb. 3.4 nicht dargestellte Einheit versorgt die zwei großen Helmholtz-Spulen, die dort als „Magnet“ bezeichnet werden, mit einer im zeitlichen Verlauf dreieckförmigen Spannung, welche das Magnetfeld während der Abtastung eines Spektrums (*Scan*) zunehmend verstärkt. Hierdurch wird im Verlauf eines *Scans* stellenweise eine Resonanzbedingung gemäß Glg. 3.2 erfüllt. Die Elektronenspins der Probe absorbieren MW-Strahlung, woraufhin sich der Wellenwiderstand (Impedanz) des zuvor auf maximale Absorption abgestimmten Resonators sprunghaft ändert. Diese Impedanzänderung führt zu einer temporären FehlAbstimmung der sonst möglichst perfekt abgestimmten Kavität und damit dazu, dass die MW entsprechend dem Absorptionsverlauf beim Durchwandern des magnetischen Feldes reflektiert werden. An der Detektordiode angekommen bewirkt der zeitliche Verlauf der reflektierten Strahlung eine proportionale Änderung des sie durchfließenden Stromes und dadurch letztlich eine Änderung des angezeigten Signals.

Kristalldioden weisen eine sigmoide Kennlinie auf und arbeiten deshalb nur innerhalb einer gewissen Bereichs linear. Deshalb wird die Detektordiode mit dem Ziel, sie im linearen, mittleren Teil ihrer Kennlinie zu betreiben, auch über den in Abb. 3.4 oben liegenden Referenzarm gespeist und als Teil des Abstimmungsprozesses (*tuning*) mit Hilfe des im Diagramm als *Bias* bezeichneten Stellgliedes ein geeigneter Arbeitspunkt der Diode eingestellt. Zusätzlich wird mittels eines verstellbaren Phasenschiebers die u. a. aufgrund von unterschiedlichen Weglängen bestehende Phasenverschiebung des MW-Signals zwischen Referenzarm und Probenarm auf Null einreguliert.

Historisch aus der Notwendigkeit erwachsen, das Absorptionssignal auf einem Oszilloskop darzustellen und heute zur Rauschunterdrückung fortgeführt, wird das Magnetfeld mittels des im Diagramm dargestellten Modulationsgenerators und zweier kleiner, in die Kavität eingebauten Spulen nochmals mit einer Frequenz um 100 kHz und einer Amplitude von einigen milli-Tesla moduliert, was zu einem entsprechend hochfrequenten An- und Abschwelen der aus der Kavität reflektierten Strahlung führt (B_m in Abb. 3.2). Mittels eines phasenempfindlichen Verstärkers wird anschließend der modulierte Anteil der in der Detektordiode erzeugten Stromschwankung per Kreuzkorrelation herausgefiltert. Das so erhaltene Signal stellt dann die bereits beschriebene erste Ableitung (Abb. 3.2) der MW-Absorption durch die Probe dar [253, 255, 257, 259].

3.1.3 ESR-Frequenzbänder

Aus historischen Gründen, die mit der anfänglichen Geheimhaltung der Radartechnik verbunden sind, unterscheidet man noch heute Frequenzbänder, die in willkürlicher Anordnung mit Großbuchstaben bezeichnet werden. Diese sind in Tabelle 3.1 aufgezählt.

Frequenzband	Frequenz [GHz]	$\approx B_{res,g=2}$ [G]	Nachweisgrenze [Spins]	λ [mm]	Eindringtiefe
L - Band	1 - 1,5	392		≈ 200	1 - 1,5 cm
S - Band	2 - 3	1070		≈ 120	
X - Band	9 - 10	3480	5×10^9	≈ 30	1 - 3 mm
Q - Band	33 - 35	12000	2×10^9	≈ 9	
W - Band	95 - 100	34000	4×10^7	≈ 3	50 - 100 μm
D - Band	110 - 170			≈ 2	

Tabelle 3.1: ESR-spektroskopisch genutzte Frequenzbänder. $B_{res,g=2}$ bezeichnet die Magnetfeldstärke für die Erfüllung der Resonanzbedingung bei einem g -Faktor von 2 [255, 260–262].

Hier wird ersichtlich, dass die maximale Eindringtiefe der Mikrowellenstrahlung mit der Frequenz abnimmt. Mit der entsprechend kleiner werdenden Wellenlänge fällt auch der Durchmesser der Kavität, wodurch das maximal einsetzbare Probenvolumen immer geringer wird und somit auch immer weniger *Spins* aus der Probe zum Gesamtsignal beitragen können; zudem wachsen auch die Energieverluste an. Diese Zusammenhänge kompensieren die eigentlich aus Glg. 3.1 folgende, mit steigender Frequenz aus einer ansteigenden Energie erwachsende ansteigende Empfindlichkeit. Die größte Empfindlichkeit liegt aus diesem Grund im S-Band [256]. Allerdings steigt die zeitliche Auflösung mit dem Anwachsen der Energie. Ab dem Q-Band werden für die Aufrechterhaltung der hohen magnetischen Feldstärken heliumgekühlte, supraleitende Magneten benötigt [260]. Am unteren Ende des Spektrums ermöglichen die großen Wellenlängen im L-Band Messungen *in vivo* auch am Menschen. Mittels Oberflächenspulen kann z. B. das vom O_2 -Partialdruck der Umgebung abhängige Signal von in diabetischen Wunden eingelegten Lithium-Phthalocyanin zur ESR-gestützten Oximetrie genutzt werden [263].

3.1.4 Strukturelle Analyse der ESR-Spektren

ESR-Messungen können prinzipiell an festen, flüssigen und gasförmigen Proben vorgenommen werden. Die Anwendung der ESR in biologischen Systemen ist insoweit problematisch, da Mikrowellen durch wässrige Lösungen stark absorbiert werden. Dadurch wird die Empfindlichkeit verringert, weil die Güte des Schwingkreises bestehend aus Resonator und Probe drastisch sinkt. Dem wird dadurch begegnet, dass im Vergleich zu festen bzw. gefrorenen Proben geringere Probenvolumina eingesetzt werden. Die Auflösung der ESR-Spektroskopie reicht in Lösungen häufig aus, um auch kleine Differenzen zur Charakterisierung der Radikale zu nutzen.

Die *Spins* gefrorener Proben sind Spektren von pulverförmig vorliegenden Substanzen ähnlich. Solchen Spektren ist gemeinsam, dass die *Spins* sich im externen Magnetfeld aufgrund der

Kristallisation nicht mehr vollständig ausrichten können. Die *Spins* sind vollständig immobilisiert (Abb. 3.5a und 3.6). Die in gefrorenen Proben beobachteten größeren Linienbreiten sind das Ergebnis einer Überlagerung der Einzelspektren von vielen räumlich zufällig orientierten *Spins*. Lässt man eine gefrorene Probe langsam schmelzen, so geht das gefrorenen Spektrum langsam in ein Flüssigspektrum über, wie exemplarisch anhand der ESR-Spektren einer mit der *Spin probe* CMH inkubierten Probe verdeutlicht wird (Abb. 3.5).

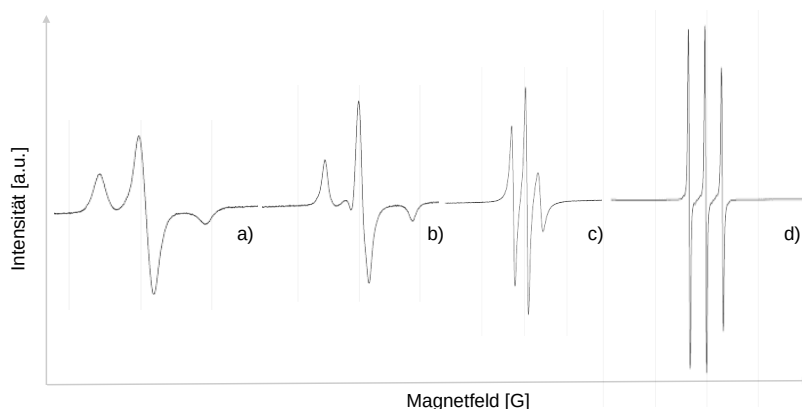


Abbildung 3.5: ESR-Spektren einer als Zeitreihe gemessenen, auftauenden, zellfreien Probe, versetzt mit CMH (0,5 mM). Die Probe wurde über 15 min bei Raumtemperatur und Einstrahlung einer Mikrowellenleistung von 2 mW gemessen. Das Spektrum der zu Beginn der Messung gefrorenen Probe (a) geht langsam in ein Flüssigspektrum (d) über. Die Spektren (b) und (c) zeigen beispielhaft den langsamen Übergang in den flüssigen Aggregatzustand, der besonders bei dem linken und rechten Peak deutlich wird.

Dabei wandeln sich der rechte und linke Peak des gefrorenen CM^\bullet -Spektrums in irregulär erscheinende Auslenkungen der äußeren Peaks von Spektren auftauender Proben (Abb. 3.5b und 3.5c) nach und nach zum linken und rechten Peak des Flüssigspektrums (Abb. 3.5d). Die *Spins* auftauender Proben zeigen in diesem Kristallisationsstadium bei einer im Vergleich zu *Spins* gefrorener Proben zunehmenden Anisotropie eine höhere, aber im Vergleich zur komplett aufgetauten Probe, noch eingeschränkte Mobilität. Das resultierende CM^\bullet -Spektrum einer flüssigen Probe zeigt eine schmale Linienbreite der zentralen Spektrallinien (Abb. 3.5d) und damit ein gut aufgelöstes *Hyperfine-Splitting*.

Das gefrorene CM^\bullet -Spektrum im hier dargestellten Beispiel weist eine Linienbreite von $\approx 10,3$ Gauß auf (Abb. 3.5a). Die Linienbreiten der Spektren der angetauten (Abb. 3.5b) mit $\approx 8,3$ G bzw. fast vollständig aufgetauten Probe (Abb. 3.5c) mit $\approx 3,5$ G werden kontinuierlich schmaler. Das typische Spektrum einer flüssigen Nitroxid-Probe (Abb. 3.5d) beträgt mit einer Linienbreite von ≈ 1 G lediglich noch ein Zehntel gegenüber dem gefrorenen Zustand zu Beginn des Experiments.

3.1.5 Quantitative Analyse der ESR-Spektren

Die Fläche unter der Absorptionskurve als Maß für die in der Probe enthaltenen unpaaren *Spins* kann näherungsweise als Produkt des Abstandes der Peaks auf der Intensitätsachse (Am-

plitude) und dem Quadrat der zugehörigen Linienbreite berechnet werden. Der Abstand der beiden Extrema auf der magnetischen Achse des Absorptionsspektrums wird als Linienbreite verstanden (Abb. 3.6).

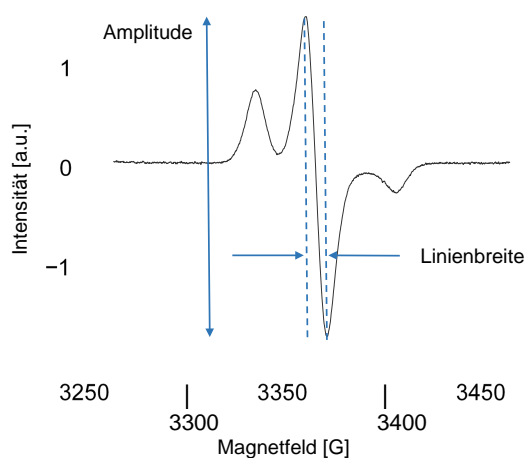


Abbildung 3.6: CM^\bullet -Spektrum einer gefrorenen Probe. Die Differenz zwischen dem positiven und negativen Peak ist proportional zur Zahl der Spins der ESR-aktiven Spezies.

Insofern die Linienbreite sich zwischen den einzelnen Proben nicht merklich ändert, ist auch der Betrag des Abstands der Peaks auf der Intensitätsachse proportional zur Anzahl der *Spins* in der jeweiligen Probe (Glg. 3.3) [262].

$$DI \approx \text{Amplitude}_{pp} \times \text{Linienbreite}_{pp}^2 \quad (3.3)$$

mit

- DI Wert des Doppelintegrals der differenziell aufgenommenen Absorptionslinie
- pp Differenz zwischen positiven und negativen Peak der Amplitude (der mittleren Spektrallinie)

Genauere Ergebnisse erbringt die rechnergestützte Anpassung eines theoretischen Spektrums an das gemessene Spektrum und eine daran anschließende zweifache Integration der so erhaltenen Kurve, wie sie für Proben im flüssigen Zustand z. B. mittels des *SpinFit*-Unterprogramms des *Xenon* genannten Kontrollprogramms der Bruker *Workstation* durchgeführt werden kann. Diese Herangehensweise hat u. a. den Vorteil, dass anhand dieses Integrals für jede Probe ohne Hinzuziehung eines externen Standards eine molare *Spin*-Konzentration berechnet werden kann. Hierzu werden u. a. Probengeometrie, -Temperatur und -Volumen, die Anzahl der unpaaren *Spins* der *Spin probe*, die Mikrowellenleistung, die Modulationstiefe des magnetischen Feldes, ein im Programm abgelegtes geometrisches Empfindlichkeitsprofil des verwendeten Resonators $f(B_1, B_m)$ sowie die jeweils aktuell gemessene Q-Werte in Anschlag gebracht (Glg. 3.4, nach

Höfer und Carl [264], umgestellt nach der molaren Probenkonzentration C in mol/l).

$$C = \frac{DI}{c \sqrt{P} B_m Q V S(S+1) n_B f(B_1, B_m)} \quad (3.4)$$

$$n_B \approx \frac{\hbar \nu}{2k_B T}$$

mit

C	Molare Probenkonzentration [mol/l]
DI	Wert des Doppelintegrals der differenziell aufgenommenen Absorptionslinie
c	Empirische Empfindlichkeitskonstante (<i>point sample calibration factor</i>)
P	Eingestrahlte Leistung [mW]
B_m	Modulationsamplitude [Gauß]
Q	Individuell gemessener Gütefaktor des mit der Probe beladenen Resonators (Q-Wert)
V	Probenvolumen in Liter [l]
S	Anzahl der unpaaren Elektronenspins
n_B	Boltzmann-Faktor für Temperaturabhängigkeit []
$f(B_1, B_m)$	räumliche Empfindlichkeitsverteilung des Hohlraumresonators
B_1	Mikrowellen-Feldamplitude [Gauß]
\hbar	Reduziertes Plancksches Wirkungsquantum ($\approx 6,626 \times 10^{-34}$ [Js])
ν	Mikrowellenfrequenz in Hertz [1/s]
k_B	Boltzmann-Konstante ($\approx 1,38 \times 10^{-23}$ [$\frac{J}{K}$])
T	Probentemperatur [K]

Abb. 3.7 zeigt ein Beispiel eines CP•-ESR-Spektrums (rot), dessen Integration (eigentliches Absorptionsspektrum, blau) und das Ergebnis der doppelten Integration des ESR-Spektrums (grün). Der Wert dieses Integrals entspricht der Fläche unter der Kurve des Absorptionsspektrums und ist proportional zur Nitroxid-Konzentration in der Probe.

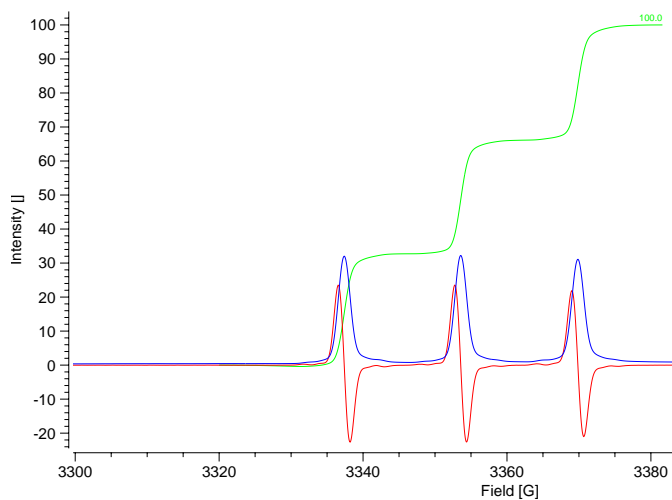


Abbildung 3.7: Manuell durchgeführte Signalintegration einer flüssig gemessenen Probe. Rote Kurve: gemessenes ESR-Signal, blaue Kurve: 1. Integration des gemessenen ESR-Signals (tatsächliches ESR-Absorptionsspektrum), grüne Kurve: Doppelte Integration des ESR-Signals (Fläche unter der Kurve des Absorptionsspektrums, hier zu Darstellungszwecken auf 100 normalisiert). x-Achse: Magnetfeld in Gauß; y-Achse: ESR-Intensität [a.u.]

Anhand des numerischen Wertes des Doppelintegrals, der Probengeometrie und Resonatorkalibrierung berechnet *SpinFit* gemäß Glg. 3.4 die absolute molare Konzentration des in der Probe enthaltenen Radikals. Im Unterschied zur zweifach hintereinander durchgeführten Integration der Spektraldaten, die hinter der grün gezeichneten Kurve von Abb. 3.7 liegt, integriert *SpinFit* aber nicht das verrauschte ESR-Spektrum, sondern ein an das gemessene Spektrum angepasstes Modellspektrum. Um eine gute Anpassung (geringe Residuen) des Modellspektrums an das gemessene Spektrum zu erreichen, muss manuell mit dem g-Wert, der Anzahl der Spins

und dem durch das *Hyperfine-Splitting* bedingten, aus dem gemessenen Spektrum herauszumessenden Linienabstand parametrisiert werden.

Eine gute Anpassung würde sich in einem eher treppenförmigen Verlauf des Doppelintegrals zeigen; demgegenüber sind die Stufen des Doppelintegrals der manuell durchgeführten Doppelintegration in Abb. 3.7 noch ziemlich rund und verlaufen zwischen bzw. außerhalb der drei Absorptionslinien nicht exakt horizontal. Ein schräger anstatt horizontaler Verlauf des Doppelintegrals zwischen den Absorptionslinien verzerrt dessen Wert nach oben hin und übertreibt folglich die Radikalkonzentration in der Probe.

Wie in Glg. 3.4 zu ersehen, ist die letztlich berechnete Konzentration auch von der Temperatur abhängig. Eine Temperatur-Zeitreihe zeigt diesen nicht unerheblichen Einfluss (Abb. 3.14 und 3.5). Einen ähnlich starken Einfluss auf das Messergebnis kann die in Glg. 3.4 nicht erfasste chemische Umgebung des Analyten haben, wobei im Kontext biomedizinischer Experimente die Abhängigkeit des Signals von der O₂-Konzentration in der Probe von großer Bedeutung ist (Abb. 3.16 und 3.17).

3.1.6 *Spin traps, Spin probes und Spin labels*

Obwohl die ESR-Spektroskopie einer der sensitivsten Methoden zur Detektion freier Radikale in biologischen Systemen ist, sind die wenigsten stabil genug, um direkt nachgewiesen werden zu können. Deshalb wurden verschiedene ESR-Techniken entwickelt, um diese über eine Zwischenreaktion indirekt detektieren zu können. Dazu zählen der Einsatz von *Spin traps*, *Spin probes* und *Spin labels*.

Spin traps reagieren mit kurzlebigen Radikalen unter Bildung stabiler Radikaladdukte, die leicht mittels ESR-Spektroskopie nachgewiesen werden können. Da sie mit unterschiedlichen reaktiven Spezies verschiedene Addukte bilden, ist es möglich, die initialen Radikale direkt anhand der unterschiedlich ausgebildeten Spektren zu identifizieren. Hierzu werden hauptsächlich Nitroso- und Nitron-Derivate als *Spin traps* verwendet. Da die Reaktionsgeschwindigkeit von *Spin traps* im Vergleich zu endogenen Antioxidantien sehr langsam ist, ist *Spin-trapping* vor allem eine Technik zur Identifikation und der qualitativen Analyse von ROS/RNS im biologischen System [249].

Alternativ zu *Spin traps* werden bei biologischen Anwendungen häufig Hydroxylamin-*Spin probes* eingesetzt, wie z. B. die bereits erwähnte CMH (Abb. 3.5). Im Gegensatz zu *Spin traps* reagieren *Spin probes* nicht zu einem neuen Addukt, sondern werden in Gegenwart von ROS/RNS oxidiert. Das auf diese Weise gebildete Nitroxid (Abb. 2.3) ist über mehrere Stunden stabil und mittels ESR nachweisbar. Das ESR-Spektrum ist jedoch nicht charakteristisch für das initiale Radikal, sondern entspricht dem drei Spektrallinien aufweisenden Spektrum des Nitroxids. Mittels Hydroxylamin-*Spin probes* können hauptsächlich O₂•⁻ aber auch ONOO⁻ nachgewiesen werden [222, 225, 250]. Um jedoch die initiale reaktive Spezies identifizieren und quantifizieren

zu können, ist der Einsatz spezifischer Antioxidantien (z. B. $O_2^{\bullet-}$ -katalysierende SOD, Glg. 1.1) oder Inhibitoren von ROS/RNS-Quellen (z. B. der eNOS-Inhibitor L-NAME) notwendig.

Ein Vorteil gegenüber *Spin traps* ist, dass *Spin probes* aufgrund der teils mehr als 100-fachen Reaktionsgeschwindigkeit mit den initialen Radikalen auch mit intrazellulären Antioxidantien konkurrieren können. Deshalb ist mit *Spin probes* prinzipiell auch ein intrazellulärer oder mitochondrialer $O_2^{\bullet-}$ -Nachweis möglich. Inwieweit diese jedoch für einen kompartimentspezifischen ROS/RNS-Nachweis tatsächlich geeignet sind, hängt auch von den chemischen und strukturellen Eigenschaften ab. Eine hohe Lipophilität und geringe Polarität sind Indikatoren für die Fähigkeit eines Moleküls, gut Zellmembranen passieren zu können [249].

Obwohl die Anwendung der ESR-Spektroskopie die Präsenz von ungepaarten Elektronen erfordert, ist deren Einsatz inzwischen nicht mehr nur auf paramagnetische Verbindungen limitiert. Durch Anwendung von *Spin labeling* in Proteinen oder Lipid-Doppelmembranen können diamagnetische Metallionen durch paramagnetische ersetzt oder sogenannte *site-specific Spin label* (SDSL) eingesetzt werden. SDSL sind Nitroxid-*Spin label*, welche kovalent an ausgewählte Positionen von Proteinen binden. Diese Technik ermöglicht durch Auswertung von Anisotropie-Effekten auf die Hyperfein-Interaktionen die Dynamik und Fluidität biologischer Membranen sowie die funktionelle Dynamik von Proteinen zu untersuchen [254].

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Analyse von Nitroxid-Spektren und -Standardreihen mittels *Peak-to-Peak* und *SpinFit*-Methode zellfreier ESR-Proben

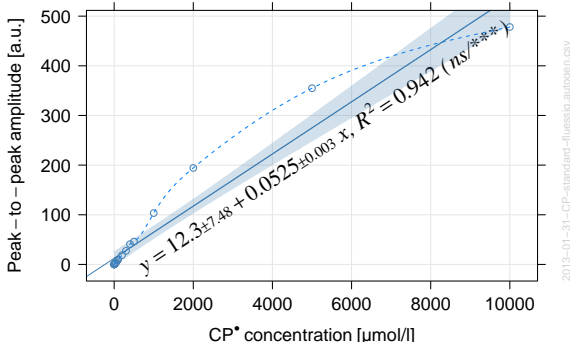
Zur Prüfung der Annahme, dass die P2P-Amplitude (Abb. 3.6) proportional zur Nitroxid-Konzentration in zellfreien Proben ist, wurden Standardreihen sowohl mit CP• als auch CM• erstellt und Amplituden gegen die nominalen Konzentrationsstufen aufgetragen. Die ESR-Messungen erfolgten im flüssigem (Abs. 3.2.1.1) oder gefrorenen (Abs. 3.2.1.2) Zustand. Mittels des *SpinFit*-Moduls der *Xenon*-Software (Bruker BioSpin, Rheinstetten) der ESR-*Workstation* können die aufgezeichneten Spektren aber auch zur Berechnung von absoluten Nitroxid-Konzentrationen verwendet werden. Um die beiden Analysemethoden zu vergleichen, wurde jedes einzelne Probenspektrum sowohl mittels der P2P-Methode als auch durch *SpinFit* ausgewertet. Für die *SpinFit*-Anpassung wurde die 500 µM Konzentrationsstufe als Referenzpunkt gewählt, um so den effektiven Durchmesser, der im *SpinFit*-Modul angegeben werden muss, per Intervallschachtelung zu bestimmen (ID = 0,623 mm bei 40 mm effektiver Länge).

3.2.1.1 Vergleich der *Peak-to-Peak* und *SpinFit*-Methode einer flüssig gemessenen CP•-Standardreihe

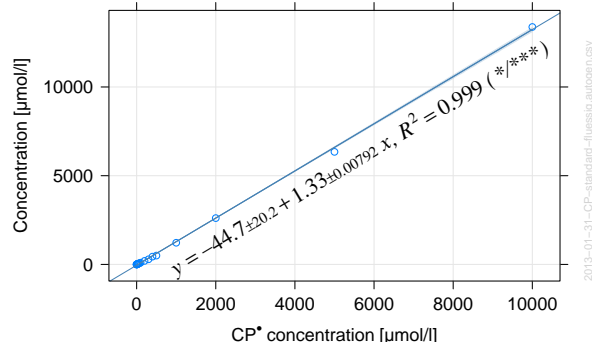
Zur Erstellung der in Abb. 2.3 dargestellten Standardreihe wurde das kommerziell erhältliche, stabile Nitroxid CP•, gelöst in zellfreien KHB, verwendet. Die CP•-Standardreihe (n=2 pro Konzentrationsstufe) wurde wie in Abs. 2.5.1.1 beschrieben erstellt und flüssig in 50 µl Mikrokapillaren (*Blaubrand*, Brand, Wertheim) gemessen (Abs. 2.5.3).

In einem für ESR-Messungen biologischer Proben relevanten Konzentrationsbereich zwischen 0,5 und 500 µM zeigte sich bei beiden Analysemethoden ein linearer Anstieg mit geringer Streuung der Messwerte (Abb. 3.8c und 3.8d). Im Bereich höherer Konzentrationen zwischen 1 000 und 10 000 µM wichen die nach der P2P-Methode analysierten Messwerte mit zunehmender CP•-Konzentration stark vom linearen Verlauf ab (Abb. 3.8a). Bei Berechnung der Konzentrationen derselben Proben mittels des *SpinFit*-Moduls, bleibt die Linearität der Werte scheinbar auch bei hohen Konzentrationen erhalten (Abb. 3.8b). Tatsächlich aber wächst die Abweichung mit zunehmendem Abstand vom Referenzpunkt bei 500 µM in beide Richtungen beträchtlich an. Die nichtlineare Abweichung der P2P-Methode oberhalb von 1 000 µM korreliert mit dem Ansteigen der Linienbreite ab einer Konzentration von 1 000 µM (Abb. 3.8e), die im Bereich von 5 bis 1 000 µM hingegen sonst nahezu konstant verläuft. Unterhalb von ca. 2 µM beginnt die Linienbreite stark abzusinken, was auf eine sehr schnell abfallende SNR zurückzuführen ist. Eine nichtlineare Regression würde diesem Bereich gegen die Rauschamplitude auslaufen. Eine gerade noch akzeptable Grenze der P2P-Methode liegt unter den gewählten Messbedingungen

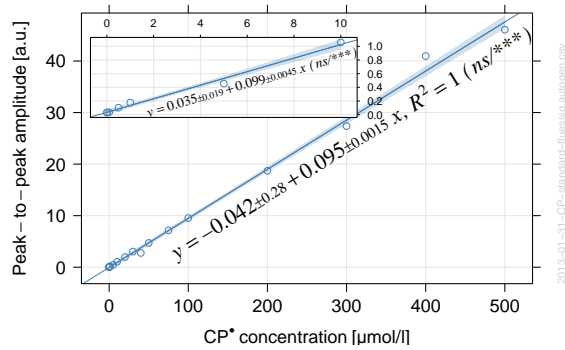
bei etwa 0,5 μM (Abb. 3.8c).



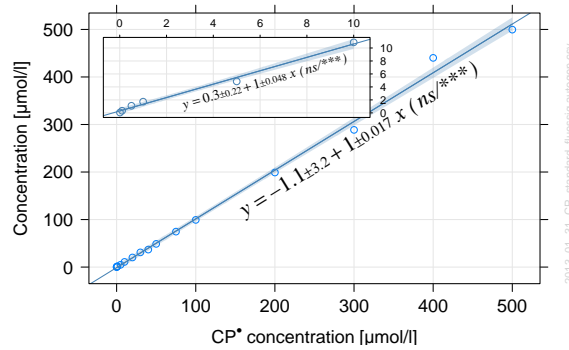
(a) Peak-to-Peak-Methode (0,01-10 000 μM CP*)



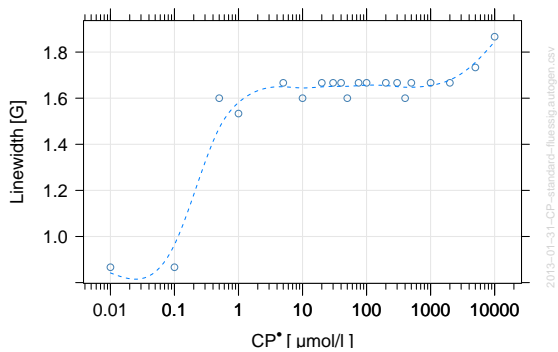
(b) SpinFit-Methode (0,1-10 000 μM CP*)



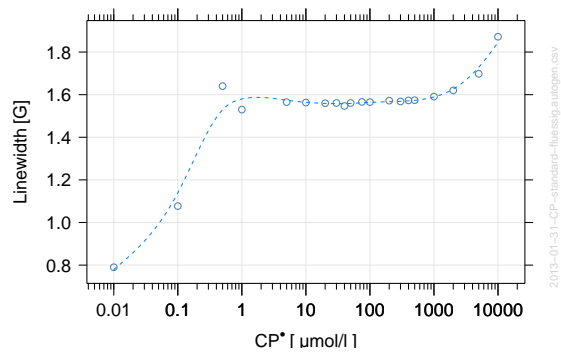
(c) Peak-to-Peak-Methode (0,01-500 μM CP*)



(d) SpinFit-Methode (0,01-500 μM CP*)



(e) Peak-to-Peak - Methode (0,01-10 000 μM CP*)



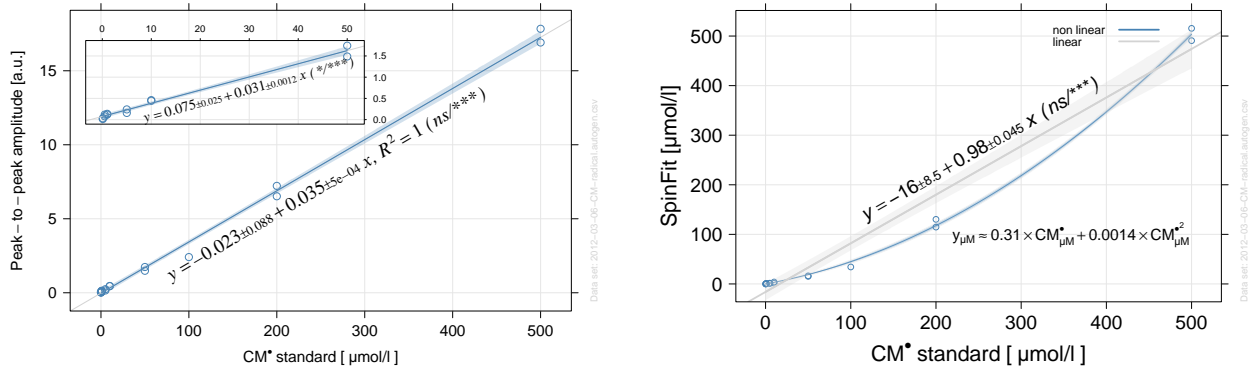
(f) SpinFit-Methode (0,01-10 000 μM CP*)

Abbildung 3.8: CP*-Standardreihe von in flüssigem Zustand gemessenen Proben im Konzentrationsbereich von 0,01 bis 10 000 μM ($n=2$). Die CP*-Konzentrationen wurden anhand der P2P-Methode berechnet (a und c). Außerdem wurden absolute Konzentrationen mit dem Xenon-Software-Modul SpinFit berechnet (b und d). (c) und (d) fokussieren auf die Linearität der Konzentrationsreihe im unteren Bereich von 0,01 bis 500 μM . Die kleinen Graphen im linken oberen Teil zeigen den Ausschnitt bis 5 μM , wobei sich 0,01 μM und 0,1 μM kaum noch vom Rauschen abheben (SNR 1 bis 5). (e) Interpolierende Spline-Darstellung der Linienbreiten (Linewidth) der P2P-basierten CP*-Konzentrationen. (f) Interpolierende Spline-Darstellung der Linienbreiten der SpinFit-basierten CP*-Konzentrationen. Die blau schattierten Fehlerbänder repräsentieren 95% CIs. Die gestrichelte Linie in (a) ist ein zur Verdeutlichung des nichtlinearen Signalverlaufs im Bereich zwischen 1 000 μM und 10 000 μM zusätzlich eingezeichneter Spline. Abk.: P2P - Peak-to-Peak, SNR - Signal to Noise Ratio (****/****): Signifikanz des Intercept und Signifikanz der Steigung der Regressionsgeraden. ****: $p < 0,001$; ***: $p < 0,01$; **: $p < 0,05$; ns: $p \geq 0,05$

Einen ähnlichen Verlauf zeigt die in Abb. 3.8f mittels SpinFit errechnete Linienbreite. Das Hin- und Herspringen der P2P-Linienbreite zwischen 1,6 und 1,68 G im Konzentrationsbereich von 5 bis 200 μM ist durch die limitierte Feldauflösung durch den *field sweep* von hier 3 000 Feldschritten über 200 Gauß bedingt (0,07 Gauß/Schritt), was durch das hinter SpinFit liegende Modell nahezu kompensiert wird.

3.2.1.2 Vergleich der *Peak-to-Peak* und *SpinFit*-Methode einer CM^\bullet - Standardreihe gefrorener Proben

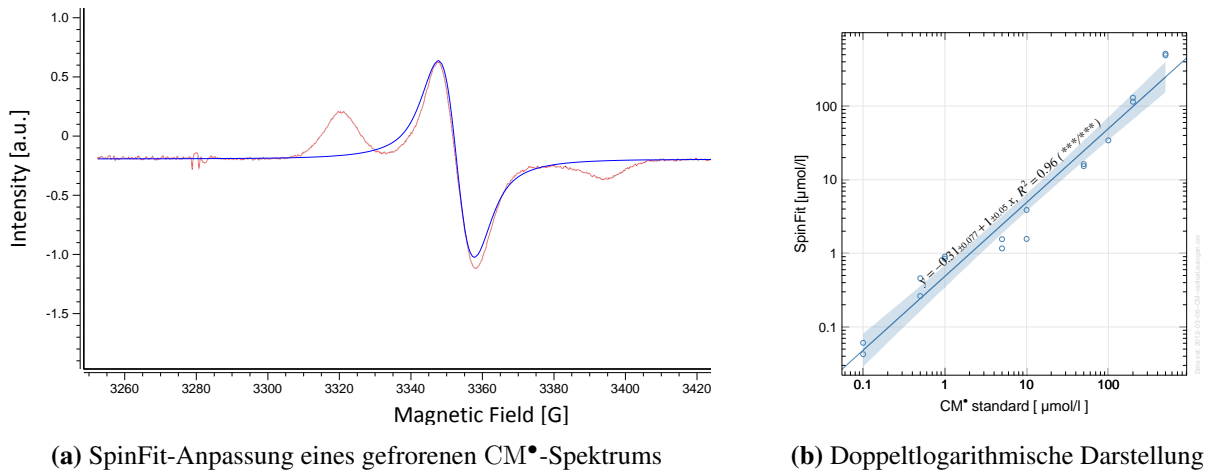
Die, wie unter Abs. 2.5.1.1 beschrieben, erstellte CM^\bullet -Standardreihe wurde anhand von gefrorenen Proben gemessen (Abs. 2.5.3). Die ESR-Spektren wurden unter Verwendung der auch in Abs. 3.2.1.1 genutzten Methoden analysiert.



(a) *Peak-to-Peak*-Methode (0,1-500 μM CM^\bullet)

(b) *SpinFit*-Methode (0,1-500 μM CM^\bullet)

Abbildung 3.9: CM^\bullet -Standardreihe zellfreier, gefrorener Proben in einem Bereich von 0,1 bis 500 μM ($n=2$). (a) Analyse der Ergebnisse nach der *Peak-to-Peak*-Methode. Der kleine Graph im linken oberen Teil fokussiert auf den Signalverlauf im unteren Konzentrationsbereich. (b) Berechnung der Konzentrationen mittels *SpinFit*-Modul der *Xenon*-Software. Der nichtlineare Kurvenverlauf wurde mittels der in Abb. 3.11 ersichtlichen Beziehung modelliert. Die Fehlerbänder repräsentieren 95 % CIs.



(a) *SpinFit*-Anpassung eines gefrorenen CM^\bullet -Spektrums

(b) Doppeltlogarithmische Darstellung

Abbildung 3.10: *Spektrum und SpinFit-Anpassung zellfreier, gefrorener CM^\bullet -Proben* ($n=2$) (a) CM^\bullet -Spektrum einer gefrorenen Probe (rot) und *SpinFit* (blau). (b) Doppeltlogarithmische Darstellung der Daten hinter Abb. 3.9b.

Im Bereich von 0,5 und 500 μM war mit der P2P-Analyse ein linearer Anstieg zu verzeichnen (Abb. 3.9a). Proben mit sehr geringen Konzentrationen (bis 0,5 μM) waren aufgrund des geringen Signals kaum vom Rauschen unterscheidbar (Abb. 3.9a, links oben eingesetztes Diagramm). Wenn der gleiche Datensatz versuchsweise mittels auf die mittlere Linie beschränktem *Spin fitting* ausgewertet wird (Abb. 3.10a), zeigte sich ein exponentieller Anstieg des berechneten

Signals und somit ein nichtlinearer Zusammenhang (Abb. 3.9b). Hinter der exponentiell verlaufenden Ausgleichskurve steht ein *nls*-Modell, welches die in Abb. 3.11 ersichtliche Beziehung zur Anpassung an die von *SpinFit* in *mol/l* ausgegeben Werte verwendet. Der zugehörige 95 % CI wurde mit Hilfe des *R*-Pakets *propagate* [265] berechnet. In einer log-log Darstellung zeigte sich der Zusammenhang linear (Abb. 3.10b).

Zur Verdeutlichung der mit der CM^\bullet -Konzentration ansteigenden SNR wurden in Abb. 3.12 repräsentative P2P-Amplituden von ESR-Proben der drei geringsten CM^\bullet -Konzentrationen (0,1, 0,5 und 5 μM) derselben Standardreihe dargestellt. Bei 0,1 μM unterschied sich das ESR-Signal bei den gewählten Parametern kaum vom Rauschen des Messsystems (Abb. 3.12b, SNR 5,4), was auch die korrekte Zuordnung der Lage der Peaks erschwerte. Erst ab einer Konzentration von 0,5 μM hob sich das CM^\bullet -Signal bei sechs Mittelungen mit einer SNR > 14 deutlich vom Rauschen ab.

```
Formula: M * 10^6 ~ a * Concentration + b * Concentration^2
Parameters:
  Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
a 9.475e-02 6.435e-03 14.72 <2e-16 ***
b 4.267e-04 1.386e-05 30.79 <2e-16 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
Residual standard error: 1.788 on 36 degrees of freedom
Number of iterations to convergence: 1
Achieved convergence tolerance: 2.714e-10
```

Abbildung 3.11: *SpinFit/nls*-Modell für gefrorene Proben

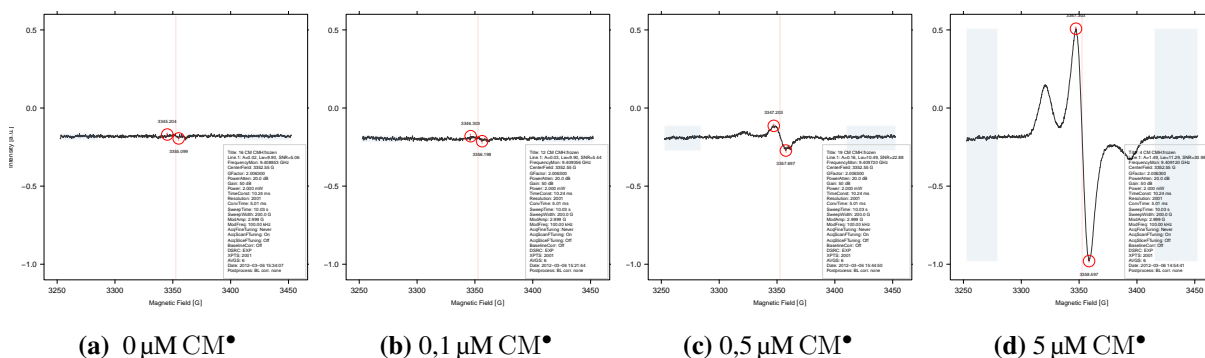


Abbildung 3.12: Repräsentative CM^\bullet -Spektren zur Verdeutlichung des Signal/Rausch-Verhältnisses in Abhängigkeit von der Nitroxid-Konzentration der ESR-Probe. Das Signal/Rausch-Verhältnis (SNR) ist bei (a) 0 μM CM^\bullet , SNR=5,0 (b) 0,1 μM CM^\bullet , SNR=5,43 (c) 0,5 μM CM^\bullet , SNR=22,88 (d) 5 μM CM^\bullet , SNR=30,98. Bei der geringsten CM^\bullet -Konzentration (0,1 μM) unterscheidet sich das ESR-Signal bei den gewählten Anzahl von 6 Mittelungen kaum vom Rauschen des Messsystems. Bereits ab einer CM^\bullet -Konzentrationen von 0,5 μM hebt sich die P2P-Amplitude deutlich vom Rauschen ab.

3.2.1.3 Effektiver Durchmesser des *AquaX* Kapillarbündels

Zur quantitativen Beurteilung des physiologischen Signalanteils am detektierten ESR-Signal der im Kontext von *ex vivo* Normoxie-Hypoxie Experimenten erfassten Zeitreihen wie z. B. des ILU-ESR-Pilotversuchs (Abs. 3.2.9) wurde eine CM^\bullet -Standardreihe unter Verwendung des *AquaX* (Bruker BioSpin, Rheinstetten) erstellt. Das für die *online*-Messung von ionischen Flüssigkeiten geeignete Kapillarbündel *AquaX* besteht aus einem langen Quarzglaszylinder, in den mit einem Werkzeugglaser vier feine, der Länge nach parallele Bohrungen eingebracht wurden, welche zusammen genommen ein Volumen von 180 μl haben. Infolge dielektrischer Effekte hat diese

Anordnung gegenüber einem einzelnen zylindrischen Röhrchen gleichen Volumens den Vorteil, dass der Q-Wert und damit die Empfindlichkeit des Systems höher ist.

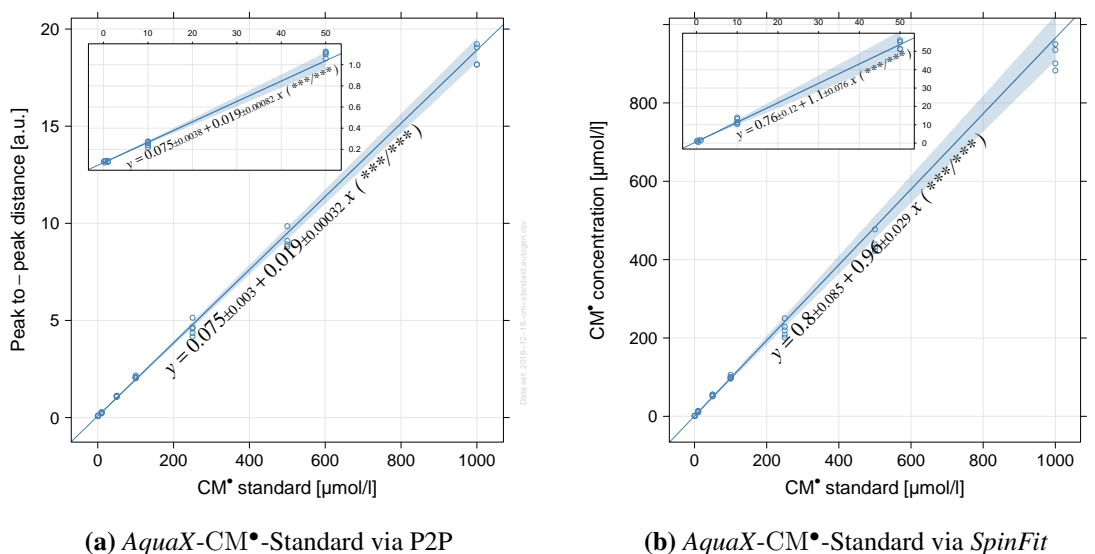


Abbildung 3.13: CM•-Standardreihe zur Bestimmung der absoluten CM•-Konzentration unter Verwendung des AquaX-Kapillarbündels. (a) P2P-Amplituden der CM•-Standard-Konzentrationen. (b) SpinFit-basierte CM•-Konzentration gegen CM•-Standard (n=4). Abk.: P2P distance - Peak-to-Peak-Amplitude. (***/ **): Signifikanz des Intercept und Signifikanz der Steigung der Regressionsgeraden. *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$; ns : $p \geq 0,05$

Zur quantitativen Bestimmung einer Probe mittels des *SpinFit*-Moduls ist aber die Angabe der Länge und des Innendurchmessers eines dort als zylindrisch angenommenen Probenröhrchens erforderlich. Da für das *AquaX* seitens Bruker BioSpin keine Angaben zum effektiven Durchmesser erhältlich sind und dieser sich auch in Kenntnis der Einzeldurchmesser der vier Kapillaren (≈ 1 mm) nicht trivial berechnen lässt [266], wurde anhand einer CM•-Standardreihe ein effektiver Durchmesser von 0,557 mm bei 40 mm Länge bestimmt indem der im *SpinFit*-Modul anzugebende Durchmesser per Intervallschachtelung (also in einem manuell schrittweise wiederholten Neuberechnungen der *SpinFit*-Anpassung) so gewählt wurde, dass *SpinFit* aus den Spektren hinter Abb. 3.13 für die Konzentration von 250 μM Maximalwerte nahe 250 μM CM• berechnete.

3.2.2 Einfluss von Umgebungsbedingungen auf die CM•-Bildungsrate zellfreier ESR-Proben

3.2.2.1 Einfluss der Umgebungstemperatur auf das ESR-Signal

Die Oxidationsrate von *Spin probes* hängt gemäß der Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur-Regel von der Temperatur ab. Infolge der Temperaturabhängigkeit der von der Boltzmann-Verteilung (Glg. 3.4) beschriebenen Besetzungswahrscheinlichkeit der Energieniveaus ist aber

auch die ESR-Absorption der Probe von der Temperatur abhängig. In diesem Kontext wurde der unmittelbare Einfluss der Umgebungstemperatur auf das Absorptionssignal flüssiger Proben anhand einer als Zeitreihe gemessenen, zellfreien CMH-Probe (0,5 mM) untersucht (Abb. 3.14). Diese war in einer O₂-permeablen Polymethylpenten (TPX)-Kapillare (Noxygen, Elzach) eingeschlossen, welche in dem im Resonator positionierten Kapillarhalter (*Capillary Holder*, Noxygen, Elzach) platziert wurde.

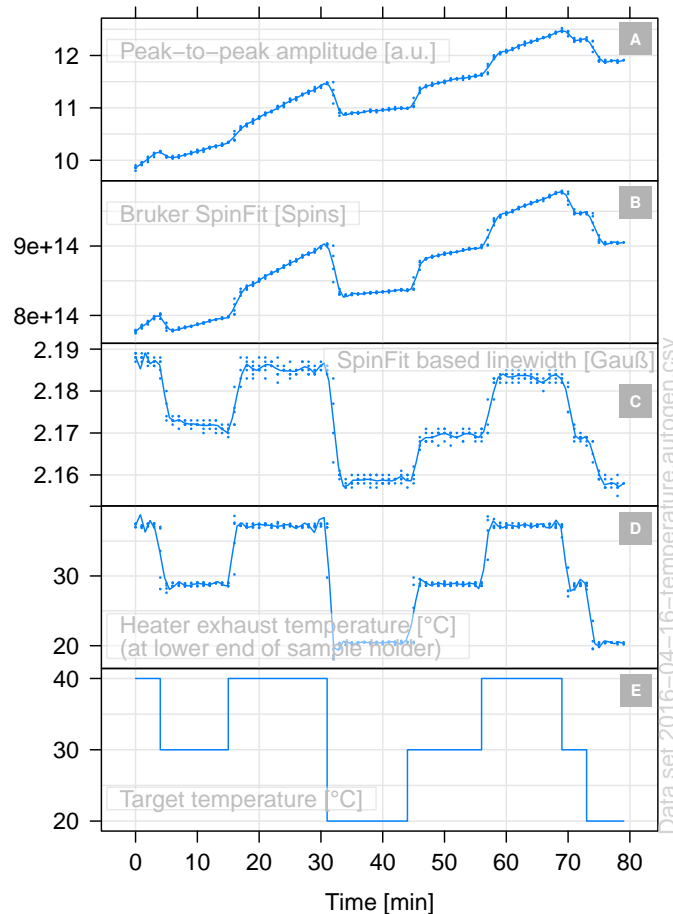
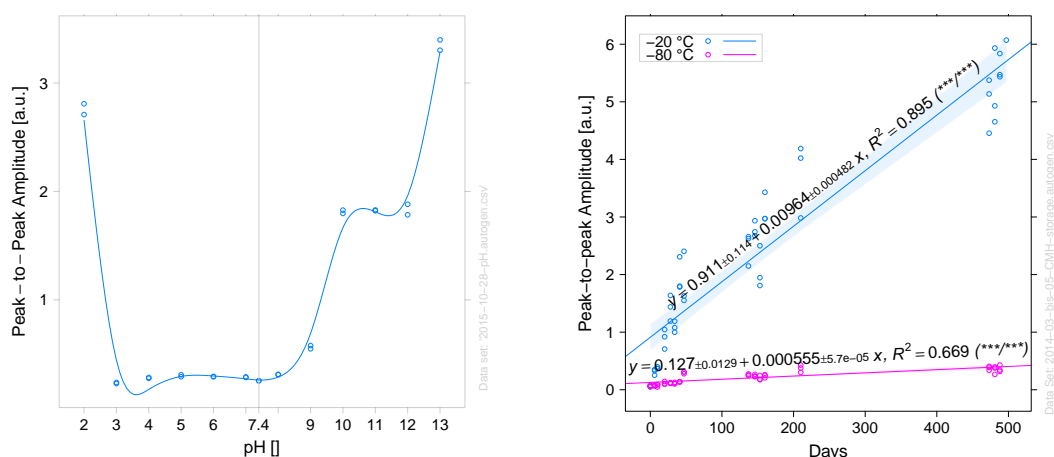


Abbildung 3.14: Einfluss der Temperatur auf das ESR-Signal von CM*. Das Absorptionssignal der zellfreien, flüssigen Probe wurde als Zeitreihe gemessen während die Temperatur der Probe manuell im Bereich zwischen 20 °C und 40 °C vorgegeben wurde (Panel D und E). Die Auswertung des ESR-Signals erfolgte nach der Peak-to-Peak- (Panel A) und der SpinFit-Methode (Panel B). Im Panel C ist die Linienbreite dargestellt. Heater exhaust temperature [°C] - am unteren Ende des Probenhalters gemessene Abgastemperatur, Target temperature [°C] - Zieltemperatur: manuell eingestellter Sollwert, Linewidth [Gauß] - Linienbreite.

Mittels des an den Probenhalter angeschlossenen Temperatur- & Gas-Controllers (Noxygen, Elzach) wurden die Temperaturen in einem Bereich zwischen 20 °C und 40 °C eingestellt. Das aus 21 % O₂ und 79 % N₂ zusammengesetzte Gas umströmte die unten verschlossene TPX-Kapillare (Abb. 3.14D und E). Die Auswertung des ESR-Signals erfolgte, wie in Abs. 3.2.1.1 beschrieben, sowohl als P2P-Distanz (Abb. 3.14A) als auch nach der *SpinFit*-Methode (Abb. 3.14B). Im mittleren Panel (Abb. 3.14C) ist die Änderung der Anzahl der *Spins/s* dargestellt. Unmittelbar nach einer Absenkung der Temperatur von 40 °C auf 30 °C bzw. 20 °C verringerte sich sowohl das ESR-Signal als auch die Linienbreite und stieg umgekehrt bei Anhebung der Temperatur wieder an (Abb. 3.14A und B).

3.2.2.2 Einfluss des pH-Wertes und der Lagerungstemperatur

Die Stabilität von CMH (0,5 mM, gelöst in KHB) in Abhängigkeit vom sauren oder basischen Charakter des KHB wurde in einem pH-Werte-Bereich von stark sauer (pH 2) bis stark alkalisch (pH 13) in zellfreien Proben untersucht. Die ESR-Messungen der Proben wurden im flüssigen Zustand durchgeführt. CMH ist zwischen pH 3,0 bis pH 8,0 stabil und schließt damit den für Zellkultur und ILU physiologischen pH-Wert von $\approx 7,4$ mit ein (Abb. 3.15a). Zwischen pH 8 bis pH 9 steigt die P2P-Amplitude langsam an. Bei einem extrem sauren pH von < 3 sowie alkalischen pH-Werten ≥ 9 ist hingegen ein steiler Anstieg der CM^\bullet -Bildungsrate zu verzeichnen (Abb. 3.15a).



(a) Einfluss des pH Wertes auf die Bildung von CM^\bullet von Flüssigproben

(b) Einfluss der Temperatur und Dauer der Lagerung auf die Autoxidation von CMH

Abbildung 3.15: (a) Einfluss des pH-Wertes auf die Stabilität zellfreier, flüssiger CMH-Proben (0,5 mM). Die Intensität des ESR-Signals wurde im pH-Bereich zwischen pH 2 und pH 13 bestimmt. Die durchgezogene blaue Linie ist ein zur Verdeutlichung des Kurvenverlaufs eingezogener Spline. ($n=2$) (b) Einfluss der Lagerungstemperatur auf die Stabilität von CMH. Ein Teil der CMH-Aliquots (0,5 mM) wurde bei -20°C , ein anderer bei -80°C eingelagert. Von März 2014 bis Juli 2015 wurden ESR-Messungen von jeweils 3 CMH-Aliquots pro Lagerungstemperatur an insgesamt 17 verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt (blau: -20°C , rot: -80°C). Days: Anzahl der Tage seit Beginn des Experiments. (****/****): Signifikanz des Intercept und Signifikanz der Steigung der Regressionsgeraden. **** : $p < 0,001$; *** : $p < 0,01$; ** : $p < 0,05$; ns : $p \geq 0,05$

Um einen möglichen Einfluss der Lagerungstemperatur auf die Autoxidation von CMH (0,5 mM, pH 7,4) zu untersuchen wurden eine Anzahl von 300 μl CMH-Aliquots in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei -20°C oder -80°C eingelagert und im Abstand von anfangs einer Woche jeweils drei pro Zeitpunkt gemessen (Abb. 3.15b). Die ESR-Messungen der zellfreien CMH-Aliquots wurden im Zeitraum von März 2014 bis Juli 2015 im gefrorenen Zustand durchgeführt. Bereits nach zwei Wochen war eine verstärkte Autoxidation der bei -20°C gelagerten Aliquots erkennbar. Nach vier Wochen Lagerung war der Anstieg des ESR-Signals der Aliquots, die bei -20°C eingelagert wurden, mehr als fünf Mal höher als der von Aliquots, die bei -80°C gelagert worden waren. Letztere Gruppe zeigte auch nach 16 Monaten einen nur schwachen Anstieg der Amplitude von 0,07 auf 0,36, wohingegen das ESR-Signal der bei -20°C gelagerten Aliquots von 0,07 auf ca. 5,6 anstieg. Damit war es zum selben Zeitpunkt gegenüber den bei

-80 °C gelagerten um mehr als das 15-fache erhöht (Abb. 3.15b).

3.2.2.3 O₂-Abhängigkeit des ESR-Signals zellfreier, flüssiger Proben

Für die Erfassung von im Sekundenbereich aufgelöster Zeitreihen kommen aus Handhabungsgründen fast nur *online*-Messungen in flüssiger Phase in Betracht. Besonders bei *ex vivo* Experimenten, die auf eine unterschiedliche Ausprägung der ROS-Produktion unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen zielen, ist eine Quantifizierung des Signals als Funktion der O₂-Konzentration von großer Bedeutung, weil damit eine Grundlage zur quantitativen Abgrenzung des physiologischen Signalanteils vom Einfluss der Autoxidation der *Spin probe* und dem durch verschiedene O₂-Konzentrationen bedingten Relaxationseffekt [267–270] auf die Signalhöhe geschaffen wird.

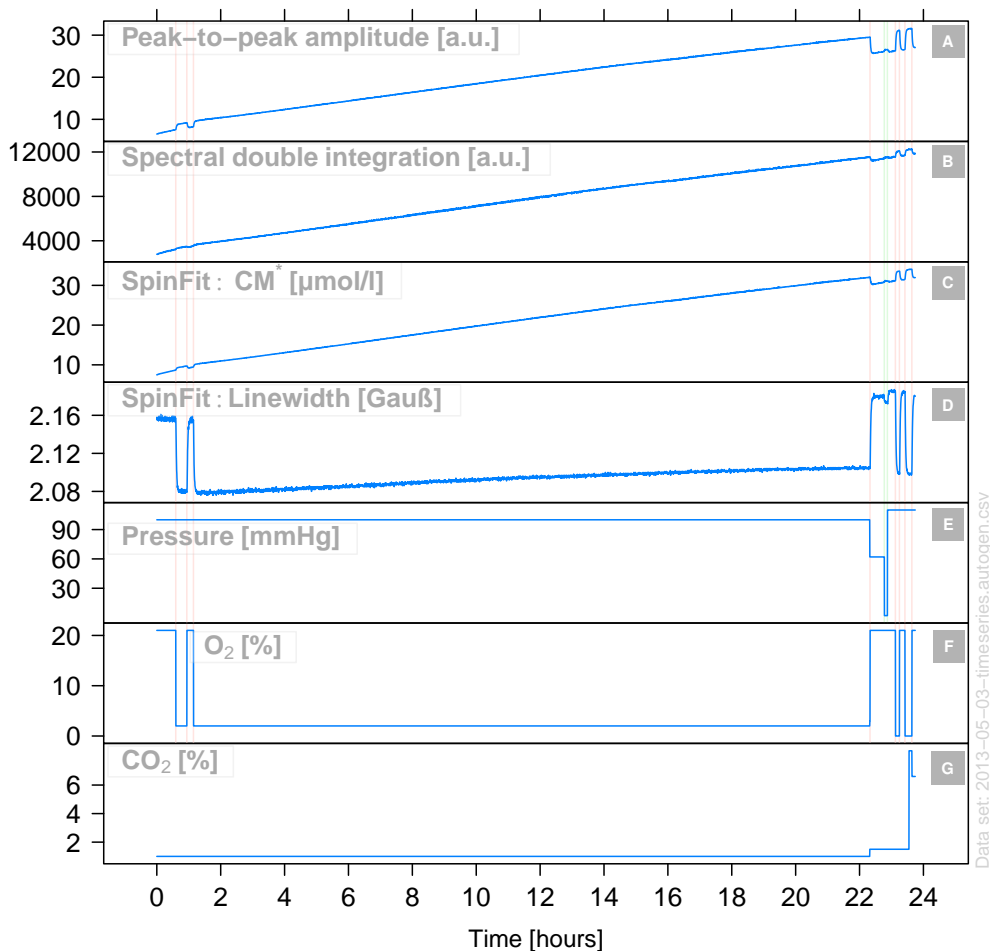
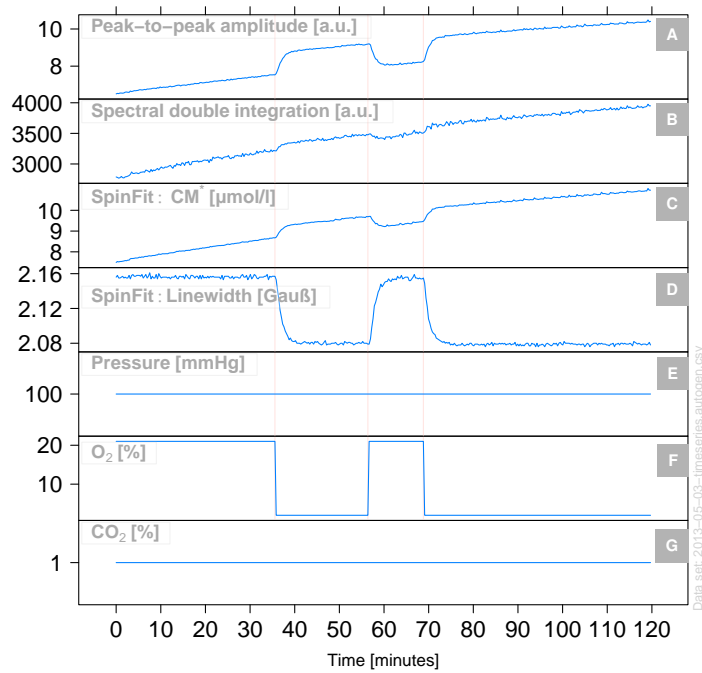
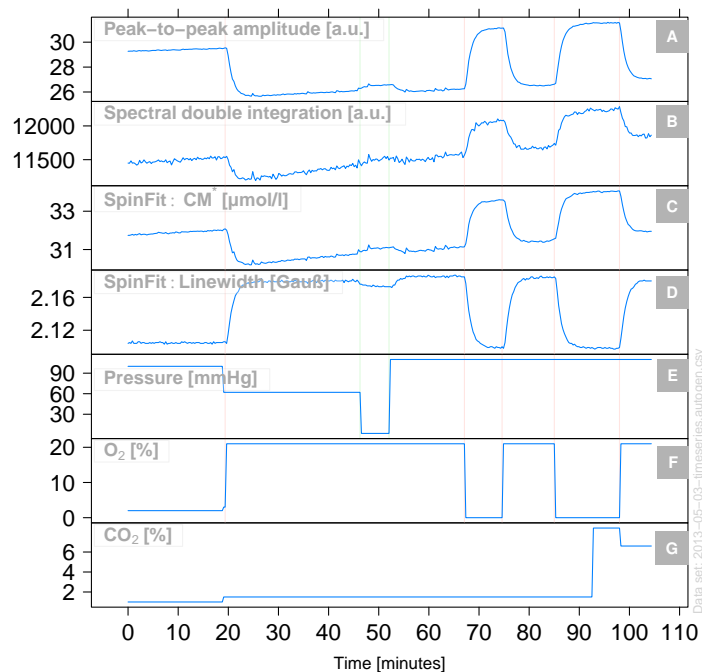


Abbildung 3.16: CMH-Zeitreihe über einen Versuchszeitraum von 24 h. Eine 0,5 mM CMH-Puffer-Lösung in einer gaspermeablen TPX-Kapillare wurde innerhalb des Resonators positioniert. Die Temperatur, die O₂- und CO₂-Konzentration sowie der Gasdruck des zugeführten Gases (Pressure) wurden mit Hilfe eines Gas- & Temperaturcontrollers variiert. Eine Erhöhung der O₂-Konzentration wie auch des Gasdruckes führten zu einer Verbreiterung der Linienbreite (Linewidth) sowie geringeren P2P-Amplituden und SpinFit-Werten. Die Werte hinter dem mit „Spektrale Doppelintegration“ bezeichneten Panel wurden mittels der in Abs. 2.7.9 beschriebenen Methode berechnet. Rote Hilfslinien: Zuordnung zu O₂-Flanken, grüne Hilfslinien: Zuordnung zu Druck-Flanken.



(a) Ausschnitt der ersten zwei Stunden



(b) Ausschnitt der letzten zwei Stunden

Abbildung 3.17: Ausschnitte der ersten und letzten zwei Stunden der in Abb. 3.16 dargestellten 24-stündigen CM^* -Zeitreihe. Eine Absenkung der O_2 -Konzentration von 21 % auf 1 % führte zu einem unmittelbaren Anstieg der P2P - Amplitude, der nach der SpinFit Methode bestimmten CM^* -Konzentration und zum Abfall der Linienbreite (Linewidth). Die CO_2 -Konzentration und der Druck (Pressure) scheinen keinen oder nur einen schwachen Einfluss auf das ESR-Signal zu haben.

Konzentration von 1 auf 21 % sowohl zu einer deutlichen Vergrößerung der Linienbreite als auch einer deutlich geringeren P2P-Amplitude führte (Abb. 3.16, Panel A und D). Entsprechend

Zur Durchführung wurden $50 \mu\text{l}$ einer zellfreien $0,5 \text{ mM}$ CMH-Lösung in einer gaspermeablen TPX-Kapillare im Resonator positioniert und über einen Zeitraum von 24 h im Abstand von $\approx 40 \text{ s}$ bei konstant 37°C gemessen. Temperatur, O_2 - und CO_2 -Konzentration sowie der Druck des zugeführten Gases wurden mit Hilfe eines Temperatur- & Gas-Controllers (Noxygen, Elzach) kontrolliert. Dieser Versuchsaufbau ermöglichte es, die genannten Parameter während des laufenden Experiments zu variieren (Abb. 3.16).

Die Analyse der Spektren erfolgte sowohl mittels der P2P-Methode (Abb. 3.16 bis 3.17b, Panel A) als auch des SpinFit-Moduls (Abb. 3.16 bis 3.17b, Panel C und D) des Xenon-Programms der Bruker Workstation unter Angabe des Innendurchmessers (ID) der zentral im Resonator positionierten TPX-Kapillare sowie der Höhe der darin stehenden Flüssigkeitssäule. Nachdem auch SpinFit den O_2 -Relaxationseffekt nicht vollständig ausgleichen konnte, wurde in den vom ersten und dritten Peak vorgegebenen Grenzen zusätzlich Doppelintegrale (Abb. 3.16 bis 3.17b, Panel B) aus den Einzelspektren berechnet.

Die Auswertung der Zeitreihe zeigt, dass eine Erhöhung der O_2 -

fürte eine Absenkung der O₂-Konzentration zu einem Anstieg der P2P-Amplitude und einer schmaleren Linienbreite, wie im Detail anhand von Abb. 3.17 (Panel **D**) nachvollzogen werden kann. Ein Effekt auf die Amplitude wurde auch bei Änderung des Drucks des zugeführten Gases beobachtet (Abb. 3.17b, Panel **E** vs. **D**). Eine Änderung der CO₂-Konzentration hatte hingegen keinen erkennbaren Einfluss (Abb. 3.17a, 3.17b, Panel **G**). Der Vergleich der O₂-bedingten Auslenkung anhand der hoch aufgelösten Abbildungen 3.17a und 3.17b zeigt auch, dass die Auslenkung des Signals von der zwischenzeitlich erreichten Signalthöhe abhängt. Abb. 3.17 zeigt eine durch Hypoxie induzierbare Variation des ESR-Signals von ca. 15 % des jeweilig erreichten Wertes für die P2P-Methode (bei 37 °C). *SpinFit* ist mit ca. 7 % etwas besser, während eine (modifizierte) Doppelintegration zwischen den beiden äußeren Linien des CM[•]-Spektrums den O₂-bedingten Relaxationseffekt noch besser ausgleichen kann. Allerdings ist der Signalverlauf dieser in Abs. 2.7.9 beschriebenen *ad hoc* Methode auch erkennbar rauher.

3.2.2.4 Dämpfung der O₂-bedingten Signalanteile (Pilotversuch)

Im Hinblick auf das nachfolgend beschriebene ILU-ESR-Experiment (Abs. 3.2.9) ist es von Interesse, den O₂-bedingten Signalanteil auf das ESR-Signal von der tatsächlich ROS-bedingten Veränderung der ESR-Amplitude unterscheiden zu können. Neben einer Modellierung des O₂-bedingten Signalanteils besteht eine Alternative darin, das Perfusat vor der ESR-Messung auf eine konstante O₂-Konzentration einzustellen, oder wenigstens die Amplitude der O₂-Konzentrationsschwankungen auf ein vertretbares Maß zu dämpfen. Deshalb wurde in einem separaten Versuch ein HPLC-Durchlaufentgaser (*Degasser*, Gynkotec, Germering) in das Proben-Zirkulationssystem vor das im ESR-Resonator positionierte *AquaX*-Kapillarbündel eingeschleift, um damit die Konzentration des in der Probe gelösten O₂ und dadurch auch die O₂-bedingte Signalauslenkung zu reduzieren (Skizze *Degasser*-Experiment Abb. 3.18).

Degasser enthalten einen mittels einer Vakuumpumpe kontinuierlich evakuierten Behälter, in den sehr lange, aus PTFE hergestellte Kapillaren eingesetzt sind, über deren dünne Wandung vornehmlich Wasserdampf, O₂ und CO₂ in Richtung Vakuum diffundieren. Der verwendete *Degasser* enthält drei Kanäle mit jeweils vier parallel geschalteten Kapillaren von jeweils 20 m Länge. Von den vorhandenen drei Kanälen wurde in diesem Pilotexperiment jedoch nur ein Kanal genutzt. Die Reihenschaltung mehrerer Kanäle würde die Effizienz der Gasabreicherung um den Preis einer entsprechend verlängerten Durchlaufzeit erhöhen. In den doppelwandig ausgeführten Perfusatbehälter wurden bei 37 °C abwechselnd normoxisches (21 % O₂, 5,3 % CO₂, Rest N₂) und hypoxisches Gas (1 % O₂, 5,3 % CO₂, Rest N₂) in eine CMH/0,9 % NaCl-Lösung eingeleitet (Panel **F**). Eine Peristaltikpumpe (Rollenpumpe) förderte diese Lösung durch einen nahe am *Degasser* montierten Wärmetauscher, durch den *Degasser* und das *AquaX* hindurch und dann zurück zum oberen Ende des Perfusatbehälters (Abb. 3.18). Um den Wirkungsgrad zu erhöhen wurde nahe am Eingang des *Degasser* ein Wärmetauscher eingebunden, da Diffusionsprozesse

bei erhöhter Temperatur schneller ablaufen.

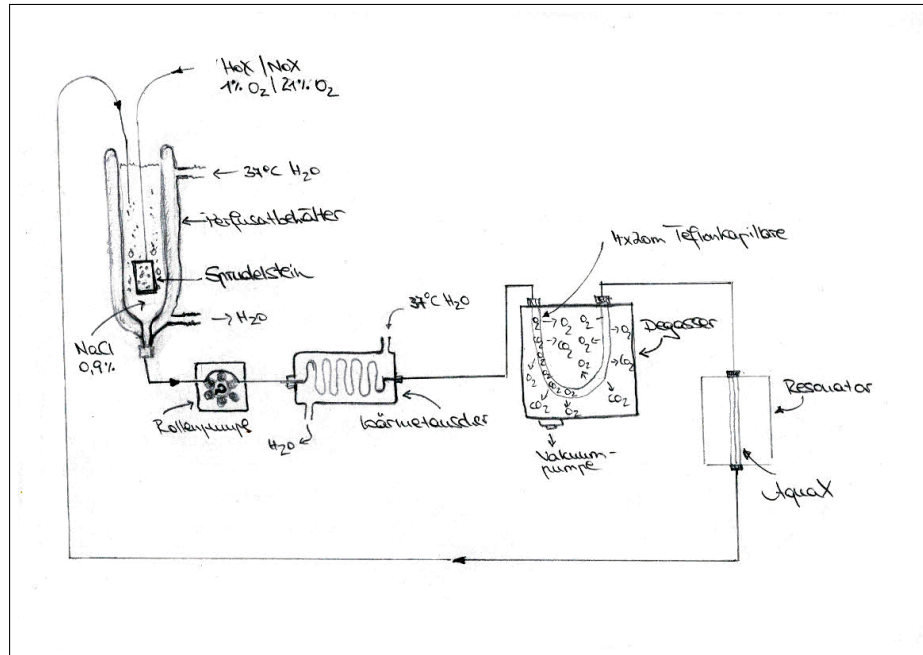
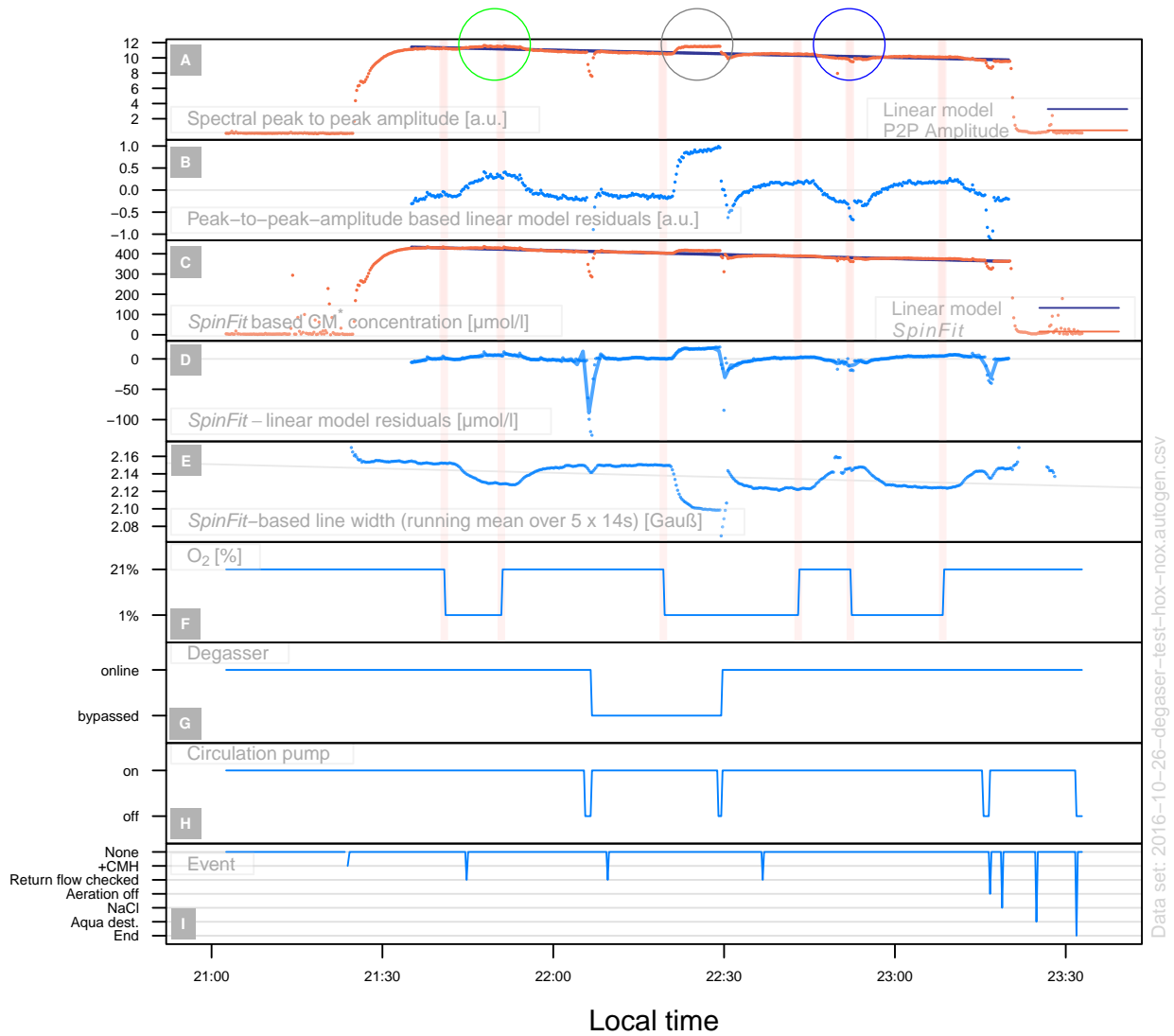


Abbildung 3.18: Skizze des Degasser-Pilotexperiments. Eine Peristaltikpumpe (Rollenpumpe) fördert die Lösung (z. B. Perfusat oder NaCl) durch einen nahe am Degasser montierten Wärmetauscher, durch den Degasser und das AquaX zurück zum oberen Ende des Perfusatbehälters.

Im Pilotexperiment (Abb. 3.19) war der *Degasser* fast während des gesamten Verlaufs in das ESR-Zirkulationssystem eingebunden (Panel G). Zwischen 22:10 und 22:30 Uhr wurde er manuell überbrückt. Anhand der in Abb. 3.19 dargestellten Ergebnisse der ESR-Zeitreihe, ist zu sehen, dass es mit Hilfe des *Degasser* möglich ist, das O₂-induzierte ESR-Signal auf ca. 25 % des Ausgangswertes zu dämpfen (Panel A und C).

Die in Abb. 3.19 Panel A grün eingekreisten Werte wurden unter Hypoxie bei eingebundenen *Degasser* gemessen. Die durch einen grauen Kreis markierten Messwerte wurden während einer Hypoxiephase erfasst, bei der kein *Degasser* eingeschleift war. Nach Wiedereinschalten des *Degassers* und der Wiederkehr normoxischer Verhältnisse zeigte sich eine Auslenkung nach unten, deren Verlauf ähnlich zur Hypoxie-Phase mit *Degasser* erscheint, aber dieser entgegengesetzt ist (blauer Kreis).

Zur Berechnung der Radikalkonzentration in absoluten Einheiten wurde die *SpinFit*-Parametrierung aus Abs. 3.2.2.3 genutzt, sodass sich sagen lässt, dass unter den gewählten experimentellen Bedingungen bei $\approx 37^\circ\text{C}$ und einer CM^\bullet -Konzentration von $400\ \mu\text{M}$ der maximale, rein durch den O₂-Relaxationseffekt bedingte Signalunterschied zwischen normoxischen und hypoxischen Bedingungen unter Verwendung des *AquaX* etwa $20\ \mu\text{M CM}^\bullet$ beträgt, und etwa $5\ \mu\text{M}$, wenn ein Kanal des *Gynkotek-Degassers* vorgeschaltet wird.



Data set: 2016-10-26-degasser-test-hox-nox-autogen.csv

Abbildung 3.19: Pilotexperiment: ESR-Zeitreihe mit und ohne in das ESR-Zirkulationssystem eingebundenen Degasser. (A) und (C) Die ESR-Signale wurden mittels P2P- und SpinFit-Methode ausgewertet. Die Datenpunkte werden als orange Punkte, die zugehörigen Werte eines für den Zeitraum zwischen 21:30 und 23:15 Uhr an die Messwerte angepassten linearen Modells als blaue Linie dargestellt. Die in Panel (A) grün eingekreisten Werte wurden unter Hypoxie bei eingebundenen Degasser gemessen. Die durch einen grauen Kreis markierten Messwerte wurden während einer Hypoxiephase erfasst, bei der kein Degasser eingeschleift war. Nach Wiedereinschalten des Degassers und der Wiederekehr normoxischer Verhältnisse zeigte sich eine Auslenkung nach unten, deren Verlauf ähnlich zur Hypoxie-Phase mit Degasser erscheint, aber entgegengesetzt ist (blauer Kreis). (B) und (D) Residuen – Differenz der SpinFit-basierten CM^{\bullet} -Konzentrationen und der zugehörigen Werte eines an den mittleren Verlauf der SpinFit-Messwerte angepassten linearen Modells. (E) SpinFit-basierte Linienbreite (F) Die zirkulierende $CMH/NaCl$ -Lösung wurde entweder hypoxisch (1% O_2) oder normoxisch (21% O_2) begast. (G) Der Degasser war während des gesamten Experiments außer zwischen 22:10 und 22:30 Uhr eingebunden. (H) Während der Einbindung und des Herausnehmens des Degassers wurde die Zirkulation ausgeschaltet. (I) Anzeige der während des Versuchs unternommenen Änderungen. Die kurzzeitigen Störungen im Signalverlauf (blaue Punkte) in Panel (A) bis (E) um den Zeitpunkt der Einbindung und des Herausnehmens des Degassers herum sind durch Luftblasen bedingt. Local time: Ortszeit

3.2.2.5 Einfluss der Hypoxie auf das ESR-Signal zellfreier, gefrorener Proben

Wie in Abs. 3.2.2.3 anhand einer zellfreien CMH-Lösung, die im flüssigem Zustand als Zeitreihe gemessen wurde, demonstriert werden konnte, hat die O_2 -Konzentration einen großen Einfluss auf das gemessene ESR-Signal.

Um den Effekt hypoxischer Bedingungen bei gefroren gemessenen Proben zu bestimmen, wurden mit CMH (0,5 mM, gelöst in KHB) inkubierte, ebenfalls zellfreie Versuchsansätze untersucht. Diese wurden entweder über die gesamte Versuchsdauer von 30 min unter Hypoxie (1 % O_2 , 0 % CO_2 , Rest N_2) oder 25 min unter Normoxie (21 % O_2 , 0 % CO_2 , Rest N_2) und weitere 5 min unter Hypoxie inkubiert (Skizze Abb. 3.20). Als Kontrollen dienten parallel dazu angefertigte und für 30 min unter Normoxie inkubierte Proben.

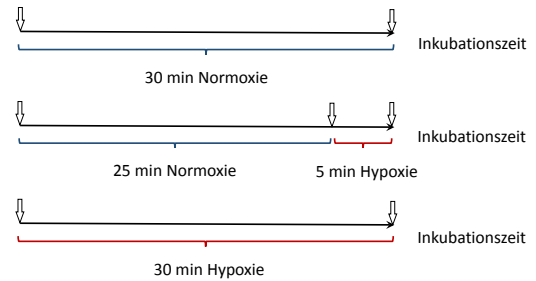
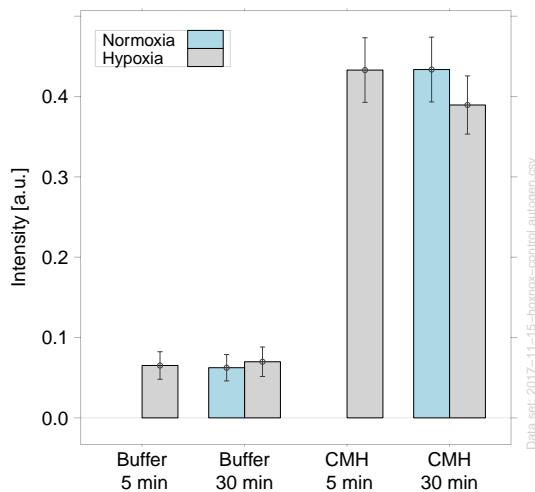
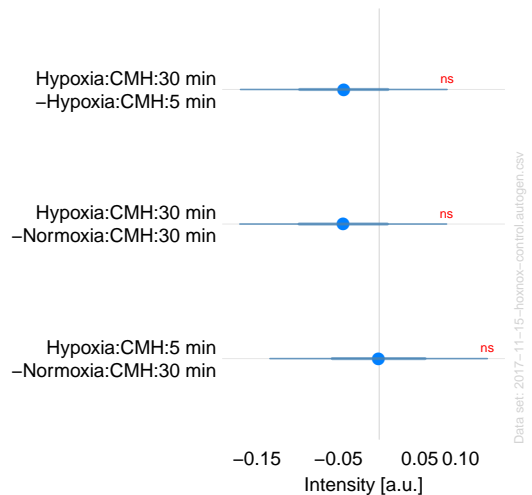


Abbildung 3.20: Schema der Inkubationszeiten von CMH unter Hypoxie und Normoxie. Die Inkubation erfolgte entweder über die gesamte Dauer von 30 min unter Hypoxie (1 % O_2) oder Normoxie (21 % O_2) bzw. für 25 min unter Normoxie und weitere 5 min unter Hypoxie.



(a) Einfluss der Hypoxie auf das ESR-Signal



(b) Effektdiagramm

Abbildung 3.21: Einfluss der O_2 -Konzentration auf die Basisaktivität der Spin probe CMH ($n=8$) (a) Zellfreie, mit CMH (0,5 mM) versetzte Proben wurden entweder 5 min oder 30 min unter Hypoxie (1 % O_2) bzw. unter Normoxie (21 % O_2) inkubiert (Skizze Abb. 3.20). (b) Effektdiagramm der Unterschiede zwischen hypoxischen und parallel angesetzten normoxischen Proben. Buffer - Krebs-Henseleit-Puffer, Abk.: ns - nicht signifikant

Bei gefrorenen Proben zeigte sich zwischen den hypoxischen Gruppen (5 min und 30 min Hypoxie) und den parallel dazu inkubierten normoxischen Kontrollen kein Unterschied in der Intensität der CM^\bullet -Signale (Abb. 3.21).

3.2.3 Einfluss der Zellkonzentration, Inkubationszeit und Passage

3.2.3.1 ROS-Produktion als Funktion der Zellkonzentration

Die Abhängigkeit sowohl der CM^\bullet - als auch der intra- und extrazellulären $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Produktion in Abhängigkeit von der Zellzahl wurde bei Konzentrationen von 10 000 bis 150 000 mPASC/300 μl ESR-Versuchsansatz im Vorversuch untersucht. Dafür wurden sowohl die SOD (50 U/ml, gelöst in KHB) als auch pSOD (50 U/ml, gelöst in KHB) eingesetzt. Der vornehmlich extrazelluläre $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Anteil am Gesamtsignal wurde als Differenz zwischen mit CMH und CMH+SOD, der totale $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Anteil als Differenz zwischen CMH und CMH+pSOD behandelten Proben ermittelt (Abb. 3.22b).

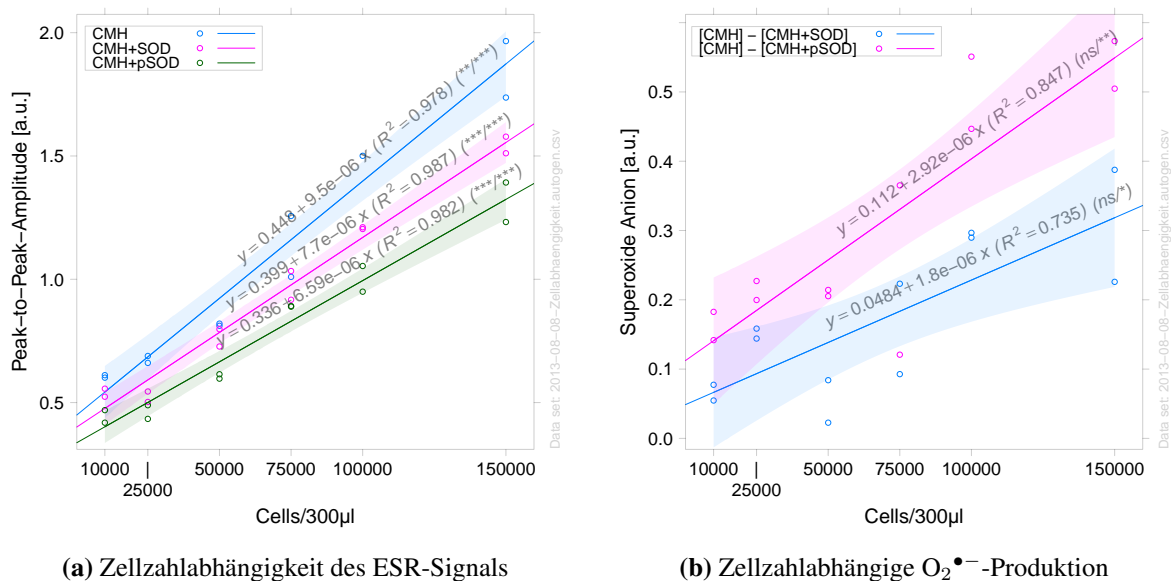


Abbildung 3.22: Quantifizierung der intra- und extrazellulären $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Bildung muriner PASC in Abhängigkeit von der Zellkonzentration im Bereich von 10 000 bis 150 000 PASC/300 μl . (a) Darstellung der anhand der P2P-Amplituden berechneten Regressionsgeraden für die absolute CM^\bullet -Intensität sowie der von Proben, denen zusätzlich die membrangängige pSOD oder die vorwiegend extrazellulär wirksame SOD zugegeben wurde. (b) Regressionsgeraden der Differenzen zwischen dem absoluten ESR-Signal abzüglich der mit CMH+pSOD oder CMH+SOD behandelten Proben. Die farbigen Fehlerbänder entsprechen den 95 % CIs der Regressionsgeraden. Sich nicht überlappende CIs weisen auf signifikante Unterschiede zwischen den Regressionsgeraden hin. (n=2) (***/**): Signifikanz des Intercept und Signifikanz der Steigung der Regressionsgeraden. *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$; ns : $p \geq 0,05$

Entsprechend der in Abb. 3.22 dargestellten Ergebnisse besteht zwischen der Zellzahl und der totalen CM^\bullet - bzw. der $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Produktion eine lineare Abhängigkeit. Bei einer Zellzahl von 100 000/300 μl inhibierte die SOD das CM^\bullet -Signal um ca. 15 %, die pSOD hingegen um ca. 35 % (Abb. 3.22a). Ab einer Zellzahl von $\geq 75 000/300 \mu\text{l}$ war die $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Konzentration in mit pSOD versetzten Proben deutlich höher als bei mit der extrazellulären SOD versetzten Proben (Abb. 3.22b). Da unter basalen Bedingungen die detektierten CM^\bullet - und $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Konzentrationen im Bereich von 10 000 bis 75 000 mPASC/300 μl gering sind, wurde sofern nicht anders angegeben, bei *in vitro* Experimenten auf 100 000 mPASC/300 μl Versuchsansatz normalisiert.

3.2.3.2 Nichtlinearität des CM^\bullet -Signals zwischen Null und 25 000 Zellen

In Abb. 3.23, welcher der gleiche Datensatz zugrunde liegt wie derjenige hinter Abb. 3.22, nur dass nun auch die zellfreien Kontrollen mit dargestellt wurden, lassen sich drei u. U. bedeutsame Phänomene beobachten: Ausgehend von einem höheren Signal bei Null Zellen verminderte sich das CM^\bullet -Signal in Gegenwart von Zellen bis zu einem bei $\approx 25\,000$ Zellen/300 μl gelegenen Wendepunkt, um danach mit der Zellkonzentration wieder linear anzusteigen. Zum zweiten verminderte die Zugabe von SOD das CM^\bullet -Signal bei Null Zellen. Drittens wies die Kombination von CMH mit pSOD bei Null Zellen ein etwa doppelt so hohes Signal auf wie CMH alleine auf, welches bei Vorhandensein von nur wenigen Zellen noch unter den Messwert von CMH+SOD abfiel.

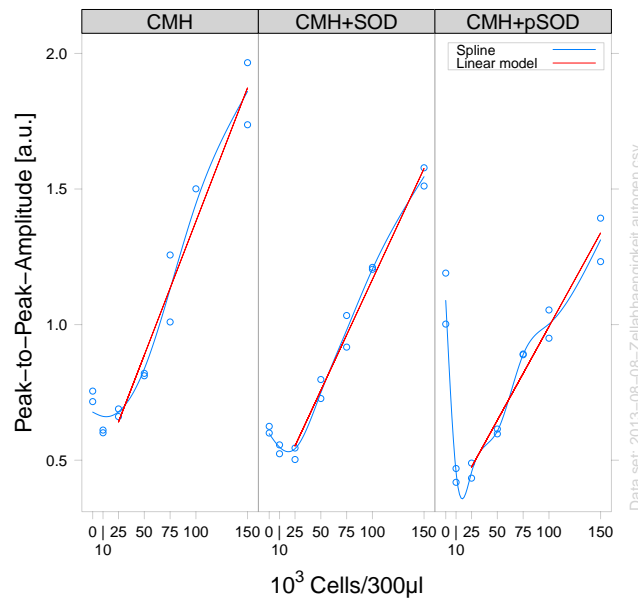


Abbildung 3.23: Nichtlinearer Verlauf des CM^\bullet -Signals zwischen 0 und 25 000 Zellen ($n=2$). Rot gezeichnet sind Regressionsgeraden im Bereich zwischen 25 000 und 150 000 Zellen. Die blau eingezeichneten Splines dienen zur Verdeutlichung des anfangs nichtlinearen Verlaufs.

3.2.3.3 $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Produktion als Funktion der pSOD-Inkubationszeit

Neben dem Zusammenhang zwischen der Zellkonzentration und der $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Produktion (Abs. 3.2.3.2) wurde auch der Einfluss der Inkubationsdauer der pSOD untersucht (Abb. 3.25a). Die mPASMIC (100 000/300 μl) wurden entweder 5, 15, 30, 45, 60 oder 90 min mit pSOD und anschließend für weitere

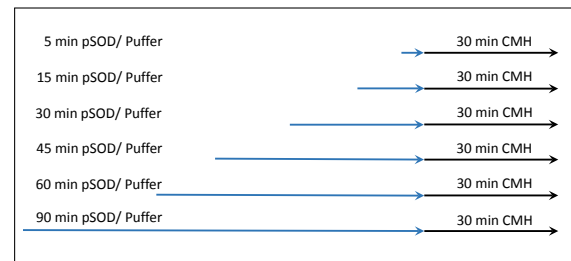
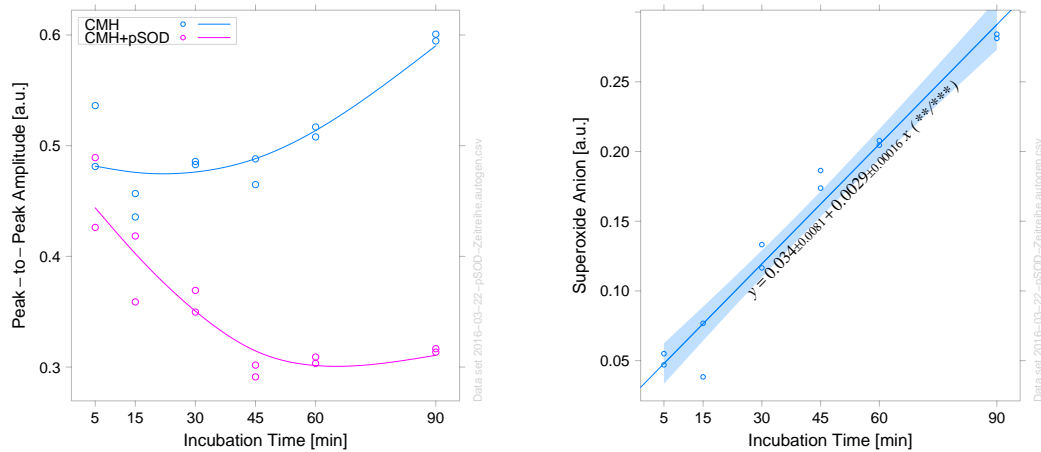


Abbildung 3.24: Inkubationsschema der pSOD-Zeitreihe.

30 min unter normoxischer Atmosphäre bei 37 °C mit CMH inkubiert (Zeitstrahl Abb. 3.24). Im Parallelexperiment wurden mPASMIC zunächst für die entsprechende pSOD-Inkubationszeit lediglich mit KHB und danach ebenfalls für 30 min mit CMH inkubiert (Abb. 3.25a).



(a) ESR-Signal in Abhängigkeit der pSOD-Inkubationszeit

(b) $O_2^{\bullet-}$ -Produktion in Abhängigkeit der pSOD Inkubationszeit

Abbildung 3.25: $O_2^{\bullet-}$ -Produktion in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer von pSOD ($n=2$). Murine PASCs wurden für 5, 15, 30, 45, 60 oder 90 min mit pSOD inkubiert und anschließend für weitere 30 min mit CMH versetzt (rote Punkte). Als Kontrollgruppe dienten Zellsätze, die für 5, 15, 30, 45, 60 oder 90 min zunächst nur in Puffer und anschließend für 30 min mit CMH inkubiert wurden (blaue Punkte). (a) Darstellung der CMH bzw. CMH+pSOD Zeitreihen. Die durchgezogenen Linien sind zur Verdeutlichung des exponentiellen Verlaufs eingezeichnete Splines. (b) Lineare Regression der $O_2^{\bullet-}$ -Produktion als Differenz zwischen CMH und CMH+pSOD in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer von pSOD der in Abb. (a) dargestellten Zeitreihen. Das blaue Fehlerband stellt das 95 % CI der Regressionsgeraden dar.

Die in Abb. 3.25 dargestellten Ergebnisse zeigen eine von der Inkubationszeit abhängige CM^{\bullet} und $O_2^{\bullet-}$ -Produktion von mPASCs bei einer Zelldichte von 100 000/300 μ l. Die Intensitäten der ESR-Signale der mit CMH+pSOD versetzten Proben fielen mit zunehmender Inkubationsdauer der pSOD exponentiell ab und erreichten nach ca. 60 min minimale Werte (Abb. 3.25a). Bei den Proben, die lediglich mit CMH versetzt wurden, stieg die Intensität des ESR-Signals hingegen exponentiell an (Abb. 3.25a). Ein Plateau wurde hier während der gesamten Versuchsdauer von 90 min nicht erreicht. Die $O_2^{\bullet-}$ -Produktion in Abb. 3.25b wurde als Differenz zwischen CMH und CMH+pSOD in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer von pSOD aus den in Abb. 3.25a dargestellten P2P-Amplituden errechnet. Die Differenz zwischen den zwei gegensätzlich exponentiell verlaufenden Funktionen der Inkubationszeit stellt sich als linearer Anstieg der $O_2^{\bullet-}$ -Konzentration über die Zeit dar (Abb. 3.25b).

3.2.3.4 Einfluss der Zellpassage auf die $O_2^{\bullet-}$ -Produktion von mPASCs

Eine erhöhte ROS-Freisetzung wird häufig im Zusammenhang mit Zellalterung und zellulärer Seneszenz erwähnt. Inwieweit die bei kultivierten Zellen beobachtete Seneszenz, welche mit zunehmender Anzahl an Passagen auftritt, mit einer veränderten ROS-Produktion einhergeht und ob dies ein Zellkultur-Phänomen ist oder mit der Zellalterung im intakten Organismus in Beziehung gesetzt werden kann, ist bislang nicht ausreichend untersucht worden. Hier sollte zunächst lediglich der Einfluss der Anzahl der Zellpassagen auf die $O_2^{\bullet-}$ -Produktion von mPASCs (100 000/ 300 μ l) bei Zellen der Passage P₀ (kultivierte Aussaat nach Zellisolation, Abs. 2.1.1),

P_1 (einfach passagierte Zellen) sowie P_2 und P_3 (zweifach und dreifach passagierte Zellen) untersucht werden. Die ESR-Probenvorbereitung erfolgte unter normoxischen Bedingungen nach Standardprotokoll (Abs. 2.5.1).

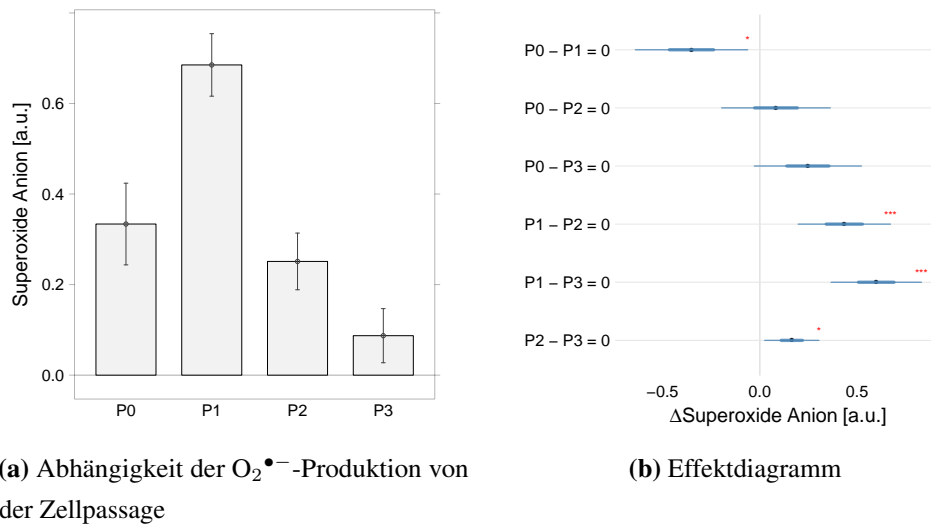


Abbildung 3.26: Einfluss der Passage auf die $O_2^{\bullet-}$ -Produktion von mPASC. (a) Nachdem von P_0 zu P_1 die $O_2^{\bullet-}$ -Konzentration von mPASC (100 000/300 μ l) zunächst steil ansteigt, fällt sie danach mit zunehmender Zellpassage ab. (b) Vergleiche der $O_2^{\bullet-}$ -Produktion zwischen den einzelnen Passagen. Abk.: P_0 - Aussaat 1 bis 3 nach Zellisolierung, P_1 - einfach passagierte Zellen, P_2 - zweifach passagierte Zellen, P_3 - dreifach passagierte Zellen. ($n=3-5$)

Das ESR-Signal von mPASC aus P_1 ist gegenüber Zellen aus P_0 signifikant und gegenüber Zellen in P_2 und P_3 hochsignifikant erhöht (Abb. 3.26), während sich P_0 und P_2 hinsichtlich der $O_2^{\bullet-}$ -Produktion kaum unterscheiden. Der Abfall der $O_2^{\bullet-}$ -Produktion von Zellen nach der dritten Passagierung ist deutlich geringer als der von P_1 zu P_2 .

3.2.4 Kompartiment-Spezifität von Hydroxylamin-*Spin probes*

Aufgrund der kurzen Halbwertszeit der meisten ROS ist es notwendig, diese nahe am Bildungsort nachzuweisen. Dies setzt idealerweise die Verfügbarkeit von Hydroxylamin-*Spin probes* voraus, welche in der Nähe der ROS-Quelle zu ESR-detektierbaren Nitroxiden oxidiert werden (Abb. 2.3). Es wurden vier verschiedene *Spin probes* getestet, die sich in Lipophilität und Polarität unterscheiden – Eigenschaften, welche die Zellpermeabilität von Substanzen beeinflussen [249]. Demnach sollen mittels CMH sowohl extrazelluläre, intrazelluläre als auch mitochondriale ROS/RNS, mittels CPH und PPH vorwiegend extrazelluläre ROS/RNS und mittels MitoTEMPO-H spezifisch mitochondriale ROS/RNS detektiert werden können (Abs. 3.1.6).

Der intra- und/oder extrazelluläre Radikalnachweis erfolgte mittels der *Spin probes* CMH, CPH, PPH oder MitoTEMPO-H in einer Konzentration von je 500 μ M (Standardprotokoll Abs. 2.5.1) bei CMT-Zellen (100 000/300 μ l). Die Nutzung der murinen pulmonalen Zelllinie CMT für die Durchführung der Versuche stellt zwar einen Kompromiss dar. Allerdings wären diese ansonsten nicht in dem Umfang realisierbar gewesen, da murine pulmonal-arterielle

Primärzellen nicht in ausreichender Anzahl verfügbar waren.

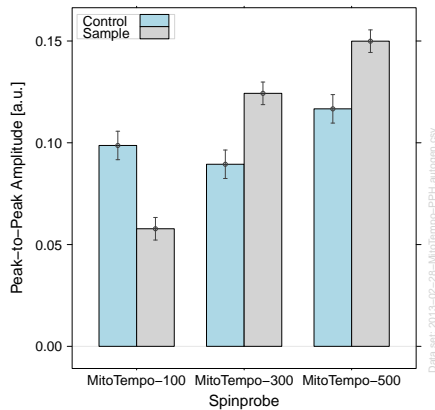
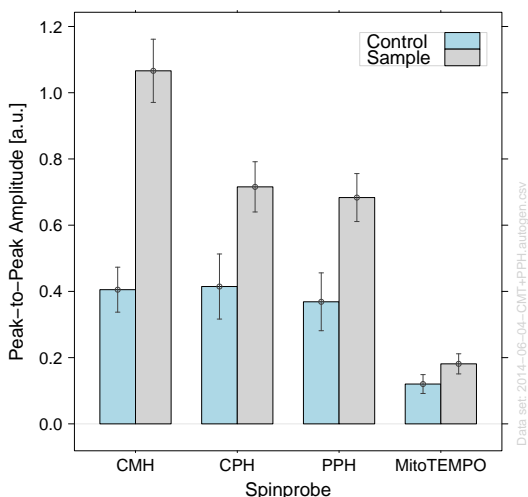


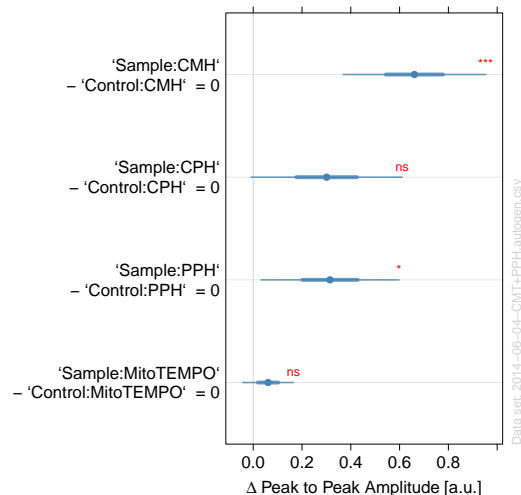
Abbildung 3.27: MitoTEMPO-H Konzentrationsreihe (n=3). CMT-Zellen (Sample) wie auch zellfreie Kontrollen (Control) wurden entweder mit einer Konzentration von 100 µM (MitoTEMPO-H-100), 300 µM (MitoTEMPO-H-300) und 500 µM (MitoTEMPO-H-500) MitoTEMPO-H versetzt. Es zeichnet sich ein linear konzentrationsabhängiger Effekt ab.

Da Dikalov et al. (2011), eine der wenigen Gruppen, die mit MitoTEMPO-H arbeiten, 50 µM des Hydroxylamins einsetzten [249], wurde abweichend vom Standardprotokoll zunächst ebenfalls diese Konzentration (anstatt der 500 µM) getestet. Allerdings konnte bei dem hier durchgeführten Vorversuch kein ESR-Signal detektiert werden, möglicherweise deswegen, weil Dikalov et al. Versuche an isolierten Mitochondrien und eben nicht an intakten pulmonalen Zellen durchführten. Deshalb wurden im nächsten Schritt verschiedene, höhere Konzentrationen von MitoTEMPO-H getestet (Abb. 3.27). Dabei zeigte sich eine konzentrationsabhängige MitoTEMPO[•]-Bildungsrate, wobei

die MitoTEMPO[•]-Konzentration bei einer eingesetzten MitoTEMPO-H-Konzentration von 500 µM im Vergleich zu 100 µM MitoTEMPO-H etwa dreimal so hoch war (Abb. 3.27). Insgesamt waren die P2P-Amplituden um 0,1 a.u. jedoch niedrig und bei 100 µM und 300 µM so stark verrauscht, weshalb in folgenden Versuchen 500 µM eingesetzt wurden. Obwohl die ESR-Intensitäten der Nitroxide (CM[•], CP[•], PP[•], MitoTEMPO[•]) vergleichbar hoch sind, wurden diese Daten lediglich aus Gründen der Übersichtlichkeit in einem Diagramm auf einer gemeinsamen Skala dargestellt (Abb. 3.28a). Wegen ihrer unterschiedlichen Diffusionseigenschaften sind die mittels der vier Spin probes erhaltenen Werte untereinander nicht direkt vergleichbar.



(a) P2P-Amplituden der Nitroxid-Radikale



(b) Effektdiagramm

Abbildung 3.28: Intra- und extrazelluläre ROS-Produktion in CMT-Zellen (n=3-6). Die Detektion erfolgte mittels Hydroxylamin-Spin probes CMH, CPH, PPH und MitoTEMPO-H in einer Konzentration von je 500 µM. (a) ESR-Signale der Nitroxide in Abwesenheit von pSOD (Sample). Als Kontrolle (Control) dienten zellfreie Ansätze, denen ebenfalls 500 µM Spin probe zugesetzt wurde. (b) Vergleiche zwischen zellhaltigen und dazugehörigen zellfreien Probenansätzen. *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$; ns : $p \geq 0,05$

Das ESR-Signal von CM^\bullet erschien im Vergleich zu CP^\bullet und PP^\bullet im Mittel ca. zweifach und gegenüber MitoTEMPO $^\bullet$ bis zu achtmal höher – wegen der unterschiedlichen Diffusionseigenschaften der aufgeführten *Spin probes* und den daraus resultierenden ungleichen intrazellulären Konzentrationen ist der Rückschluss auf durch die *Spin probes* erfasste ROS/RNS Konzentrationen jedoch unsicher.

Korrelation der ESR-Signale zwischen CM^\bullet und CP^\bullet , CM^\bullet und PP^\bullet oder CM^\bullet und MitoTEMPO $^\bullet$

Die Daten der in Abb. 3.28a dargestellten Ergebnisse wurden untereinander korreliert. Von jedem CMT-Zell-Batch waren mehrere Versuchsansätze mit jeder der vier *Spin probes* gemessen worden, was den Vergleich der P2P-Amplituden von CP^\bullet , PP^\bullet und MitoTEMPO $^\bullet$ (x-Achse) mit denjenigen von CM^\bullet (y-Achse) innerhalb desselben Batch ermöglicht (Abb. 3.29). Nach dem Auftragen der Vergleichswerte wurde eine Regressionsgerade eingezeichnet und der Korrelationskoeffizient r nach Pearson berechnet (Abs. 2.7.1). CP^\bullet und PP^\bullet korrelierten jeweils mit einem $r = 0,6$ mit den CM^\bullet -Vergleichswerten. Mit $r = 0,98$ ergab sich zwischen CM^\bullet und MitoTEMPO $^\bullet$ eine deutlich engere lineare Beziehung P2P-Amplituden.

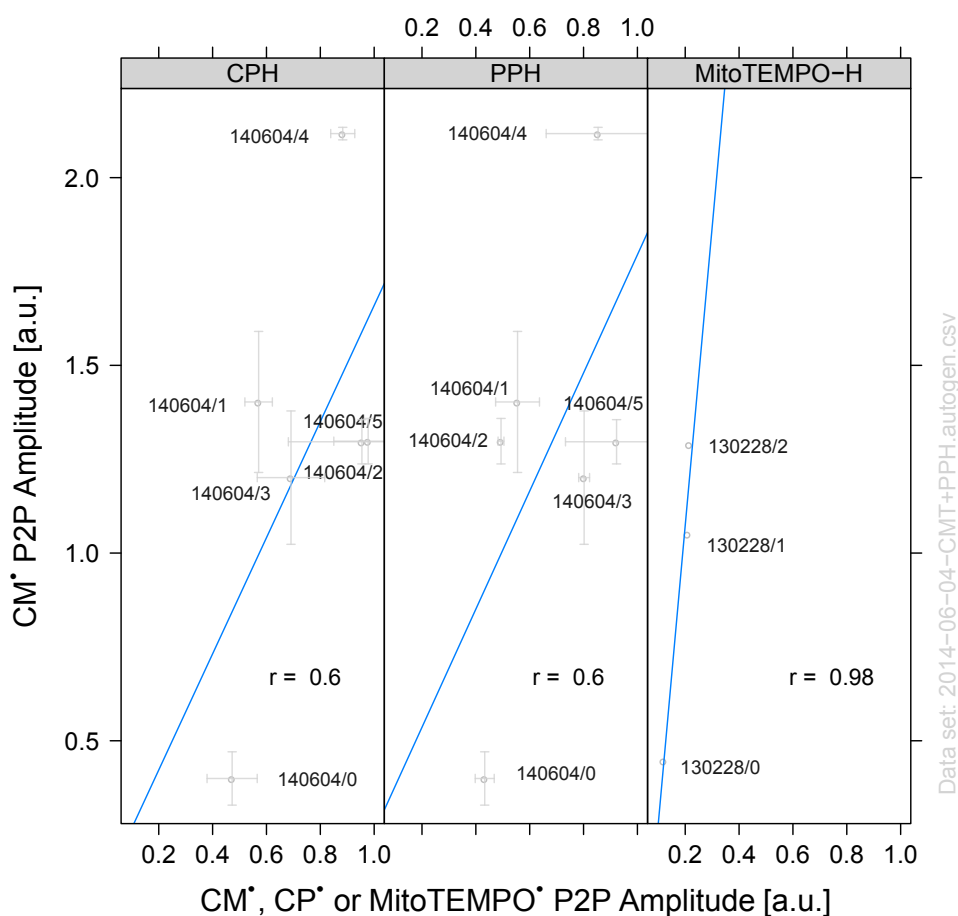
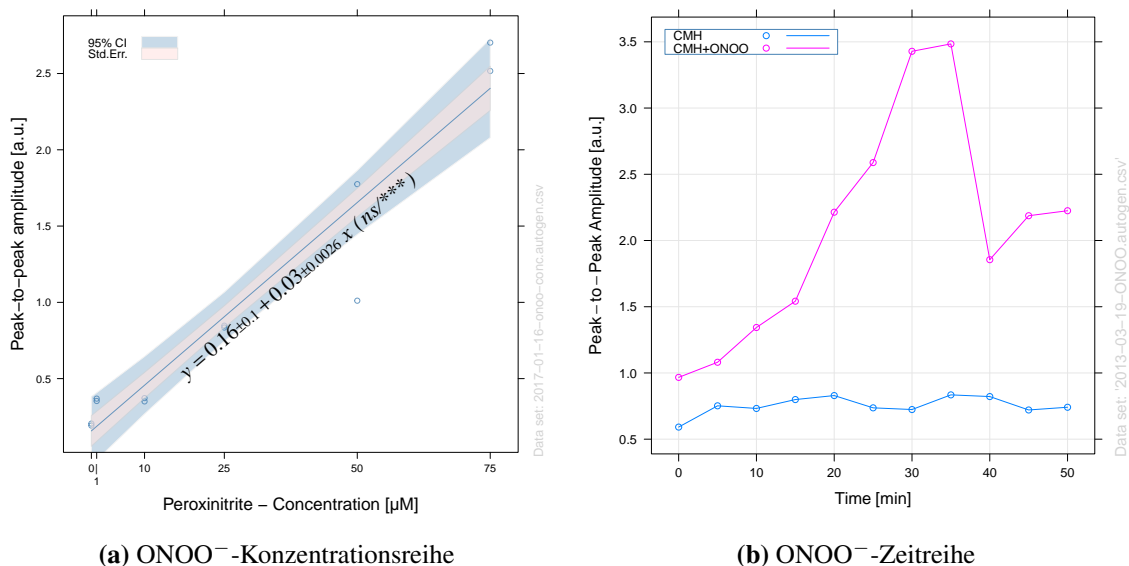


Abbildung 3.29: Korrelation zwischen CM^\bullet und CP^\bullet , CM^\bullet und PP^\bullet sowie CM^\bullet und MitoTEMPO $^\bullet$ ($n=3-6$). Die Korrelationen der P2P-Amplituden zwischen CM^\bullet mit den *Spin probes* CP^\bullet , PP^\bullet und MitoTEMPO $^\bullet$ wurden separat für jeden CMT-Zell-Batch durchgeführt. Nach dem Auftragen der Vergleichswerte wurde eine Regressionsgerade eingezeichnet und der Korrelationskoeffizient r nach Pearson berechnet. Die feinen grauen Kreuze stellen die Standardfehler der Mittelwerte dar; daneben eingedruckt sind die Bezeichner (Id) der CMT-Batches. Für CM^\bullet vs. MitoTEMPO $^\bullet$ lagen nur Einzelbestimmungen vor; weshalb Standardfehler dort nicht berechnet werden konnten.

3.2.5 Nachweis nichtradikalischer reaktiver Spezies

3.2.5.1 Nachweis von Peroxinitrit

Der Nachweis, dass CMH nicht nur durch $O_2^{\bullet-}$, sondern auch durch andere ROS/RNS zu stabilen Nitroxiden oxidiert werden kann, wurde durch Anwendung von $ONOO^-$ geführt (Abb. 3.30). Die Konzentration von $ONOO^-$ in 0,3 M NaOH wurde spektrometrisch bei einem Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{302\text{ nm}} = 1670 \text{ [M}^{-1} \text{ cm}^{-1}]$ bestimmt (BioSpectrometer, Eppendorf, Hamburg). In zellfreien Ansätzen wurde zunächst eine Konzentrationsreihe von 0, 1, 10, 25, 50 und 75 μM $ONOO^-$ zusammen mit CMH (0,5 mM gelöst in KHB) erstellt. Die Proben wurden jeweils für 30 min bei 37 °C inkubiert und im Anschluss schockgefroren. Im Konzentrationsbereich von 0 bis 75 μM $ONOO^-$ zeigte sich ein mit der $ONOO^-$ -Konzentration linear ansteigendes ESR-Signal (Abb. 3.30a).



(a) $ONOO^-$ -Konzentrationsreihe

(b) $ONOO^-$ -Zeitreihe

Abbildung 3.30: Konzentrations- und zeitabhängige CM^{\bullet} -Bildung in Gegenwart von $ONOO^-$. (a) Linearer Anstieg des ESR-Signals im Konzentrationsbereich von 0 bis 75 μM $ONOO^-$ ($n=2$). Rötliches Fehlerband: Standardfehler, blaues Fehlerband: 95% CI. (b) Exponentieller Anstieg des ESR-Signals von mit $ONOO^-$ (100 μM) inkubierten Proben während der ersten 30 min (rote Linie) ($n=1$). Ca. 40 min nach Beginn der Inkubation mit $ONOO^-$ ist ein Zusammenbruch des ESR-Signals auf 40 bis 50% des Maximalwerts zu beobachten. Die Amplituden der Kontrollgruppe (blaue Linie) blieben über den gesamten Inkubationszeitraum stabil.

In ebenfalls zellfreien Ansätzen wurde die Oxidation von CMH zu CM^{\bullet} durch $ONOO^-$ (100 μM) als Zeitreihe zu 11 verschiedenen Zeitpunkten zwischen 0 und 50 min bestimmt (Abb. 3.30b). Als Negativkontrollen dienten Proben, die lediglich mit CMH inkubiert wurden. Innerhalb der ersten 30 min stieg die Bildung von CM^{\bullet} exponentiell an und blieb für kurze Zeit konstant. Nach ca. 35 Minuten zeigte sich ein steiler Einbruch des ESR-Signals auf 40 bis 50% des Maximalwerts.

3.2.5.2 Nachweis von Hydrogenperoxid mittels *Spin probe* HHTIO

Da *Spin probes* nicht direkt mit H_2O_2 reagieren [250], wurde die durch Matsuo et al. entwickelte p-AP/HHTIO-Methode zum H_2O_2 -Nachweis mittels ESR angewandt [271] und eine H_2O_2 -Konzentrationsreihe im Bereich von 0 und 100 μM in zellfreien Proben erstellt.

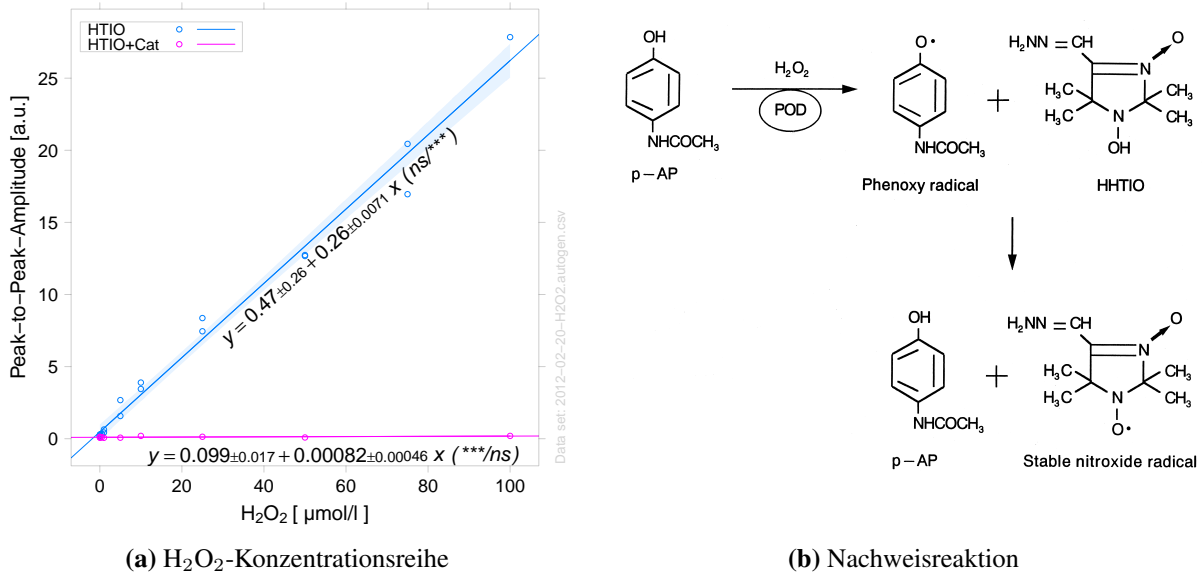


Abbildung 3.31: Nachweis von H_2O_2 mittels *Spin probe* HHTIO. (a) Linearer Anstieg des ESR-Signals mit zunehmender H_2O_2 -Konzentration (blaue Linie). H_2O_2 konnte komplett durch Cat (500 U/ml) zu H_2O und O_2 umgesetzt werden (rote Linie). Die farbigen Fehlerbänder entsprechen dem 95 % CI. (b) Zugrundeliegende chemische Reaktionen. In Gegenwart von H_2O_2 werden aus p-AP Phenoxyradikale in einer durch POD katalysierten Reaktion gebildet. Diese reagieren mit HHTIO zu stabilen Nitroxiden (HTIO•), welche mittels ESR nachgewiesen werden können ($n=2$). Modifiziert nach Matsuo et al. [271]. Abk.: Cat - Katalase, POD - Peroxidase

In der Peroxidase (POD)-katalysierten Reaktion wird aus p-Acetamidophenol (p-AP) in Gegenwart von H_2O_2 ein Phenoxyradikal gebildet. Die Hydroxylamin-*Spin probe* HHTIO wird durch das Phenoxyradikal zu einem stabilen Nitroxid (HTIO•) oxidiert. Die Peroxidase-Aktivität kann durch ESR-Detektion von HTIO• quantifiziert werden (Abb. 3.31b). Zur Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit des ESR-Signals von der H_2O_2 -Konzentration wurden 5, 10, 25, 50, 75 und 100 μM H_2O_2 in zellfreiem KHB hergestellt. Nach Zugabe eines Gemisches aus 0,5 mM HHTIO (gelöst in 5 μM DMSO), p-AP (50 μM) und POD (0,1 mg/ml) wurden die Proben für 30 min bei 37 °C inkubiert. Mit Ausnahme der *Spin probe* wurden alle Substanzen in KHB (pH 7,4) gelöst. Zur Überprüfung, ob das ESR-Signal H_2O_2 -spezifisch ist, wurden im Parallelexperiment Proben zusätzlich mit Cat (500 U/ml) inkubiert. Nach Inkubationsende wurden alle Proben in Flüssigstickstoff schockgefroren.

In diesem Experiment konnte mit zunehmender H_2O_2 -Konzentration (blaue Linie) ein linearer Anstieg des ESR-Signals nachgewiesen werden (Abb.3.31a). H_2O_2 konnte komplett durch Cat zu H_2O und O_2 umgesetzt werden (rote Linie).

3.2.6 Spin trapping mittels BMPO und DEPMPO

Eine interessante Alternative zu *Spin probes* ist der ESR-spektroskopische ROS/RNS-Nachweis mittels *Spin traps* (Abs. 3.1.6). Im Unterschied zu *Spin probes* können durch *Spin traps* paramagnetische Spezies direkt anhand des ESR-Spektrums identifiziert und quantifiziert werden, da verschiedene ROS/RNS zu spezifischen *Spin trap*-Addukten reagieren. Die derzeit aufgrund einer längeren Halbwertszeit und besseren Addukt-Stabilität bei einem physiologischen pH häufig eingesetzten *Spin traps* sind die auch in dieser Arbeit verwendeten DEPMPO und BMPO (chemische Strukturen Abb. 2.4). Die Substanzen werden als zellpermeabel beschrieben und zum intra- und extrazellulären $O_2^{\bullet-}$ - und $\bullet OH$ -Nachweis verwendet [225, 272].

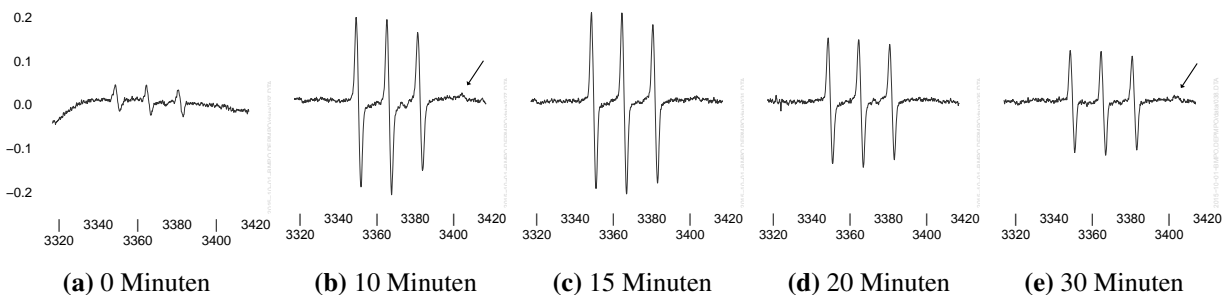


Abbildung 3.32: Im flüssigen Zustand gemessene Spektren der BMPO-Addukte zum Start des Experiments sowie nach einer Inkubationszeit von 10, 15, 20 und 30 min (n=2). Die Amplituden der BMPO-OOH Spektren wurden nach der P2P-Methode analysiert und in Abb. 3.33 dargestellt. Der Pfeil in den Abb. 3.32b und 3.32e weist auf das in der Reaktion mit $\bullet OH$ gebildete Addukt BMPO-OH hin. x-Achse: Magnetfeld [Gauß], y-Achse: ESR-Intensität [a.u.]

DEPMPO und BMPO wurden in diesem Vorversuch jeweils in einer Konzentration von 10 mM (gelöst in KHB, pH 7,4) eingesetzt. Als Referenz wurde die in den meisten ESR-Experimenten dieser Arbeit eingesetzte *Spin probe* CMH (0,5 mM, gelöst in KHB) mitgeführt. Die ROS/RNS-Detektion von MLF (100 000/300 μl) erfolgte unter basalen unstimulierten Bedingungen.

Unmittelbar nach Zugabe von BMPO, DEPMPO oder CMH (Zeitpunkt Null der Zeitreihe) sowie nach einer Inkubationszeit von 10, 15, 20 und 30 min wurden die Proben genommen. Die ESR-Messungen

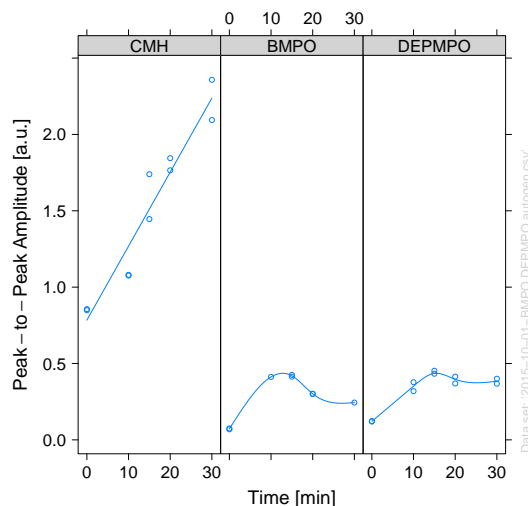


Abbildung 3.33: ROS/RNS-Nachweis mittels *Spin probe* CMH sowie der *Spin traps* BMPO und DEPMPO in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei MLF. Die Konzentrationen von CM^{\bullet} und der *Spin trap*-Addukte BMPO-OOH und DEPMPO-OOH wurden mittels der P2P-Methode ausgewertet (n=2). Die Spektren der BMPO-Zeitreihe (Mitte) sind in Abb. 3.32 abgebildet. Abk.: MLF - murine Lungenfibroblasten

der Zeitreihe erfolgten direkt nach Beendigung der Inkubationszeit im flüssigen Zustand. Abb. 3.32 zeigt die ESR-Spektren der ROS/RNS-Addukte von BMPO über einen Zeitraum von 30 min. Nach einer Inkubationszeit von 15 min erreicht das detektierte ESR-Signal ein

Maximum. Danach zerfällt das BMPO-OOH-Addukt relativ schnell (Abb. 3.32). Der Pfeil in den Abb. 3.32b und 3.32e weist auf das in der Reaktion mit $\bullet\text{OH}$ gebildete Addukt BMPO-OH hin. Diese Linie ist jedoch ohne ein passendes Modell nicht sicher auswertbar, da sie sich kaum vom Rauschen abhebt und sich somit Maxima und Minima nicht sicher zuordnen lassen.

In Abb. 3.33 sind die Konzentrationen von $\text{CM}\bullet$ und der *Spin trap*-Addukte BMPO-OOH und DEPMPO-OOH dargestellt, welche mittels der P2P-Methode ausgewertet wurden. Im Vergleich zu BMPO zeigt DEPMPO einen flacheren Anstieg des ESR-Signals mit der Zeit und ist ebenfalls nach 15 min maximal. Der Zerfallsprozess des DEPMPO-Adduktes ist über den beobachteten Zeitraum marginal, was auf eine höhere Stabilität gegenüber der von BMPO-Addukten schließen lässt. Die Bildungsrate von $\text{CM}\bullet$ steigt linear über den gesamten Inkubationszeitraum von 30 min an.

3.2.7 Hypoxie-induzierte ROS-Produktion pulmonaler Zellen

Ziel der Experimente des folgenden Abschnitts war die Untersuchung des Hypoxieeinflusses als potentiellen Mediator von oxidativem Stress in pulmonalen Zellen. Die Ergebnisse des Abschnitts sind mehrheitlich Teil der Publikation von Pak und Scheibe et al. (2018) [227]. Die Experimente wurden, sofern nicht anders erwähnt, wie in Abs. 2.5.1 und 2.5.2 beschrieben durchgeführt und im gefrorenen Zustand gemessen (Abs. 2.5.3).

3.2.7.1 Zelltypspezifischer Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die ROS-Produktion unter akuter Hypoxie

Sowohl mPASMCs als auch MLFs wurden akuter Hypoxie (5 min) ausgesetzt und entweder bei 1, 5, 10 oder 15 % O_2 inkubiert. Als Kontrollen dienten mPASMCs bzw. MLFs, die über den gleichen Zeitraum unter normoxischen Bedingungen (21 % O_2) inkubiert wurden. mPASMC, die für 5 min 1 % O_2 ausgesetzt waren, zeigten das höchste ESR-Signal, sowohl hinsichtlich der $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Produktion als auch der von $\text{CM}\bullet$. Im Vergleich zu der bei 21 % O_2 inkubierten Kontrollgruppe war der Unterschied im Gegensatz zu allen anderen Behandlungsgruppen hochsignifikant verschieden (Abb. 3.34b und Abs. 3.34d). Das niedrigste ESR-Signal wurde bei 15 % O_2 detektiert (Abb. 3.34a). Nahezu spiegelbildlich stellten sich die Ergebnisse aus den ESR-Messungen bei MLFs dar. Murine Fibroblasten zeigten mit einem zunehmenden Absinken des pO_2 ein damit einhergehenden Abfall des $\text{O}_2^{\bullet-}$ - und $\text{CM}\bullet$ -Signals (Abb. 3.34a). Die niedrigsten wurden bei 1 % nominalen O_2 detektiert.

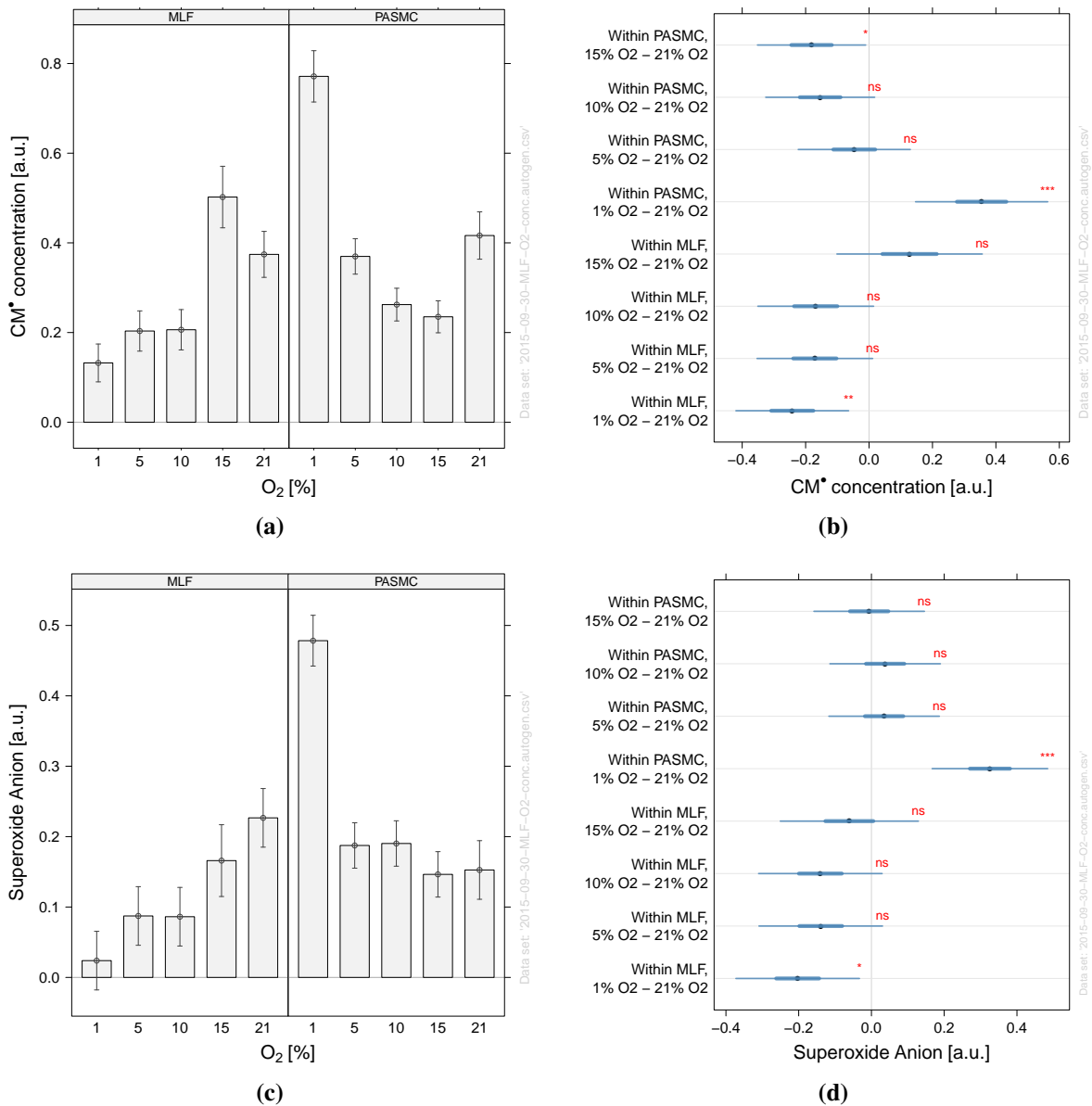


Abbildung 3.34: Effekt des O₂-Partialdrucks auf die CM•-Konzentration von MLF und mPASC (n=3). (a) CM•-Konzentration detektiert bei MLF und mPASC unter 1, 5, 10, 15 und 21 % O₂. (b) Vergleiche der gemessenen CM•-Konzentrationen bezogen auf die CM•-Bildung unter Normoxie des jeweiligen Zelltyps in Abhängigkeit von der O₂-Konzentration. (c) O₂^{•-}-Konzentration von MLF und mPASC bei 1, 5, 10, 15 und 21 % O₂. (d) Vergleiche der detektierten O₂^{•-}-Konzentrationen bezogen auf die O₂^{•-}-Freisetzung der normoxischen Proben des jeweiligen Zelltyps in Abhängigkeit von der O₂-Konzentration. Die O₂^{•-}-Konzentrationen wurden als Differenz zwischen dem CM•-Signal (Abb. 3.34a) und der Amplitude der mit pSOD behandelten Parallelansätze bestimmt. Balkendiagramme: Dünne Linien repräsentieren den gepoolten Standardfehler. Effektdiagramme: Dicke Linien repräsentieren den Standardfehler der Differenz der Gruppenmittelwerte, dünne Linien das zugehörige 95% CI. *** : p < 0,001; ** : p < 0,01; * : p < 0,05; ns : p ≥ 0,05. Abk.: MLF - murine Lungenfibroblasten, mPASC - murine pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen

3.2.7.2 Einfluss prolongierter und chronischer Hypoxie auf die ROS/O₂^{•-}-Bildung von murinen PASMCM

Der Einfluss der Dauer der Hypoxie-Exposition auf die ROS/O₂^{•-}-Bildung von mPASMCM wurde unter prolongierter Hypoxie (3 h, 1 % O₂) und chronischer Hypoxie (48 h bzw. 120 h; 1 % O₂) mittels ESR-Spektroskopie untersucht (Abs. 3.35).

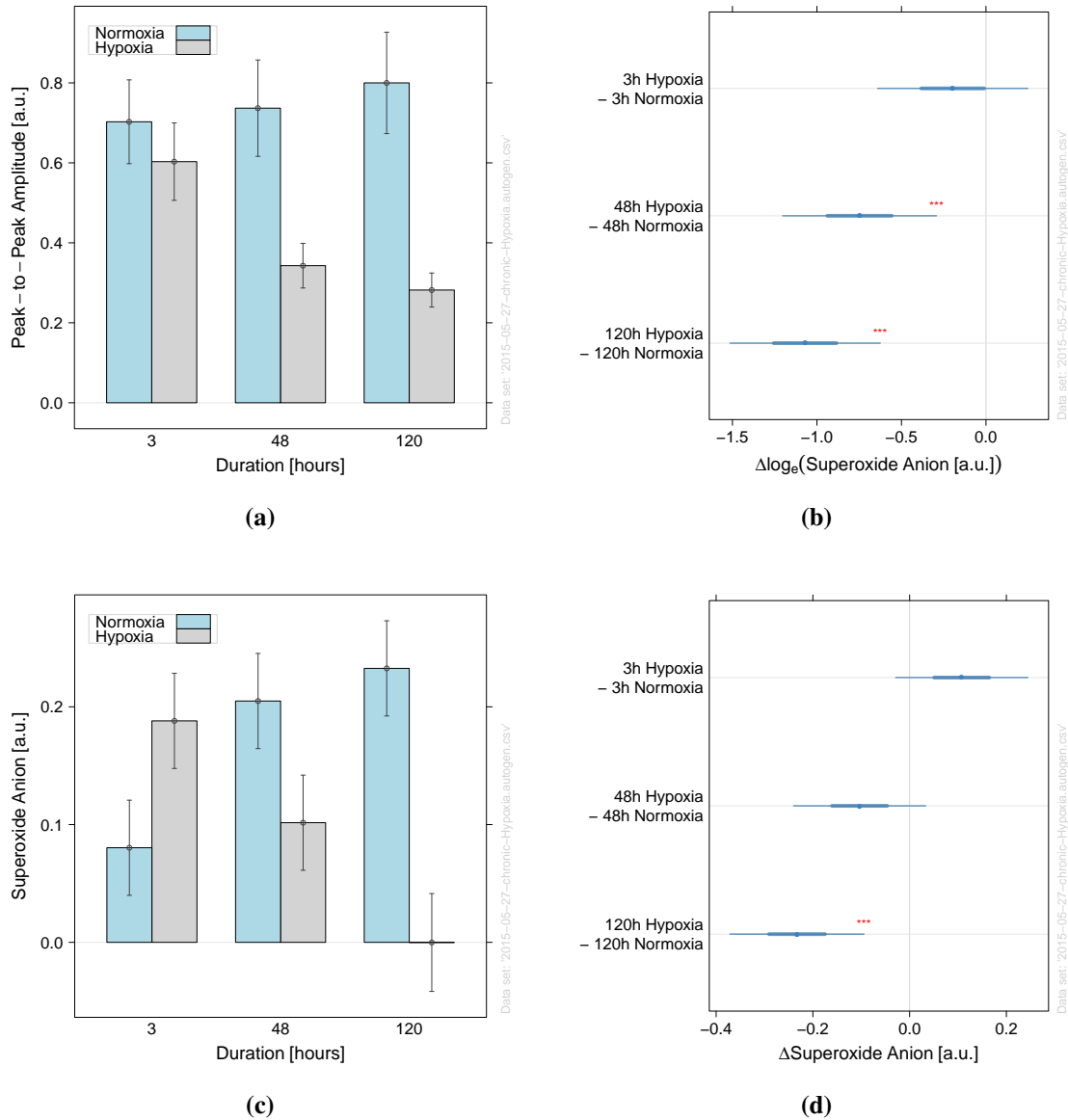


Abbildung 3.35: Einfluss der Hypoxiedauer auf die ROS/O₂^{•-}-Bildung von mPASMCM nach 3, 48 und 120 h Inkubation bei 1 % O₂ (Hypoxie) oder 21 % O₂ (Normoxie) (n=6). Die O₂^{•-}-Konzentrationen wurden mittels ESR-Spektroskopie als Differenz zwischen dem CM[•]-Signal und der Amplitude der mit pSOD behandelten Parallelansätze bestimmt. **(a)** Darstellung der mittels ESR gemessenen CM[•]-Konzentrationen. **(b)** Vergleiche der CM[•]-Bildung zwischen Normoxie und Hypoxie bei identischen Zeitpunkten. **(c)** Darstellung der mittels ESR gemessenen O₂^{•-}-Konzentrationen. **(d)** Vergleiche der O₂^{•-}-Freisetzung zwischen Normoxie und Hypoxie bei identischen Zeitpunkten. Balkendiagramme: Dünne Linien repräsentieren den gepoolten Standardfehler. Effektdiagramme: Dicke Linien repräsentieren den Standardfehler der Differenz der Gruppenmittelwerte, dünne Linien das zugehörige 95% CI. *** : p < 0,001; ** : p < 0,01; * : p < 0,05; ns : p ≥ 0,05 Abk.: MLF - murine Lungenfibroblasten, mPASMCM - murine pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen

Unter prolongiert hypoxischen Bedingungen konnte im Vergleich zu mPASC, die unter Normoxie kultiviert wurden, ein tendenziell erhöhtes $O_2^{\bullet-}$ -Signal detektiert werden (Abb. 3.35d). Hinsichtlich der ROS-Bildung war zu diesem Zeitpunkt jedoch kaum ein Unterschied zwischen Hypoxie und Normoxie zu beobachten (Abb. 3.35a). Die ROS- und $O_2^{\bullet-}$ -Bildung scheint nahezu linear zur Dauer der hypoxischen Expositionszeit der Zellen zu sinken (Abb. 3.35b und 3.35d). Bei mPASC, die für 120 h unter hypoxischer Atmosphäre kultiviert wurden, war das ROS-Signal nur noch etwa ein Drittel des unter prolongierten Hypoxie und Normoxie detektierten, und $O_2^{\bullet-}$ kaum noch nachweisbar.

3.2.7.3 Detektion und Lokalisation der ROS-Produktion unter chronischer Hypoxie mittels Fluoreszenzsonden

Zum Nachweis von intrazellulären bzw. mitochondrialen ROS unter Normoxie (120 h, 21 % O_2) und chronischer Hypoxie (120 h, 1 % O_2) wurden außerdem Fluoreszenzsonden eingesetzt. Der Nachweis von zytosolischen $O_2^{\bullet-}$ erfolgte mittels DHE und die mitochondriale $O_2^{\bullet-}$ -Produktion durch MitoSOX, einem kationischen Derivat von DHE (Abs. 2.4). Für den Nachweis von zytosolischen H_2O_2 wurde die DCFDA-Methode eingesetzt.

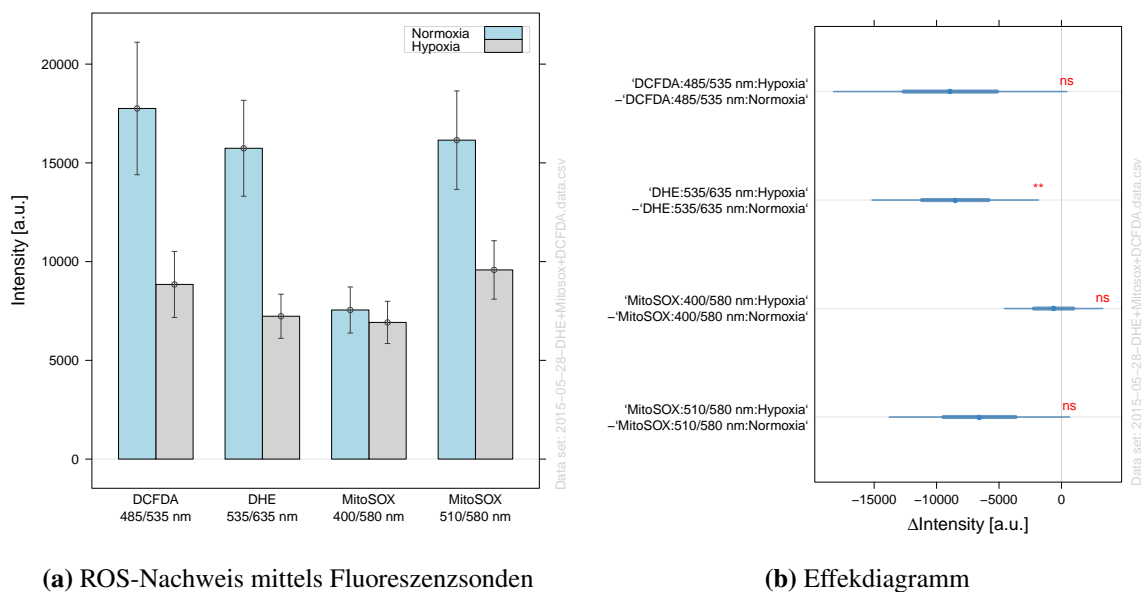


Abbildung 3.36: Nachweis von intrazellulären H_2O_2 (DCFDA) sowie zytosolischen und mitochondrialen $O_2^{\bullet-}$ (DHE und MitoSOX) in mPASC unter Normoxie (120 h; 21 %) und chronischer Hypoxie (120 h; 1 % O_2). Obwohl hier alle Gruppen in nur einem Diagramm dargestellt sind, sind die Signalthöhen tatsächlich nur innerhalb der einzelnen Fluoreszenzsonden und Wellenlängen vergleichbar. ($n=6$). Balkendiagramme: Dünne Linien repräsentieren den gepoolten Standardfehler. Effektdiagramme: Dicke Linien repräsentieren den Standardfehler der Differenz der Gruppenmittelwerte, dünne Linien das zugehörige 95 % CI. *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$; ns : $p \geq 0,05$

Da laut Robinson et al. (2006) bei $\lambda=400$ nm das Signal des unspezifischen Fluoreszenzproduktes von MitoSOX deutlich reduziert sein soll [219], wurde sowohl bei einer Wellenlänge von 400 nm als auch 510 nm angeregt. Es wurden aus den gleichen Mäusen isolierte PASC genutzt, wie sie auch für die parallel dazu durchgeführten ESR-Messungen (Abs. 3.2.7.2) ver-

wendet wurden. Dadurch sollte eine relative Vergleichbarkeit der Ergebnisse der verschiedenen Nachweismethoden ermöglicht werden.

Wie bereits bei den ESR-Experimenten (Abb. 3.35) beobachtet, wurden auch mittels DHE-Methode unter chronischer Hypoxie signifikant verringerte $O_2^{\bullet-}$ -Konzentrationen nachgewiesen (Abb. 3.36). Außerdem waren die mittels DCFDA-Methode detektierten H_2O_2 -Konzentrationen nach 120 h Hypoxieexposition deutlich niedriger als unter Normoxie. Ebenso fiel die mittels MitoSOX (510/580 nm) gemessene mitochondriale $O_2^{\bullet-}$ -Konzentration stark ab, jedoch ohne dass ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.36b). Die bei 400/580 nm akquirierten Daten des MitoSOX-Assays unterschieden sich hingegen kaum vom Hintergrundsignal.

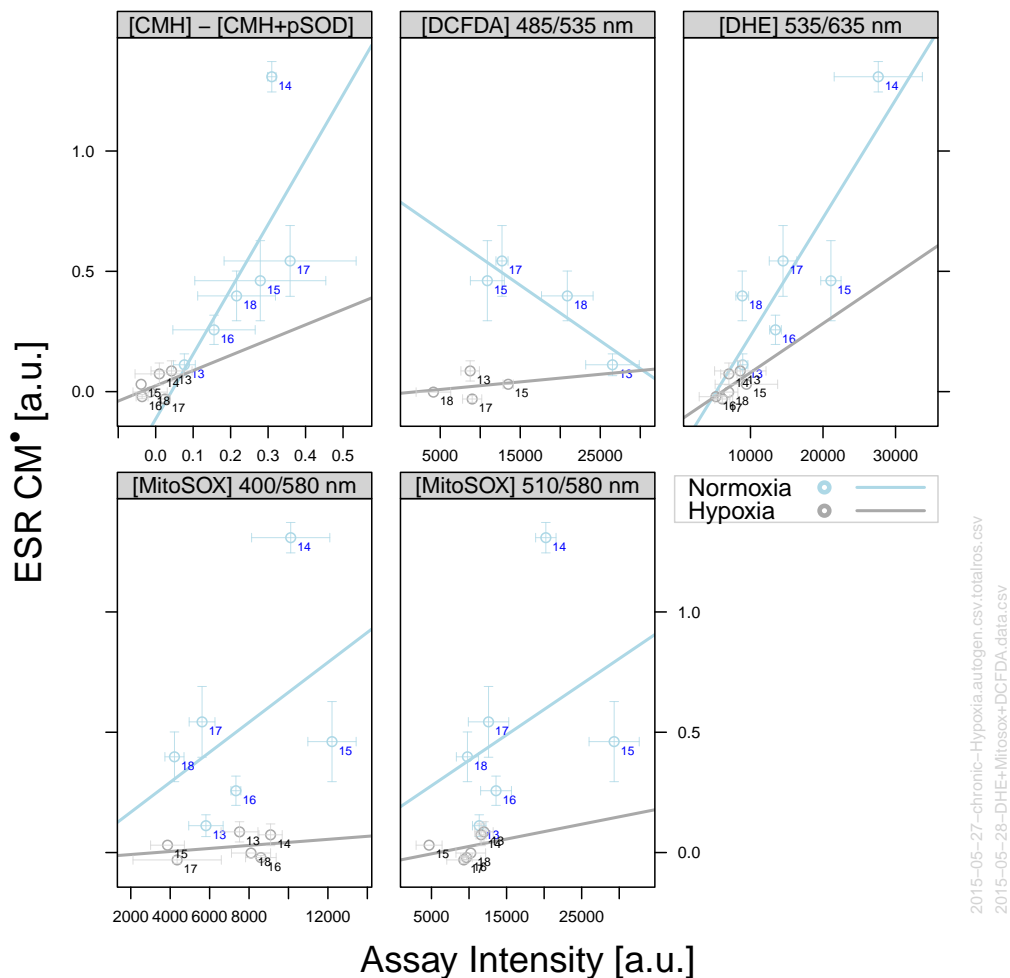


Abbildung 3.37: Regression des CM^{\bullet} -Signals gegen Fluoreszenzintensitäten von DCFDA, DHE und MitoSOX ($n=4-6$). Die Fluoreszenzsignale und die mittels ESR ermittelten $O_2^{\bullet-}$ -Konzentrationen wurden gegen die CM^{\bullet} -Konzentration pro Maus aufgetragen und die Regressionsgeraden berechnet. Jede Zahl identifiziert ein Versuchstier. Der Fluoreszenz-Datensatz ist derselbe wie derjenige, der Abb. 3.36 zugrunde liegt. Die blauen Kreuze entsprechen dem Standardfehler der Messwerte der jeweiligen Assays (SEM), die Zahlen rechts neben den Datenpunkten bezeichnen einzelne Versuchstiere. Assay Intensity: Intensität des Fluoreszenzsignals oder $O_2^{\bullet-}$ -Anteil am ESR-Signal (Differenz zwischen CMH und $CMH+pSOD$).

In Abb. 3.37 wurden die Signale der Fluoreszenzsonden und die mittels ESR ermittelten $O_2^{\bullet-}$ -Konzentrationen gegen die CM^{\bullet} -Konzentrationen je Tier aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt. Die Darstellung gibt darüber hinaus auch einen Hinweis auf die Variabilität der

Individuen, welche sich anhand der klein gedruckten Nummern der Einzeltiere nachverfolgen lässt. Die Zusammenhänge zwischen den Ergebnissen der Nachweismethoden wurden durch Berechnung der Korrelationskoeffizienten nach Pearson (Abs. 2.7.1) ermittelt und in einem Kreuzkorrelations-Diagramm dargestellt (Abb. 3.38). Darin lassen sich die Einzelkorrelationen zwischen den durchgeführten Assays kompakt und vollständig darstellen.

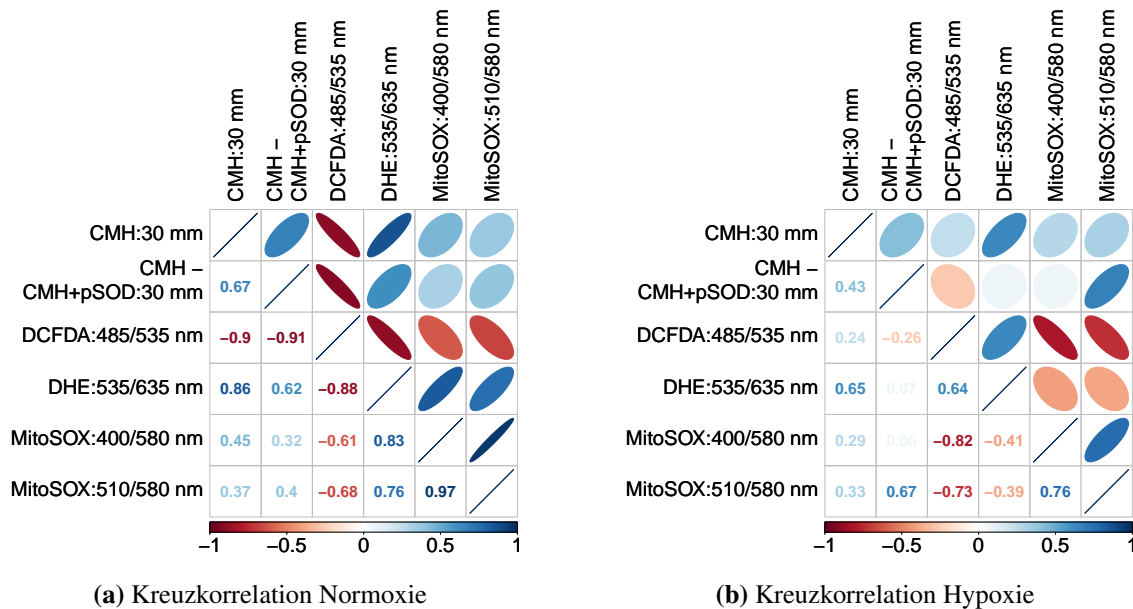


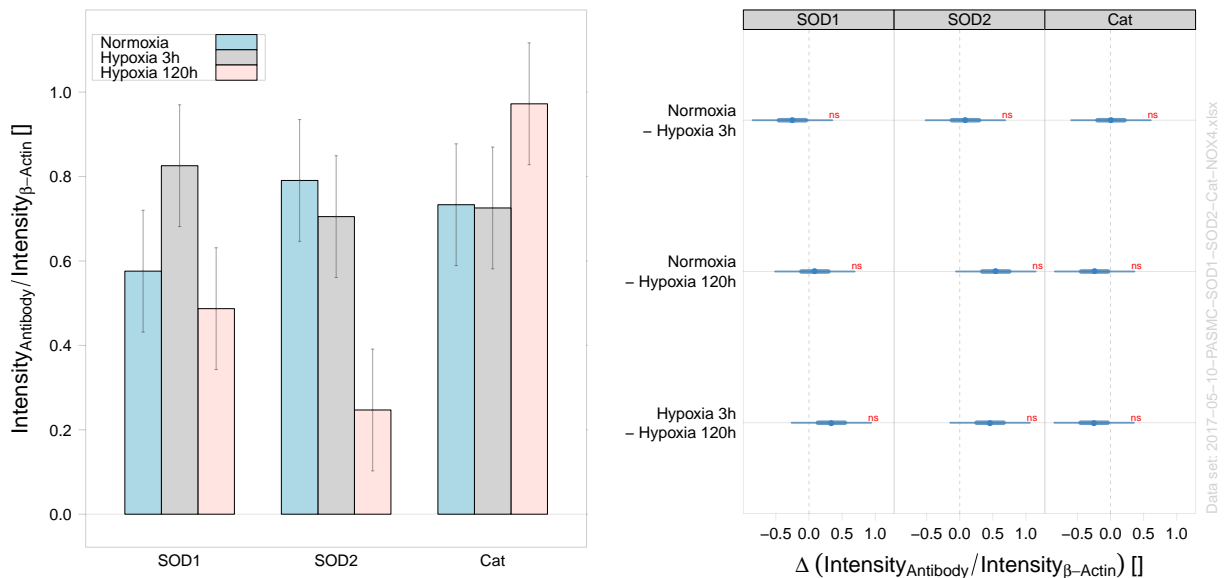
Abbildung 3.38: Kreuzkorrelation zwischen CM[•]-Signal (ESR) und fluorometrischer Detektion von zytosolischen H₂O₂ (DCFDA), zytosolischen O₂^{•-} (DHE) und mitochondrialen O₂^{•-} (MitoSOX) (n=4-6). Der zugrunde liegende Datensatz ist derselbe wie in Abb. 3.37. (a) unter normoxischen Bedingungen (21 % O₂, 120 h). (b) unter chronisch hypoxischen Bedingungen (1 % O₂, 120 h). Die Stärke der Korrelation zwischen jeweils zwei Variablen wird hier anhand von Ellipsen dargestellt: Je schmaler und farbintensiver die Ellipse gezeichnet wird, umso enger ist auch der Zusammenhang. Variablen mit einem schwachen Zusammenhang erscheinen blass und rundlich; der Extremfall einer Korrelation von 0 entspricht einer Kreisform. Eine abfallende Orientierung, synästhetisch begleitet von einem dunklen Rot entspricht einer stark negativen; eine ansteigende Orientierung und ein dunkles Blau zeigt eine stark positive Korrelation an (siehe Farbskala unter der x-Achse).

Unter Normoxie (Abb. 3.38a) bestand zwischen den Ergebnissen der ESR- und DHE-Methode ein enger positiver Zusammenhang ($r = 0,86$), während zwischen der ESR- und DCFDA-Methode eine stark negative Korrelation bestand ($r = -0,9$). Darüber hinaus sind die Ergebnisse der DCFDA-Methode mit den ebenfalls hauptsächlich O₂^{•-}-detektierenden Fluoreszenzmethoden DHE und MitoSOX (510/580 nm) negativ korreliert ($r = -0,88$ bzw. $r = -0,68$). Eine relativ schwache positive Korrelation bestand zwischen der ESR- und MitoSOX-Methode.

Unter chronischer Hypoxie (Abb. 3.38b) hingegen wurde zwischen der ESR- und DCFDA-Methode anstatt des unter Normoxie beobachteten stark negativen ($r = -0,9$) ein schwach positiver ($r = 0,24$) Zusammenhang gezeigt. Die unter Normoxie vorliegende eng negative Korrelation zwischen DHE und DCFDA blieb unter hypoxischen Bedingungen ebenfalls nicht erhalten, sondern zeigte nur moderat korrelierte Werte ($r = 0,64$). Dafür verstärkte sich unter Hypoxie der negative Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der DCFDA- und MitoSOX (510/580 nm)-Methode leicht.

3.2.7.4 Expression Nrf2-regulierter Antioxidantien in mPASC MC unter Normoxie, prolongierter und chronischer Hypoxie

Um den Redox-Status von mPASC MC unter Normoxie (21 % O₂), prolongierter und chronischer Hypoxie (3 h bzw. 120 h, 1 % O₂) umfassender zu beschreiben, wurde neben deren ROS/RNS-Produktion auch die Expression der endogenen Antioxidantien SOD1, SOD2 und Cat bestimmt. Alle drei Enzyme werden durch den redox-sensitiven Transkriptionsfaktor Nrf2 reguliert.



(a) Proteinexpression unter Normoxie, prolongierter und chronischer Hypoxie

(b) Effektplot

Abbildung 3.39: Quantifizierung der Proteinexpression Nrf2-regulierter Antioxidantien SOD1, SOD2 und Cat mittels Western-Blot-Analyse (n=4). (a) Die Inkubation der PASC MC erfolgte unter Normoxie (21 % O₂), prolongierter und chronischer Hypoxie (3 h und 120 h, 1 % O₂). Die Intensitäten der Protein-spezifischen Banden wurden auf das Houskeeping-Protein β -Aktin normalisiert. (b) Vergleich zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen. Balkendiagramme: Dünne Linien repräsentieren den gepoolten Standardfehler. Effektplot: Dicke Linien repräsentieren den Standardfehler der Differenz der Gruppenmittelwerte, dünne Linien das zugehörige 95 % CI. *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$; ns : $p \geq 0,05$ Abk.: SOD1 - zytosolische SOD, Cu/ZnSOD; SOD2 - mitochondriale SOD, MnSOD; Cat - Katalase

Die Expression von SOD1 schien nach 3 h Hypoxie tendenziell anzusteigen und nach 120 h wieder auf ein den normoxischen Zellen vergleichbares Expressionsniveau zu sinken. SOD2 und Cat zeigten nach 3 h Hypoxieexposition eine vergleichbare Proteinexpression wie die normoxischen Kontrollen. Während die Cat-Expression nach 120 h leicht anzusteigen schien, fiel die der SOD2 deutlich ($p = 0,0618$) ab.

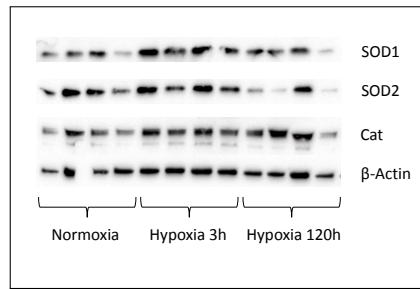


Abbildung 3.40: Nachweis der Proteinexpression von SOD1 (17 kDa), SOD2 (24 kDa) und Cat (60 kDa) mittels Western-Blot-Analyse unter Normoxie (21% O₂), 3 h und 120 h Hypoxie (1% O₂) (n=4). Als Housekeeping Protein wurde beta-Aktin (42 kDa) gewählt. Alle Proteine wurden auf derselben PVDF-Membran nachgewiesen. Abk.: SOD1 - zytosolische SOD, Cu/ZnSOD, SOD2 - mitochondriale SOD, MnSOD, Cat - Katalase

Die Auswirkung der Nrf2-Defizienz auf die O₂^{•-}-Produktion wurde bei MLF von Nrf2-defizienten (Nrf2-KO)-Mäusen untersucht (Abb. 3.41), die durch unseren Kooperationspartner Prof. H. von Melchner, Abteilung für Molekulare Hämatologie des Universitätsklinikums Frankfurt/Main zur Verfügung gestellt wurden. Es konnte eine deutlich erhöhte O₂^{•-}-Produktion bei Nrf2-KO MLF gegenüber der von WT MLF mittels ESR-Spektroskopie detektiert werden.

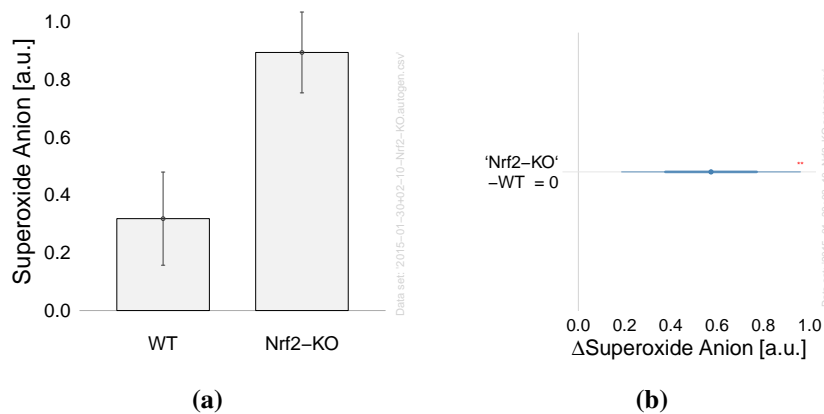


Abbildung 3.41: Nachweis von O₂^{•-} in MLF von WT- und Nrf2-KO-Mäusen (n=6). (a) Die O₂^{•-}-Produktion in Nrf2-KO MLF ist gegenüber der von WT-MLF um das drei- bis vierfache erhöht. (b) Grafische Darstellung des statistischen Gruppenunterschieds. Balkendiagramme: Dünne Linien repräsentieren den gepoolten Standardfehler. Effektdiagramme: Dicke Linien repräsentieren den Standardfehler der Differenz der Gruppenmittelwerte, dünne Linien das zugehörige 95% CI. *** : p < 0,001; ** : p < 0,01; * : p < 0,05; ns : p ≥ 0,05 Abk.: MLF - murine Lungenfibroblasten, Nrf2 - nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2-KO - Nrf2-Defizienz

3.2.8 Einfluss der Vitamin E-Konzentration und des Diätfetts auf die ROS-Bildung im Leber- und Lungengewebe von Ratten

Das Ziel der Studie war, den Einfluss normaler, moderat und exzessive erhöhter Vitamin E-Konzentrationen in der Diät von Ratten auf die ROS/RNS-Bildung in Leber und Lunge zu bestimmen. Die auf die Untersuchung von Lebergewebe bezogenen Ergebnisse sind Teil der Veröffentlichung von Eder et al. (2017) [273].

Experimentelle Details

Die Tierexperimente wurden durch das Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie der JLU Gießen durchgeführt. Entsprechend einem bifaktoriellen Experimentaldesign wurden 72 adulte, männliche *Sprague-Dawley*[®] *Outbred* Ratten (Harlan, Borcheln) vergleichbaren Gewichts (≈ 320 g) und Alters (acht Wochen bei Versuchsbeginn) in sechs Fütterungsgruppen eingeteilt [274].

Vitamin E umfasst eine Gruppe von Phenolen, zu denen Tocopherole und Tocotrienole gezählt werden (Abs. 1.4.3). Da α -Tocopherol das antioxidativ wirksamste Vitamin E-Derivat ist, wird die Vitamin E-Aktivität entsprechend der *European Food Safety Authority* in α -Tocopherol-Equivalente (TE) ausgedrückt [275]. Die TE wurden so gewählt, dass der Bereich von einer geringen (25 mg TE/kg) über die maximale nichttoxische (250 mg TE/kg) bis zur einer exzessiv erhöhten (2 500 mg TE/kg) Tagesdosis abgedeckt wurden. Da auch die Art des Fettes einen Effekt auf die Produktion freier Radikale und die Wirkung von Vitamin E haben kann, wurde der Versuch mit zwei verschiedenen Diätfetten – Sojaöl und Lachsöl – durchgeführt (Tab. 3.2).

Gruppe	Diätöl	α -Tocopherol
I	Soja	25 mg/kg Diät
II	Soja	250 mg/kg Diät
III	Soja	2500 mg/kg Diät
IV	Lachs	25 mg/kg Diät
V	Lachs	250 mg/kg Diät
VI	Lachs	2500 mg/kg Diät

Tabelle 3.2: Versuchsgruppen Diät-Behandlung

Jeweils 36 Tiere erhielten eine basale semisynthetische Diät mit 5 % Sojaöl (*Soybean*) oder 5 % Lachsöl (*Salmon*). Beide Diätöle sind reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA), unterscheiden sich jedoch in deren Zusammensetzung. Während Sojaöl zu mehr als 50 % aus der ω -3-Fettsäure α -Linolensäure (drei Doppelbindungen) besteht, bildet Linolsäure, eine ω -6-Fettsäure, den Hauptanteil von Lachsöl. Linolsäure wird im Körper zu den ω -3-Fettsäuren

Eicosapentaensäure [*eicosapentaenoic acid* (EPA), fünf Doppelbindungen] und Docosahexaensäure [*docosahexaenoic acid* (DHA), sechs Doppelbindungen] umgewandelt. EPA und DHA sind aufgrund dessen, dass sie mehr Doppelbindungen als α -Linolensäure aufweisen, empfindlicher gegenüber Lipidperoxidation und tendieren dadurch stärker dazu, Radikale freizusetzen [276, 277].

Die Zusammensetzung des Futters entsprach den Empfehlungen des *American Institute of Nutrition* (AIN)-93 h für heranwachsende Ratten [278], Vitamin C als Supplement inbegriffen. Futter und Wasser standen für die gesamte Versuchsdauer *ad libitum* zur Verfügung. 28 Tage nach Versuchsbeginn wurden die Ratten gemäß den geltenden Tierschutzbestimmungen getötet (Aktenzeichen der Tötungsanzeige: JLU460_M). Es wurden Leber und Lunge entnommen, um die Wirkung verschiedener Vitamin E-Dosen auf den stressresponsiven Nrf2-Signalweg zu untersuchen. Die Organe wurden direkt nach der Entnahme in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Für die ESR-Spektroskopie wurden ≈ 20 mg des Leber- bzw. Lungengewebes nach Standardprotokoll homogenisiert (Abs. 2.2.1). Die ESR-Probenvorbereitung und -Messungen erfolgten wie in Abs. 2.5.1 und 2.5.3 beschrieben. Die ESR-Amplituden wurden auf das Probengewicht skaliert.

Ergebnisse

Ratten, die mit einer Lachsöl-Diät der geringsten TE-Konzentration gefüttert wurden, zeigten sowohl in der Leber als auch der Lunge die höchste $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Konzentration. Ebenfalls unabhängig vom Gewebe zeigte sich bei den mit Lachsöl gefütterten Gruppen eine scheinbar exponentielle Dosis-Wirkungsbeziehung (Abb. 3.42).

Im Lungengewebe führte ein Anstieg der TE-Konzentration von 25 mg TE/kg auf 250 mg TE/kg oder 2 500 mg TE/kg zu einer deutlichen Reduktion der $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Konzentration, unabhängig welches Diätfett verabreicht wurde (Abb. 3.42a). Im Lebergewebe von Ratten, die mit Lachsöl gefüttert wurden, jedoch nicht von Ratten, die Sojaöl als Supplement erhielten, zeigte sich eine mit den Lungenproben vergleichbare Abhängigkeit der $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Produktion von der Vitamin E-Dosis (Abb. 3.42b).

Die $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Konzentration bei Ratten, die mit Sojaöl und der geringsten Vitamin E-Konzentration gefüttert wurden, waren gegenüber den mit Lachsöl gefütterten tendenziell (im Lungengewebe) oder signifikant (Lebergewebe) geringer (Abb. 3.42). Im Lebergewebe war im Gegensatz zum Lungengewebe zwischen den beiden erhöhten TE-Konzentration (250 mg TE/kg und 2 500 mg TE/kg) kein Unterschied detektierbar (Abb. 3.42c). Überraschend war, dass die $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Konzentration im Lungengewebe gegenüber in denen der Vergleichsgruppen der Leber gemessenen Werte um das Sechs- bis Zehnfache erhöht war.

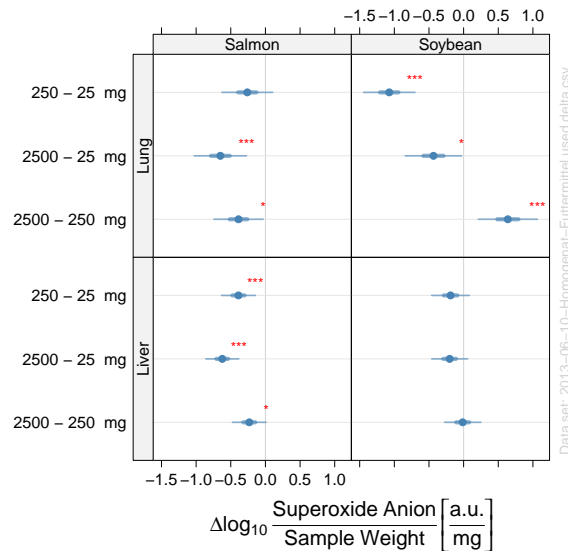
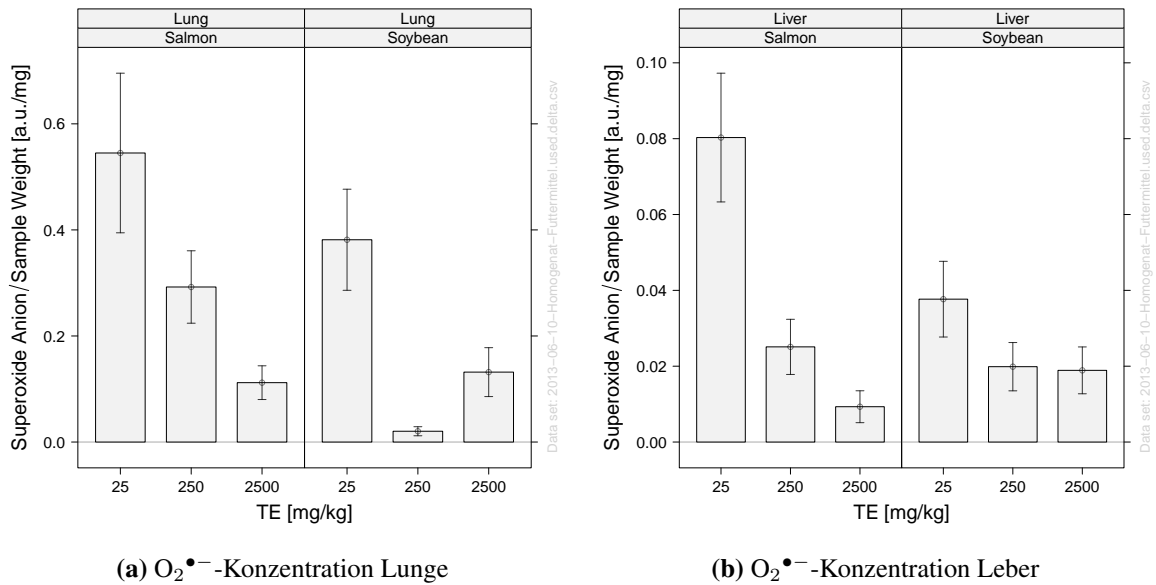


Abbildung 3.42: $O_2^{\bullet-}$ -Konzentration im Lungen- und Lebergewebe in Abhängigkeit von der Vitamin E-Dosis und des Diätfettes (n=4-6). (a) Eine ansteigende Vitamin E-Konzentration von 25 mg TE/kg auf 250 mg TE/kg oder 2 500 mg TE/kg führte zu einer deutlichen Reduktion der $O_2^{\bullet-}$ -Konzentration im Lungengewebe, unabhängig davon, welches Diätfett verabreicht wurde (Abb. 3.42a). (b) Ein ähnlicher Effekt zeigte sich im Lebergewebe von Ratten, die mit Lachsöl gefüttert wurden, jedoch nicht bei jenen, denen Sojaöl als Supplement gegeben wurde. Es zeigte sich im Lungengewebe (a) und Lebergewebe (b) bei den mit Lachsöl gefütterten Gruppen eine scheinbar exponentiell verlaufende Dosis-Wirkungsbeziehung. (c) Vergleich der $O_2^{\bullet-}$ -Konzentrationen zwischen den Behandlungsgruppen. Die $O_2^{\bullet-}$ -Konzentrationen der mit einer moderaten bzw. exzessiv erhöhten Vitamin E-Dosis gefütterten Tiere sind gegenüber Tieren, denen die geringste Dosis verabreicht wurde, tendenziell bis signifikant erniedrigt. Aufgrund der heteroskedastischen Verteilung der Residuen war die Logarithmierung der Amplituden erforderlich. Dicke Linien repräsentieren den Standardfehler der Differenz der Gruppenmittelwerte, dünne Linien das zugehörige 95 % CI. *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$; ns : $p \geq 0,05$

3.2.9 ESR-gestützte Zeitreihe an einer isolierten Mauslunge unter Normoxie und akuter Hypoxie

Zur Untersuchung der Lungenfunktion und (patho-)physiologischer Mechanismen unter kontrollierten Bedingungen ist das *ex vivo* Modell der ILU eine gut etablierte Methode und eine Alternative zu *in vivo* Tiermodellen [196, 279]. Um die zeitliche Beziehung zwischen Hypoxie, ROS und HPV in hoher Auflösung quantitativ darzustellen, wurde ein vorerst eher messtechnisch ausgerichteter Pilotversuch zum kontinuierlichen Nachweis der ROS-Freisetzung der ILU mittels ESR-Spektroskopie durchgeführt (Abs. 2.6). Dabei wurden über ca. zwei Stunden akut hypoxische Phasen (je 10 min; 1 % O₂, 5,3 % CO₂, Rest N₂) mit normoxischen Phasen (je 15 min; 21 % O₂, 5,3 % CO₂, Rest N₂) alterniert (Abb. 3.43H). In Abb. 3.43 wurden alle relevanten, mittels *PulmoDyn*- (ILU) und Xenon- (ESR) Software erfassten Daten in Form einer Zeitreihe dargestellt. Diese enthält 481 ESR-Datenpunkte, während die *PulmoDyn*-Software infolge des früheren Aufzeichnungsbeginns und der weit höheren Auflösung 4019 Werte erfasste.

Nach einer 15-minütigen Phase normoxischer Beatmung, während der die ILU einen stabilen Zustand erreichte, und zehn Minuten vor dem initialen hypoxischen Manöver wurden 1,6 ml einer 5 mM CMH-Lösung in den Perfusionsbehälter gegeben, sodass im Perfusat eine Endkonzentration von 0,5 mM CMH erzielt wurde. CMH schien zunächst einen vasodilatativen Effekt zu haben, da direkt nach Zugabe eine kurzzeitige Absenkung des PAP zu beobachten war (Abb. 3.43G). Mit Ausnahme der Ventilationsdrucke (Abb. 3.43F), welche über die Versuchsdauer nahezu konstant blieben, stiegen alle mittels *PulmoDyn* aufgezeichneten physiologischen Parameter um $\approx 10 - 20\%$ an (PAP, Lungengewicht, LVP, Abb. 3.43D, E, F).

Der beobachtete Hypoxie-Effekt auf den PAP war in diesem Experiment während der ersten Hypoxiephase am stärksten und ließ in den folgenden Phasen schnell nach. Mit Umschalten auf eine hypoxische Beatmung stieg der PAP zunächst exponentiell-asymptotisch an und fiel in gleicher Form wieder ab, sobald auf das normoxische Gasgemisch gewechselt wurde. Allerdings sanken die totalen PAP-Werte nicht mehr auf das Niveau vor Beginn der vorangehenden Hypoxiephase, sondern stiegen im Mittel stetig, scheinbar linear an (3.43D, graue Linie). Die in Abb. 3.43D, E, F und andeutungsweise auch in G zu sehenden Druckspitzen sind auf sogenannte tiefe Atemzüge zurückzuführen, die nach jeder Umstellung des Beatmungsgases auf hypoxisches oder normoxisches Gasgemisch durch kurzzeitiges Zusammendrücken des Ventilationsschlauches hervorgerufen wurden. Hierdurch kommt es zu Druckspitzen in den Alveolen der Lunge, welche zu einer vollständigen Entfaltung und damit einer Verbesserung der Ventilation führen soll, was auch für die zeitliche Orientierung in der PAP-Darstellung nützlich ist. Die dazu synchronen, den Ventilationsdruckspitzen aber etwas verauseilenden Spitzen des Lungengewichts im Panel E der Abb. 3.43 sind wahrscheinlich durch eine mechanische Kopplung des Beatmungsschlauchs mit dem Gewichtssensor bedingt, weil ein höherer Beatmungsdruck eigentlich

zur Einengung des Flüssigkeitsraums und damit zur Verminderung des Organgewichts führen müsste.

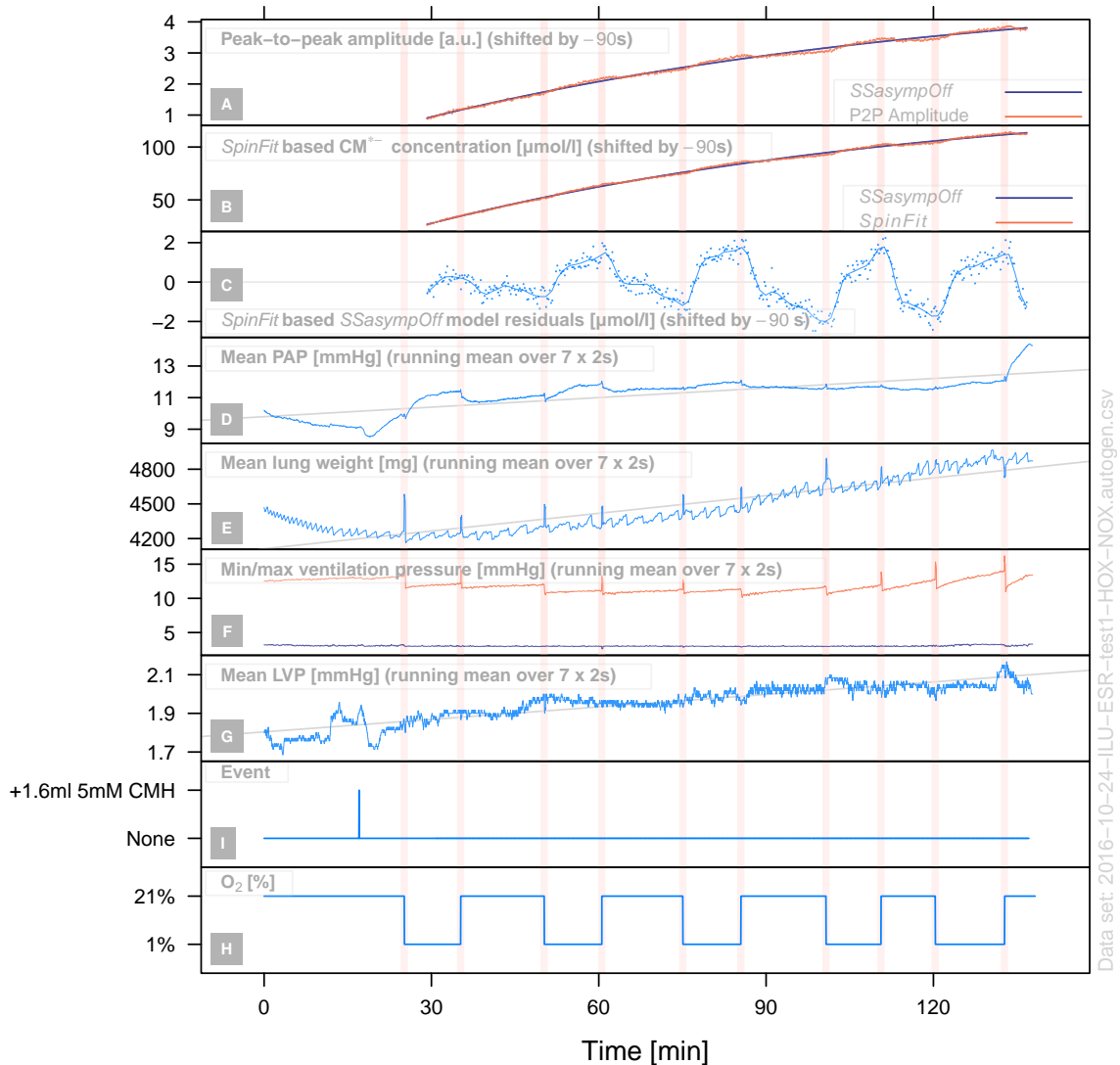


Abbildung 3.43: ILU-ESR Zeitreihen-Experiment bei alternierend akut hypoxischer und normoxischer Ventilation (n=1). Darstellung der ESR-Messungen und der mittels PulmoDyn-Software aufgezeichneten physiologischen Parameter. (A) und (B) Das ESR-Signal wurde sowohl mittels Peak-to-Peak-Methode als auch mittels SpinFit ausgewertet. Die Rohdatenpunkte wurden ohne jede Interpolation orange dargestellt, jedoch um 90 s nach links verschoben, um die durch die lange Zuleitung zum Resonator bedingte Phasenverschiebung gegenüber dem Geschehen in der Lunge kompensieren. Eine sich asymptotisch jeweils einer maximalen Amplitude (Panel A) bzw. einem Konzentrationsmaximum (Panel B) annähernde Funktion wurde mittels der R-Funktionen nls und SSasympOff gefittet (im Ausdruck bei niedriger Auflösung als blaue Linie erscheinende Reihe der Messpunkte). (C) Residuen-Differenz aus SpinFit-basierten CM^+ -Konzentrationen und der durch SSasympOff modellierten Werte aus Panel B. (D) bis (G) Mittels PulmoDyn erfasste physiologische Parameter der Mauslunge. Während die Ventilationsdrücke im Mittel nahezu konstant bleiben, steigen PAP, LVP und das Lungengewicht mit der Zeit an. (I) 15 min nach Beginn der normoxischen Beatmung und 10 min vor der ersten hypoxischen Ventilation wurden 1,6 ml einer 5 mM CMH-Lösung in den Perfusionsbehälter gegeben, sodass eine Endkonzentration von 0,5 mM CMH erzielt wurde. Dieses Ereignis ist zeitlich mit einem kurzzeitigen Abfall des PAP und des LVP verbunden (Panel D und G). (H) Die Mauslunge wurde abwechselnd 10 min hypoxisch (1 % O_2) und 15 min normoxisch (21 % O_2) ventiliert. Das Lungengewicht, PAP, LVP und die Ventilationsdrücke wurden über einen Zeitbereich von 14 s durch fortlaufende Mittelwertbildung (running mean) gefiltert, um das von den Analog/Digital Wandlern des DT9800 stammende digitale Rauschen zu unterdrücken. Die senkrechten, breiten Linien in rötlichem Ton entsprechen einer Zeitspanne von 60 s. Sie bilden eine angenommene Unsicherheit der manuellen Zeitangaben von ± 30 s für den Wechsel zwischen den normoxischen und hypoxischen Phasen in Bezug auf die ESR- und PulmoDyn-Rechneruhren ab. Abk.: PAP - pulmonal-arterieller Druck; LVP - linksventrikulärer Druck; ventilation pressure - Beatmungsdruck; lung weight - Nassgewicht des Herz-Lungen Pakets

Die orange gedruckten P2P-Amplituden in Abb. 3.43A und die mittels *SpinFit* berechneten CM[•]-Konzentration in Abb. 3.43B stellen sich als exponentiell-asymptotisch ansteigende Funktionen der Zeit dar. Dabei handelt es sich nicht um Interpolationen, sondern um graphisch dicht gedrängte Einzelmesswerte im Abstand von $\approx 13,5$ Sekunden. Abb. 3.43C zeigt die Residuen, die verbleiben, wenn von den *SpinFit*-basierten CM[•]-Konzentrationen (Abb. 3.43B, rote Linie) die als Hintergrundsignal aufgefassten modellierten Werte abgezogen werden (Abb. 3.43B, blaue Linie).

```
Formula: raw.M ~ SSasymptOff(Seconds, phi1, phi2, phi3)
Parameters:
      Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
phi1  1.540e-04  1.202e-06  128.09  <2e-16 ***
phi2 -8.639e+00  1.603e-02 -539.07  <2e-16 ***
phi3 -1.091e+03  1.600e+01  -68.19  <2e-16 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
Residual standard error: 1.246e-06 on 478 degrees of freedom
Number of iterations to convergence: 0
Achieved convergence tolerance: 3.159e-08
```

Nebenstehende Parameter sind das Ergebnis der Anpassung dieses Modells an das CM[•]-Signal. Ihre formale Bedeutung wurde bereits in Abb. 2.9 veranschaulicht. Im Kontext bedeutet φ_1 die Lage der Asymptote bei $x \rightarrow \infty$, mithin eine prospektiv maximal erreichbare CM[•]-Konzentration von $154 \mu\text{mol/l}$. Daraus folgt, dass im Perfusat in

Form von CM[•] maximal ein Drittel der eingesetzten Anfangskonzentration von $500 \mu\text{mol/l}$ CMH erscheinen. φ_2 steht für den Logarithmus einer Geschwindigkeitskonstante, welche in Beziehung zur Halbwertszeit $t_{0,5} = \frac{\ln 2}{e^{\varphi_2}}$ steht, und hier also $65,2 \text{ min}$ oder $\approx 43 \%$ der Versuchslaufzeit beträgt. φ_3 entspricht dem Zeitpunkt, zu dem $y = 0$ ist, was in Beziehung zum Beginn der Messung steht, die aus Sicht des Modells $18,2 \text{ min}$ vor dem Anfang der ESR-Messung begonnen haben soll. Die Abweichung von etwa 12 min zum tatsächlichen Beginn des Experiments ist dadurch erklärlich, dass der zu Beginn vor Zugabe von CMH nahezu horizontal verlaufende Teil der Kurve in diesem Versuch nicht erfasst wurde. Die Darstellung der Residuen des *SSasymptOff*-Modells bewirkt, dass nur der Signalanteil zur Darstellung kommt, den das autoxidative Modell gerade nicht erklärt, weil die Differenzbildung zwischen gemessenem und modelliertem Signal den vergleichsweise langsamen, vornehmlich durch Autoxidation von CMH bedingten Anstieg ausblendet. In der Folge kommen nur noch vergleichsweise hochfrequente Änderungen des gemessenen Signals zur Darstellung, deren Ausmaß in Beziehung zur Beatmungsphase steht.

3.2.9.1 Physiologischer ROS-Anteil am ESR-Signal

Während in Abb. 3.43 alle mittels *PulmoDyn*- und *Xenon*-Software aufgezeichneten Messwerte dargestellt sind, liegt der Fokus von Abb. 3.44 in der Darstellung der Residuen der CM[•]-Konzentrationen (Abb. 3.44A) und der PAP-Messungen (Abb. 3.44B). Die Zeitreihe der PAP-Messungen wurden in Form von Residuen eines linearen Regressionsmodell dargestellt, um die Signalform optisch unmittelbar mit der Signalform der ESR-Residuen vergleichen zu können. Auch für die Linienbreite in Abb. 3.44C wurde eine lineare Regression gerechnet, dort aber nur als graue Linie innerhalb der Rohwerte dargestellt, um zu verdeutlichen, dass die

durchschnittliche Linienbreite ebenso wie ihre Amplituden mit fortschreitender Zeit geringfügig kleiner werden.

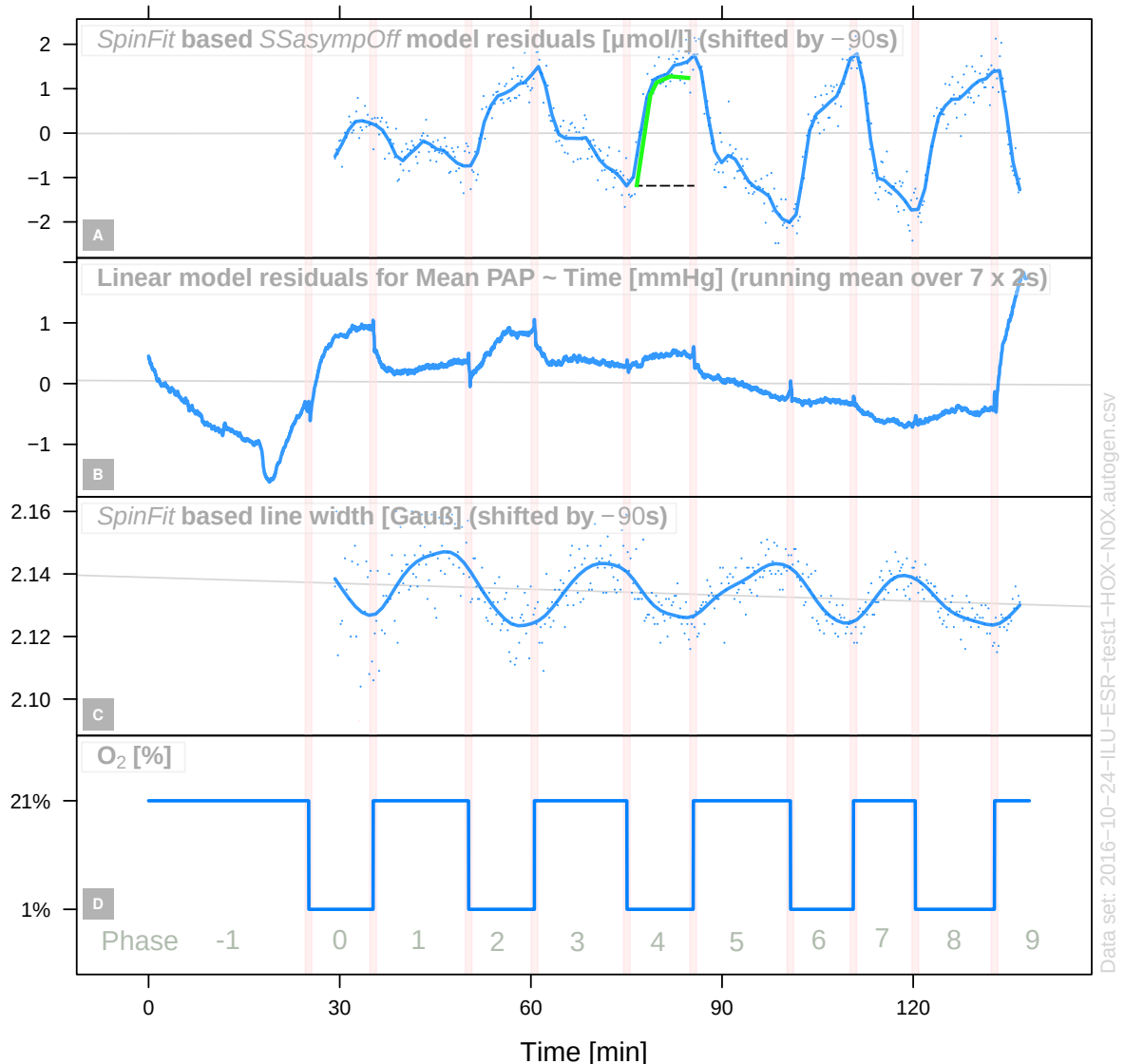


Abbildung 3.44: Vergrößerte Darstellung der Residuen der ESR- und PAP-Messungen des in Abb. 3.43 dargestellten ILU-ESR Zeitreihen-Experiments. (A) Dieses Panel entspricht Abb. 3.43C und stellt die aus den SpinFit-berechneten CM^{\bullet} -Konzentrationen und den zugehörigen SSasymptOff-Modellwerten berechneten Residuen dar. Der blaue Kurvenzug (Spline) wurde als Anhalt für den mittleren Signalverlauf berechnet. Das grüne Kurvensegment und die gestrichelte horizontale Linie darunter wurden nachträglich von Hand eingezeichnet (siehe nachfolgender Text). (B) Darstellung der über ein lineares Modell aus den PAP-Messwerten berechneten Residuen. (C) SpinFit-basierte Linienbreiten (blaue Punkte und blauer Spline). (D) Die Mauslung wurde abwechselnd 10 min hypoxisch (1 % O_2) und 15 min normoxisch (21 % O_2) ventiliert. Die ESR-Daten wurden insgesamt um 90 s nach links verschoben, um die zuleitungsbedingte Phasenverzögerung zu kompensieren. Die senkrechten, breiten Linien in rötlichem Ton entsprechen einer Zeitspanne von 60 s. Sie bilden eine angenommene Unsicherheit der manuellen Zeitangaben von ± 30 s für den Wechsel zwischen den normoxischen und hypoxischen Phasen in Bezug auf die ESR- und PulmoDyn-Rechneruhren ab. Der PAP wurde im Zeitbereich von 14 s durch fortlaufende Mittelwertbildung gefiltert, um das digitale Rauschen zu unterdrücken. Abk.: PAP - pulmonal-arterieller Druck; line width - Linienbreite der ESR-Spektallinien

Die erste durch die Messung vollständige erfasste Phase zeigt im Gegensatz zu den vier darauf folgenden Phasen eine abweichende Form hinsichtlich der SSasymptOff-Residuen in Abb. 3.44A. Im zeitlichen Zusammenhang damit steht, dass die Lunge zu diesem Zeitpunkt auf den Anstieg des pO_2 noch sehr deutlich mit einem steilen Abfall des PAP reagierte. Das grüne Segment im Panel A und Phase 4 der Zeitreihe wurde nachträglich von Hand eingezeichnet,

um den aus Abb. 3.17 erwachsenen Gedanken zu verdeutlichen, dass die nach Abzug des autoxidativen Modells verbleibende, durchaus komplexe Signalform sich größtenteils aus einem rein physikalisch bedingten O₂-Effekt und wahrscheinlich nur zu einem sehr kleinen Teil aus einem physiologisch bedingten ROS-Anstieg erklären lässt.

Der während der Beatmungszyklen in das Perfusat diffundierende O₂ bewirkt eine fortschreitende Oxidation der *Spin probe*, welche wegen des vergleichsweise langsamen Zerfalls von CM• vornehmlich eine Reaktion erster Ordnung darstellt und sich deshalb als exponentiell-asympotischer Anstieg des ESR-Signals ausdrückt. Es handelt sich dabei um ein hier unerwünschtes Hintergrundsignal, welches die Bewertung der ihm aufgeprägten, vergleichsweise hochfrequenten und kleinen Auslenkungen erschwert. Eine weitere Komplikation besteht im Einfluss der im Perfusat gerade bestehenden O₂-Konzentration (Abs. 3.2.2.3) auf die Gesamthöhe des gemessenen Signals:

$$s(t) = [autox(t) - decay(t) + ros(t)] \cdot [1 - k \cdot f(pO_2(t))] \quad (3.5)$$

Dabei repräsentiert $s(t)$ die Zeitreihe der durch *SpinFit* vorverarbeiteten ESR-Messwerte. $autox(t)$ soll eine Funktion sein, welche den autoxidativen Signalanteil in Abhängigkeit von der Zeit liefert, $decay(t)$ steht für die im Vergleich zur Oxidationsreaktion langsame Zerfallsreaktion von CM• (Tab. 2.5), während $ros(t)$ das eigentlich interessierende, von Zellen der Mauslunge erzeugte Nutzsignal sein soll. Der Faktor $[1 - k \cdot f(pO_2(t))]$ moduliert nun die Summe dieser Anteile umgekehrt proportional zum zeitlichen Verlauf des pO₂ im Takt der Normoxie/Hypoxie-Phasen. Die Funktion f soll die pO₂-Werte der Gasphase im Bereich von 1 und 21 % O₂ auf einen Wertebereich zwischen -0,5 und +0,5 abbilden. Der Größenordnung nach (Abs. 3.2.2.3) führt eine Änderung des pO₂ der Gasphase zwischen 21 % O₂ und 1 % O₂ zu einer Änderung des Signals um 10 % des jeweilig erreichten Wertes. Mit einem Wert von 0,1 für k würde das Gesamtsignal dann pO₂-abhängig um den bei einer mittleren O₂-Konzentration von 11 % gemessenen Wert oszillieren. Ein derartiges Modell ist aber nicht unmittelbar anwendbar, weil die absolute Konzentration des Sauerstoffs im Perfusat bisher nicht gemessen wurde und darüber hinaus auch die Autoxidationsrate von einer im Perfusat ständig wechselnden O₂-Konzentration abhängt. Es dient hier mehr der Darlegung der Problemstellung.

Ein Schritt auf dem Weg zur Klärung der Hypothese, ob sich das in den Residuen abbildende Signal größtenteils ein Maß für die O₂-Konzentration erklären lässt, besteht in einer erfolgreichen Anpassung eines plausibles Modells für die phasenweise schwankende O₂-Konzentration im dem Spektrometer zulaufenden Perfusat. Nachdem aber weder im ablaufenden noch im der Lunge zulaufenden Perfusat O₂-Partialdrucke gemessen wurden, muss zunächst offen bleiben, ob sich die O₂-Konzentration im Perfusatzufluss zu Beginn jeder Beatmungsphase vollständig auf den Partialdruck des Beatmungsgases der vorigen Phase eingestellt hat. Wenn die Lunge

als Ansammlung parallel geschalteter, sehr dünner Kapillaren ohne parallele *Shunt*-Gefäße angesehen werden kann, sollten im aus der Lunge abströmenden Perfusat keine oder nur noch sehr geringe phasenabhängige Schwankungen des pO_2 nachweisbar sein, wie Weissmann et al. (1995) an zwei Kaninchenlungen beobachteten [172].

Unter der O_2 -Hypothese mit *Shunts* oder einer aus anderen Gründen unvollständigen O_2 -Sättigung ist dagegen in groben Zügen bekannt, wie der pO_2 im Perfusat über die betrachtete Phase verlaufen könnte (grünes Segment in Abb. 3.44A im Vergleich mit Abb. 3.17), wobei sich die ILU-Situation von der im Modellversuch reinen Diffusion auch dadurch unterscheidet, dass im ersten Fall eine vergleichsweise große Perfusatmenge aufgesättigt oder von O_2 befreit wird, wobei die Rate auch durch den eingestellten Perfusatfluss im Verhältnis zur Perfusatmenge (+Lungengewicht) begrenzt wird. In der vorliegenden Konstellation sind wenigstens acht Minuten erforderlich, um das Perfusat einmal vollständig umzuwälzen ($2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ bei 16 ml Perfusatvolumen).

Jedenfalls ist zu Beginn jedes neuen Zyklus im Perfusat und der Mauslunge eine fixe Gesamtmenge an O_2 gelöst, welche in Abhängigkeit des pO_2 im Beatmungsgas entweder von den Alveolen in das Perfusat oder aus dem Perfusat in die Alveolen diffundiert. Letzteres wurde im Experiment durch eine plötzliche Absenkung des pO_2 im Beatmungsgas erzwungen, vergleichbar einem plötzlichen Druckverlust in der Kabine eines in großer Höhe fliegenden Flugzeugs, bei dem Passagiere ohne Sauerstoffmaske bekanntlich mit jedem Atemzug Sauerstoff verlieren.

Unter Vernachlässigung des O_2 -Eigenverbrauchs der Lunge ist die Situation in den Hypoxiephasen direkt durch ein pharmakokinetisches Modell erster Ordnung (Abs. 2.7.7, Glg. 2.7) beschreibbar, bei dem ein Pharmakon intravenös in vernachlässigbar kurzer Zeit verabreicht und dann langsam und unverändert wieder ausgeschieden wird, was üblicherweise am Beispiel der Niere dargelegt wird. In einigem Unterschied zur Niere kann die Lunge den hier einem Wirkstoff entsprechenden Sauerstoff aber auch wieder in das Perfusat einbringen. Weil in beiden Fällen ein durch eine Konzentrationsdifferenz angetriebener Diffusionsprozess die Geschwindigkeit des Stofftransports bestimmt, sollte das pharmakokinetische Modell in beiden Richtungen funktionieren. Abb. 3.45 soll den Gedanken verdeutlichen:

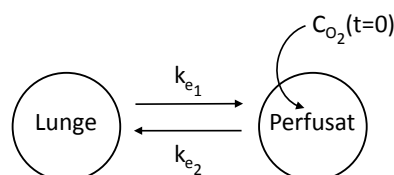


Abbildung 3.45: Pharmakokinetik 1. Ordnung Der Austausch zwischen Perfusat und der Gasphase in den Alveolen erfolgt durch Diffusion. Zu Beginn jeder Beatmungsphase ($t = 0$) ist eine fixe, wenn auch in absoluten Einheiten unbekannt Menge O_2 im Perfusat gelöst: $C_{O_2}(t = 0)$. Bei im Verlauf der Beatmungsphase konstanter O_2 -Konzentration im Beatmungsgas diffundieren zu einem beliebigen Zeitpunkt $k_{e1} \cdot C_{O_2}(t)$ Einheiten aus den Alveolen in das Perfusat oder umgekehrt $k_{e2} \cdot C_{O_2}(t)$ Einheiten aus dem Perfusat in die Lunge.

Eine Schwierigkeit der Anwendung von Glg. 2.7 besteht darin, dass die in Form von Residuen

vorliegenden Daten um einen Mittelwert von Null schwanken, was negative Werte für die Konzentration mit sich bringt. Dem könnte dadurch begegnet werden, dass zuvor die Datenpunkte der Kurve durch Addition einer Konstante so verschoben werden, dass sie immer größer oder gleich Null sind, oder alternativ dadurch, dass das Modell diesen *Offset* als Konstante mit einbezieht:

$$r(m(s(t))) = a - c_0 \cdot e^{-k \cdot t} \quad (3.6)$$

Hierbei sind $r(m(s(t)))$ wieder die Residuen des *SSasymptOff*-Modells m des *SpinFit*-Signals $s(t)$. t enthält die jeweils mit $t = 0$ beginnenden Startzeitpunkte der betrachteten Phase. Der zusätzliche Term a ist der oben angesprochene *Offset*, der durch das Arbeiten auf Residuen erforderlich wird (\rightarrow Anhebung der Kurve über das Null-Niveau). c_0 ist die in absoluten Einheiten unbekanntes O_2 -Anfangskonzentration jeder Phase, hier ausgedrückt in molaren CM^\bullet -Äquivalenten. Das Vorzeichen von c_0 ist negativ, weil das ESR-Signal umgekehrt proportional zur O_2 -Konzentration verläuft. Die Konstante k steht hier für die Geschwindigkeit der Elimination aus dem Perfusat bzw. der Aufnahme von Sauerstoff aus den Alveolen in das Perfusat. Diese Werte lassen sich nach Glg. 2.8 in eine Halbwertszeit umrechnen. Weil auf Residuen gerechnet wird, die um einen mittleren Wert von Null oszillieren, ändert sich das Vorzeichen von c_0 phasenabhängig.

Zur Anwendung von Glg. 3.6 wurden die *SpinFit*-Residuen an den Grenzen der Beatmungsphasen segmentiert und für jede vollständig gemessene Normoxie- oder Hypoxiephase separat ein Modell mittels *nls* angepasst. Die daraus folgenden Einzelgraphen sind neben den fast durchweg als hochsignifikant bewerteten Modellkoeffizienten für a , c_0 und k im Anhang im Abs. A.1 dokumentiert und in Tab. 3.3 zusammengefasst. Mit einem p-Wert von 0,03 für c_0 bildet Phase 1 die einzige Ausnahme.

Phase	O_2 [%]	$a \pm se$ [$\mu M CM^\bullet$]	$c_0 \pm se$ [$\mu M CM^\bullet$]	k [1/s]
1	21	-4.6e-07±5.4e-08 ***	-9.0e-07±2.3e-07 ***	0.0110±0.00500 *
2	1	1.4e-06±1.3e-07 ***	2.6e-06±1.8e-07 ***	0.0061±0.00110 ***
3	21	-1.0e-06±1.8e-07 ***	-2.5e-06±1.8e-07 ***	0.0034±0.00074 ***
4	1	1.7e-06±1.1e-07 ***	3.5e-06±1.9e-07 ***	0.0066±0.00089 ***
5	21	-1.8e-06±1.5e-07 ***	-3.9e-06±2.0e-07 ***	0.0039±0.00057 ***
6	1	1.8e-06±3.0e-07 ***	4.2e-06±2.6e-07 ***	0.0042±0.00082 ***
7	21	-1.8e-06±1.9e-07 ***	-4.3e-06±2.5e-07 ***	0.0060±0.00096 ***
8	1	1.3e-06±1.2e-07 ***	3.5e-06±1.9e-07 ***	0.0054±0.00076 ***

Tabelle 3.3: Nach der in Abb. 3.47 definierten Phasenbezeichnung angeordnete, aus den *SpinFit* Residuen gemäß Glg. 3.6 nach Abb. 3.45 berechnete Modellparameter. $a \pm se$: Wert des Modellkoeffizienten a \pm Standardfehler (*Offset* zwecks Verschiebung der Daten ins Positive), $c_0 \pm se$: Wert des Modellkoeffizienten c \pm Standardfehler (Ausgangskonzentration), $k \pm se$: Wert des Modellkoeffizienten k \pm Standardfehler (Geschwindigkeitskonstanten k_{e1} bzw. k_{e2}), *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$; ns : $p \geq 0,05$

Die in Abb. 3.46 wieder zusammengeführten Einzelsegmente wurden als grüne und rote Kurvensegmente zusammen mit den Residuen des *SSasympOff*-Modells eingezeichnet, wobei das rote Segment den Zeitabschnitt markiert, zu dem in den von *SpinFit* berechneten, nicht weiter geglätteten Linienbreiten während einer Hypoxiephase ein Minimum oder während einer Normoxiephase ein Maximum auftrat.

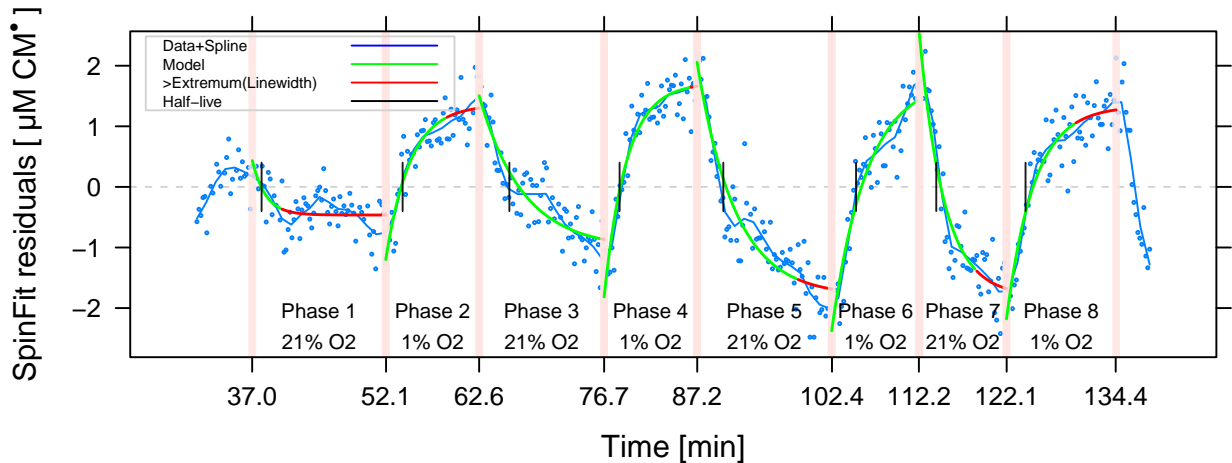


Abbildung 3.46: Anpassung eines O_2 -Modells an die SpinFit/SSasympOff-Residuen. Gemeinsame Darstellung der Residuen aus Abb. 3.44 zusammen mit den sich aus dem O_2 -Modell (Glg. 3.6) ergebenden Graphen. Die Grenze zwischen den grünen und den roten Segmenten entspricht der Lage des jeweiligen Extremums der Werte der nicht weiter geglätteten SpinFit-Linienbreite in Abb. 3.44C. Die schwarz eingezeichnete Lage der aus der Anpassung des Parameters k folgenden Halbwertszeiten (*Half-live*) T_e der An- bzw. Abreicherung liegen auf oder in der Nähe des Schnittpunkts zwischen den grün beginnenden Modelllinien und der grau gestrichelt dargestellten Horizontalen bei $0 \mu\text{M CM}^\bullet$.

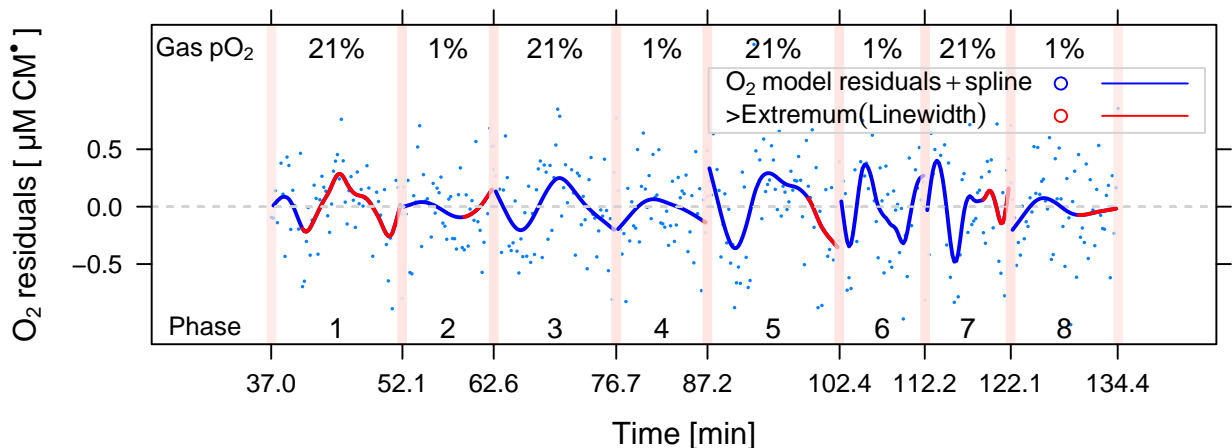
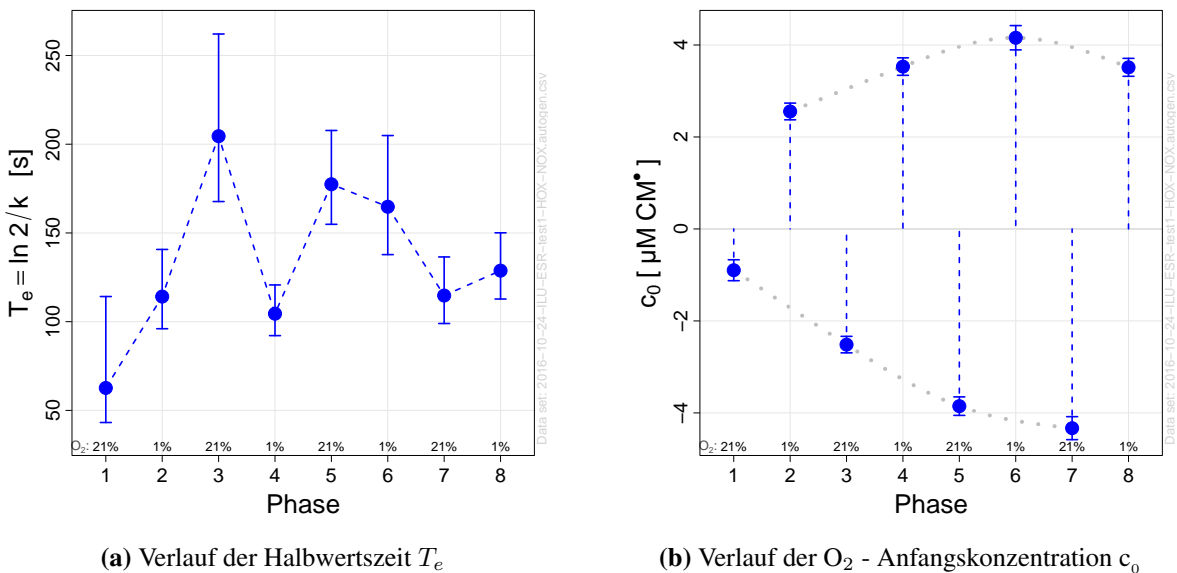


Abbildung 3.47: Residuen des O_2 -Modells. Nach Abzug des SpinFit-Modells und des O_2 -Modells verbleibende Residuen. Ohne weitere Verarbeitung erwecken die durch das O_2 -Modell nicht erklärlichen Reste den Eindruck von Signalrauschen. Die teils blauen, teils roten Linien sind nach Phasen getrennt berechnete Splines, die wieder einen mittleren Verlauf kenntlich machen sollen. Die Grenze zwischen den hier blauen und roten Segmenten entspricht der Lage des jeweiligen Extremums der Werte der **nicht** weiter geglätteten SpinFit-Linienbreite in Abb. 3.44C. Phase 1 unterscheidet sich auch in dieser Hinsicht deutlich von allen darauf Folgenden.

Nach dem Matrjoschka-Prinzip auf die Residuen des *SpinFit*-Modells angewandt, lassen sich aus dem pharmakinetischen Modell wiederum Residuen berechnen. Mittels eines glättenden *Splines* kann auch wieder ein mittlerer Verlauf herausgehoben werden (Abb. 3.47), wobei das Restsignal nicht mehr weit von der mit den gewählten ESR-Parametern erzielbaren Rauschgrenze entfernt ist.

Aus den phasenweisen Anpassungen des pharmakinetischen Modells lassen sich zwei die ILU-Methodik selbst erhellende Zeitreihen gewinnen. Wie oben erwähnt, können die im Zuge der Kurvenanpassung berechneten Werte für k , welche die Krümmung der Kurve bestimmen, auch als Halbwertszeiten ausgedrückt werden. Dann repräsentieren diese Werte die Zeit, die bis zur Auswaschung von bzw. bis zum Anstieg auf 50% der zu Beginn der Phase angetroffenen Konzentration vergeht (Abb. 3.48a).



(a) Verlauf der Halbwertszeit T_e

(b) Verlauf der O_2 - Anfangskonzentration c_0

Abbildung 3.48: Verlauf der Halbwertszeiten T_e und der Anfangskonzentrationen c_0 zu Beginn jeder Phase, welche durch Anpassung von Glg. 3.6 an die u. a. in Abb. 3.46 dargestellten Residuen des *SSasypOff*-Modells jeweils phasenweise berechnet wurden. Auf der Abszisse sind in beiden Graphen die in Abb. 3.46 dort am unteren Rand fett eingedruckten Folgenummern der Beatmungsphasen aufgetragen, darüber auch die jeweils zugehörige O_2 -Konzentration im Beatmungsgas. (a) Die Halbwertszeiten für die Ein- oder Austragung von O_2 sollten über das Perfusatvolumen mit der Diffusionskapazität in Zusammenhang stehen. Die hier asymmetrischen Fehlerbalken entsprechen den gemäß Glg. 2.8 zusammen mit k transformierten Standardfehlern aus den phasenspezifischen Modellausgaben (Tab. 3.3) (b) Die positiven und negativen Werte sind als Schwankung der O_2 -Konzentration um einen zeitlichen Mittelwert zu verstehen, ausgedrückt in CM^* -Äquivalenten. Die grau gepunkteten, eine Schwingung andeutenden, einhüllenden Linien sind *Splines*. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardfehlern für c_0 aus den phasenspezifischen Modellausgaben.

Kapitel 4

Reaktive Sauerstoffspezies als potentieller Biomarker zur Diagnose akuter Abstoßungsreaktionen von Lungentransplantaten

4.1 Einleitung

4.1.1 Akute Abstoßung

Die Lungentransplantation stellt eine gut etablierte Therapieoption für Patienten mit chronisch-irreversiblen Lungenerkrankungen der Atemwege im Endstadium dar. Das mittlere Langzeitüberleben liegt derzeit bei 5,6 Jahren [280–282]. Eine der Hauptkomplikationen bei transplantierten Patienten ist eine akute Abstoßung [*acute rejection* (AR)]. Gemäß des von der *International Society for Heart and Lung Transplantation* (ISHLT) geführten Registers erleiden 50 bis 70 % der Patienten mindestens eine AR innerhalb des ersten Jahres nach der Transplantation [282]. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Häufigkeit und Schwere einer AR mit einem ansteigenden Risiko einer chronischen Transplantatdysfunktion und der Entwicklung eines Bronchiolitis obliterans Syndroms (BOS) [283, 284] bzw. nach neuer Definition einer chronischen Dysfunktion des Lungentransplantats [*chronic lung allograft dysfunction* (CLAD)] [285–287] assoziiert ist. Die Behandlung einer frühzeitig erkannten AR könnte somit die Langzeitprognose des Transplantats verbessern.

4.1.2 Diagnose und Therapie

Die Klinik der AR ist unspezifisch. Atemnot, Fieber und pleuritische Schmerzen können ebenso auftreten wie bei einer Entzündung der Lunge aufgrund einer Infektion. Ein Abfall des arteriellen

pO₂ und der Verlauf der Einsekundenkapazität [*forced expiratory volume in one-second* (FEV₁)] liefern weitere diagnostische Hinweise. In der Röntgendiagnostik sind neu aufgetretene Infiltrate, *Air trapping* (Überblähung der Lunge), septale Verdickungen, milchglasartige Verdichtungen und Verdickung der bronchialen Wand als Zeichen mit absteigender Sensitivität oder Pleuralergüsse beschrieben worden [210, 288].

Die Therapie der Abstoßungsreaktion durch zeitweise Steigerung der Immunsuppression ist gegenüber der Therapie einer Infektion durch Einleitung einer antiinfektiösen Behandlung diametral verschieden. Liegt eine Infektion vor, kann eine irrtümlich verstärkte Immunsuppression das Leben des Patienten ebenso gefährden wie eine unterlassene Immunsuppression bei einer tatsächlich vorliegender Abstoßung. Eine Unterscheidung ist anhand klinischer, nicht invasiver Routineuntersuchungen meist nicht, oder nicht ausreichend sicher möglich. Daher wird derzeit eine invasive Abklärung durch bronchoskopische Biopsie als unerlässlich angesehen.

Die Diagnose einer AR ergibt sich aus der Histologie, die durch Bronchoskopie und transbronchiale Biopsie (TBB) gewonnen wird. Für die Beurteilung der Abstoßung müssen mindestens fünf genügend große Lungenparenchymfragmente mit jeweils mehr als 20 Alveolen vorliegen, um eine adäquate Sensitivität zu erreichen [210, 281]. Eigentlich werden 100 beurteilbare Alveolen angestrebt, was jedoch mit fünf Biopsien nicht immer erreichbar ist. Deshalb werden am UKGM zweimal fünf Biopsien entnommen.

Category	Grade	Meaning	Appearance
A: acute rejection	0	None	Normal lung parenchyma
	1	Minimal	Inconspicuous small mononuclear perivascular infiltrates
	2	Mild	More frequent, more obvious, perivascular infiltrates, eosinophils may be present
	3	Moderate	Dense perivascular infiltrates, extension into interstitial space, can involve endothelialitis, eosinophiles, and neutrophils
	4	Severe	Diffuse perivascular, interstitial, and air-spaces infiltrates with lung injury. Neutrophils may be present
B: airway inflammation	0	None	No evidence of bronchiolar inflammation
	1R	Low grade	Infrequent, scattered or single layer mononuclear cells in bronchiolar submucosa
	2R	High grade	Larger infiltrates of larger and activated lymphocytes in bronchiolar submucosa. Can involve eosinophils and plasmacytoid cells
	X	Ungradable	No bronchiolar tissue available
C: chronic airway rejection - obliterative bronchiolitis	0	Absent	if present describes intraluminal airway obliteration with fibrous connective tissue
	1	Present	
D: chronic vascular rejection - accelerated graft vascular sclerosis		Not graded	Fibrintimal thickening of arteries and poorly cellular hyaline sclerosis of veins. Usually requires open lung biopsy for diagnosis.

Tabelle 4.1: Histopathologische Klassifikation (Grading) der Lungenabstoßung gemäß ISHLT-A (1996+2006) und ISHLT-BR (2006). Eine AR wird als parenchymale (acute rejection) oder bronchiale (airway inflammation) mononukleäre Entzündung definiert [281, 289]. Die hier unter Kategorie B dokumentierte Klassifikation ist von der „B“-Kategorie von 1996 zu unterscheiden (Tab. 4.2).

Eine AR wird als parenchymale (akute zelluläre Abstoßung, A-Klassifikation) definiert und von einer bronchialen, mononukleären Entzündung (lymphozytäre Bronchitis/ Bronchiolitis, B-

Klassifikation) abgegrenzt (Tab. 4.1). In Tabelle 4.1 sind die histopathologischen Klassifikationen der Lungenabstoßung gemäß ISHLT-A (1996+2006) und ISHLT-BR (2006) aufgeführt. Als klinisch relevant wird ein Abstoßungsgrad von $\geq A_2$ bzw. $\geq B_1R$ angesehen [210].

In Tabelle 4.2 sind die Gradierungen entsprechend der ISHLT-B Klassifikation von 1996 aufgelistet. In dieser Fassung wird, je nach Ausprägung der mononukleären Infiltrate in der Schleimhaut, der Nekrosen und fibrinös-eitrige Exsudate sowie der intraepithelialen Lymphozyten in keine (B_0), minimale (B_1), leichte (B_2), mäßige (B_3) und schwere (B_4) lymphozytäre Bronchitis und/oder Bronchiolitis klassifiziert [290]. Klinisch relevant ist nach dieser Klassifikation ein Abstoßungsgrad $\geq B_2$. Am UKGM werden sowohl die ISHLT-B (1996) als auch die revidierte ISHLT-BR (2006) zur Klassifizierung einer TBB herangezogen.

Category	Grade	Meaning	Appearance
B: acute rejection	0	None	No airway inflammation
	1	Minimal	Inflammation - rare scattered mononuclear cells within the submucosa of the bronchi and/or bronchioles
	2	Mild	Circumferential band of mononuclear cells and occasional eosinophils within the submucosa of bronchi and/or bronchioles
	3	Moderate	Inflammation - dense band-like infiltrate of mononuclear cells in the lamina propria of bronchi and/or bronchioles including activated lymphocytes and eosinophils, accompanied epithelial cell necrosis
	4	Severe	Inflammation - dense band-like infiltrate of activated mononuclear cells in bronchi and/or bronchioles, associated with dissociation of epithelium from the basement membrane, epithelial ulceration, fibrinopurulent exudates containing neutrophils, epithelial cell necrosis

Tabelle 4.2: Histopathologische Klassifikation (Grading) der Lungenabstoßung gemäß ISHLT B (1996).

B_1 und B_2 entsprechen B_1R (low grade), B_3 und B_4 entsprechen B_2R (high grade) der revidierten (R) Kategorien nach ISHLT-BR-2006 (Tab. 4.1) [289, 290].

4.2 Ziel der Studie

Das Ziel der hier vorliegenden Studie ist, einen möglichen Zusammenhang zwischen einer histopathologisch bestimmten AR und der mittels ESR-Spektroskopie detektierten $O_2^{\bullet-}$ -Konzentration in der BAL von Patienten nach Lungentransplantation (Ltx) zu untersuchen. Aufgrund der zugrundeliegenden Variabilität in der Klassifikation sowie der großen Heterogenität der Studienpopulation wurde nicht allein auf die $O_2^{\bullet-}$ -Konzentration als potentiellen diagnostischen Marker fokussiert, sondern zusätzlich auch die FEV_1 , die zurückgewonnene BALF und Laborparameter wie die Zusammensetzung der Leukozytenpopulationen oder der Häm siderin-Score der BAL analysiert.

4.3 Studiendesign

Bei der vorliegenden klinischen Studie handelt es sich um eine explorative Studie, die in Kooperation mit dem Lungenzentrum der Medizinischen Klinik und Poliklinik II des UKGM durchgeführt wird. Ein Ethikvotum der Ethikkommission Gießen liegt vor (AZ:187/14 vom 12. Februar 2015). Der Eintrag in das Deutsche Register Klinischer Studien (DRKS) erfolgte unter der Studien-ID DRKS00008154. Am UKGM werden Lungentransplantationen vorrangig beidseitig durchgeführt. Aufgrund des Mangels an Spenderorganen bekommen diejenigen Patienten Vorrang, die das Transplantat am dringendsten benötigen und bei denen die Lungentransplantation voraussichtlich den besten Erfolg erzielen wird. Wenn eine Spenderlunge zur Verfügung steht, wird aufgrund der Blutgruppe, der Körpergröße und des anhand medizinischer Daten berechneten Lungenallokations- *Scores* (LAS) der geeignetste Patient ermittelt.

Zum Patientenkollektiv zählen lungentransplantierte Patienten im *Surveillance*-Programm (engmaschige Beobachtung und Eingreifen bei Fortschreiten des Befundes) des UKGM, bei denen eine Bronchoskopie aus klinischer Fragestellung indiziert ist. Bei asymptomatischen Patienten werden nach einem Monat sowie nach drei, sechs, neun und zwölf Monaten nach der Transplantation transbronchiale Lungenbiopsien mit bronchoalveolärer Lavage (BAL) durchgeführt. Diagnostische Biopsien (Indikationsbiopsien) erfolgen zusätzlich bei neu aufgetretenen Symptomen oder Befunden; weitere Kontrollbiopsien werden einen Monat nach Erhebung eines pathologischen Befunds durchgeführt [291]. Für die Studie wird überschüssige Flüssigkeit der bronchoalveolären Lavage (BALF) verwendet. Die Einwilligungen der an der Studie teilnehmenden Patienten wurden nach Aufklärung durch Ärzte des UKGM schriftlich eingeholt.

Anmerkung: Ab der zweiten Studienhälfte übernahm die Doktorandin Maïke Barowski die Pflege der Patientendaten. Die im Folgenden eingeschlossenen Patienten sind Teil der Patientenkohorte, auf die auch Frau Barowski im Rahmen ihrer medizinischen Dissertation zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen BALF-Differentialzytologie, Zytokinmuster, Infektionsstatus und Abstoßungsgrad zugreift. Die Datensätze überschneiden sich teilweise.

4.3.1 Fallzahlabschätzung

Bei ca. 32 % aller Patienten tritt im ersten Jahr nach der Transplantation mindestens eine therapierelevante akute Abstoßung auf [282]. Im Lungenzentrum Gießen werden jährlich zwischen 15 - 20 Patienten transplantiert. Diese Patienten werden im ersten Jahr fünfmal bronchoskopiert und biopsiert, sodass pro Jahr etwa 85 Proben anfallen; in drei Jahren etwa 255. Zusätzlich werden Patienten, deren Transplantation schon länger zurückliegt, routinemäßig einmal pro Jahr und außerdem bei klinischem Verdacht auf eine AR untersucht. Hier fallen mindestens weitere 25 Proben pro Jahr an [291].

4.4 Ergebnisse

4.4.1 Zellzahlabhängige $O_2^{\bullet-}$ -Freisetzung durch Leukozyten

Grundsätzlich kann die *Spin probe* CMH sowohl durch $O_2^{\bullet-}$ als auch $ONOO^-$ oxidiert werden (Abs. 3.2.3.1 und 3.2.5.1). Abhängig von der Herstellungsqualität liegt CMH zu einem kleinen Teil bereits radikalisiert in Form von CM^{\bullet} vor. Während $O_2^{\bullet-}$ als Differenz zu einer zusätzlich mit pSOD versetzten Probe separat berechnet werden kann, reflektiert das Gesamtsignal die Summe aus dem CM^{\bullet} -Hintergrundsignal und beiden o. g. Spezies. Mangels einer treffenderen Bezeichnung wird im Folgenden das nach Abzug des Hintergrundsignals (anhand zellfreier Kontrollen) erhaltene Maß für diese beiden Spezies unter der Bezeichnung „CM Radical“ bzw. CM^{\bullet} subsummiert. Die Bezeichnung „absolute CM Radical“-Konzentration oder „absolute CM^{\bullet} “-Konzentration adressiert hingegen den Rohwert ohne Abzug des Hintergrundes. Weil in Gegenwart von Zellen bereits radikalisierte *Spin probe* reduziert werden kann (Abs. 3.2.3.2) liegt der Fokus im Folgenden vornehmlich auf $O_2^{\bullet-}$, während „CM Radical“ im Vergleich zum $O_2^{\bullet-}$ -Signal als Anhalt gedacht ist, um den ungefähren Anteil von $ONOO^-$ abschätzen zu können.

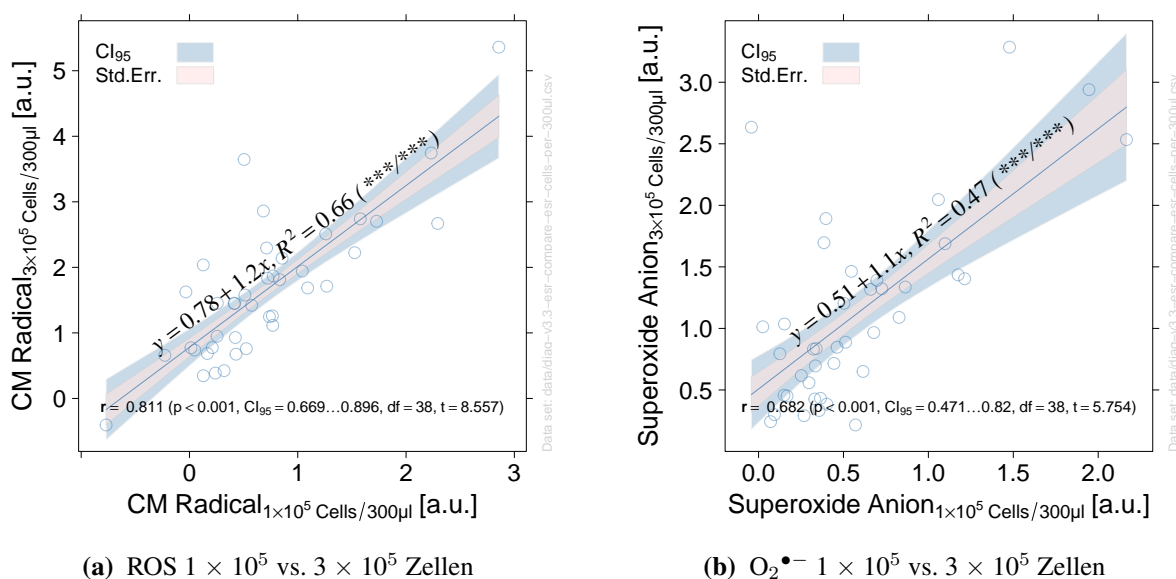


Abbildung 4.1: Lineare Regression der CM^{\bullet} - und $O_2^{\bullet-}$ -Produktion von 100 000 (Abszisse) gegen 300 000 Zellen/300 μ l (Ordinate) der BALF. Die Datenpunkte entsprechen einem Wertepaar, welches anhand der ESR-Messung zweier, im Hinblick auf den Zellgehalt verschieden konzentrierter Proben von individuellen BALF ermittelt wurde. (a) CM^{\bullet} - bzw. (b) $O_2^{\bullet-}$ -Produktion. (***/***) : Signifikanz des Intercepts und Signifikanz der Steigung der Regressionsgeraden. CI: Confidence Intervall, Std.Err: Standardfehler, ***: $p < 0,001$

Zur Etablierung eines Protokolls für den Nachweis der $O_2^{\bullet-}$ -Freisetzung von Leukozyten der BALF wurden ESR-Messungen sowohl bei Zellkonzentrationen von 100 000 Leukozyten/300 μ l ($0,3 \times 10^6$ /ml) als auch 300 000 Leukozyten/300 μ l (1×10^6 /ml) pro BALF durchgeführt. 100 000 Zellen/300 μ l wurden zusätzlich dann angesetzt, wenn nach Abzug des für die im Kontext der

Studie normalen Konzentration von 300 000 Zellen/300 µl benötigten Materials ausreichend Zellen übrigblieben. Die stichprobenartig mittels Trypan-Blau-Färbung untersuchte Viabilität lag bei >95 %. Die CM^\bullet - und $\text{O}_2^{\bullet-}$ -ESR-Intensitäten der beiden Zellkonzentrationen sind in Abb. 4.1 gegeneinander aufgetragen. Die Datenpunkte darin entsprechen einem Wertepaar, welches anhand der ESR-Messung zweier, im Hinblick auf den Zellgehalt verschieden konzentrierten Proben von BALF ermittelt wurde.

Die Regression der $\text{O}_2^{\bullet-}$ - bzw. CM^\bullet -Konzentration mit einer Zellzahl von 300 000 gegen die Konzentrationen bei einer Zellzahl von 100 000 Zellen/300 µl ergab einen jeweils hochsignifikanten, linearen Anstieg von 1,2x (CM^\bullet) bzw. 1,1x ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Nach Pearson zeigt sich mit einem r von 0,81 für CM^\bullet (Abb. 4.1a) bzw. 0,68 für die $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Konzentration (Abb. 4.1b) jeweils eine hohe Korrelation zwischen den Messwerten für 100 000 und 300 000 Zellen.

Etwas höher aufgelöst wurde die zellzahlabhängige CM^\bullet - und $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Freisetzung anhand von zwei sehr zellreichen BALF-Proben bei Konzentrationen von 50 000, 100 000, 200 000 und 300 000 Leukozyten pro 300 µl untersucht (Abb. 4.2).

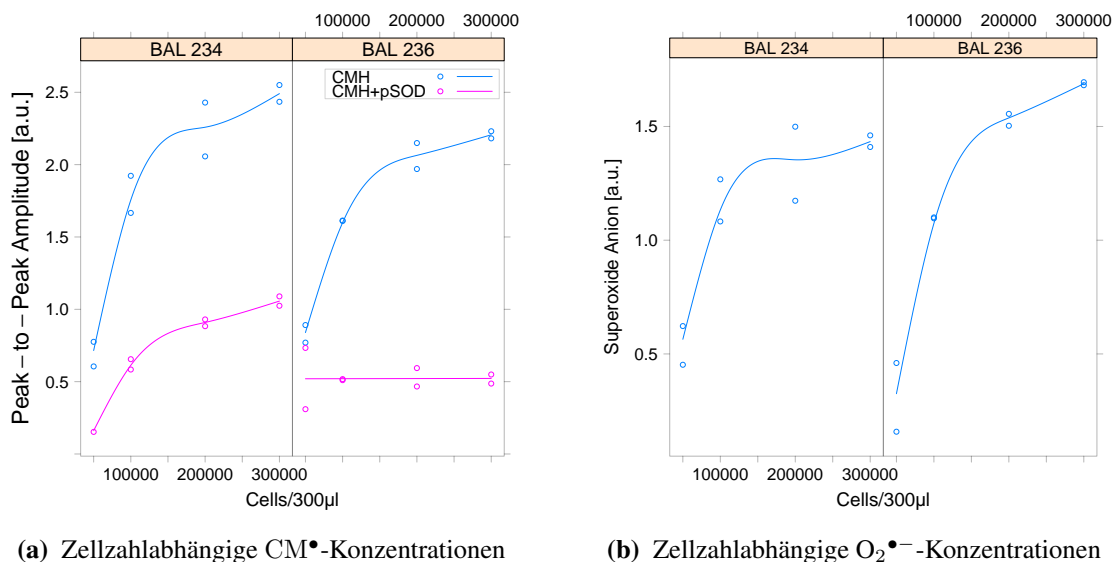


Abbildung 4.2: Abhängigkeit des CM^\bullet - und $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Signals von der Zellkonzentration in der BAL. Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei BALs bei einer Zellzahl von jeweils 50 000, 100 000, 200 000 und 300 000/300 µl. (a) Darstellung der hier absoluten CM^\bullet -Amplituden (Peak-to-Peak) von mit CMH alleine sowie der zusätzlich mit pSOD versetzten Proben. (b) $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Anteil als Differenz zwischen CMH und CMH+pSOD der CM^\bullet -Konzentrationen aus Abb. (a). Die Ausgleichskurven sind zur Verdeutlichung des asymptotischen Verlaufs eingezeichnete Splines.

In Abb. 4.2a zeigen die mit CMH alleine inkubierten Probenansätze ein mit der Zellzahl ansteigendes ESR-Signal, welches ab 100 000 Zellen/300 µl erkennbar asymptotisch gegen einen oberen Grenzwert verläuft (blaue Kurven). Probenansätze, denen sowohl CMH als auch pSOD zugesetzt wurden (rote Kurven), zeigen entweder ebenfalls einen asymptotischen Verlauf (BAL 234) oder keine Konzentrationsabhängigkeit (BAL 236). Der horizontale Verlauf der roten Kurve von BAL 236 legt nahe, dass der ROS/RNS-Anteil ($\text{O}_2^{\bullet-}$, ONOO^-) von BAL 236 vollständig aus $\text{O}_2^{\bullet-}$ besteht. Abb. 4.2b zeigt die als Differenz aus den P2P-Amplituden (Abb. 4.2a) berechneten $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Konzentrationen.

4.4.2 Einfluss des Erythrozytenanteils der auf die $O_2^{\bullet-}$ -Freisetzung

Das Vorhandensein von Blut in der BALF ist ein Zeichen für akute Blutungen, die entweder auf mechanisch bedingte Schleimhautverletzungen während der Bronchoskopie oder auf das Bestehen einer Entzündung zurückzuführen sind. Entzündungen der Bronchialschleimhaut bedingen eine größere Verletzlichkeit und damit auch eine größere Blutungsneigung während der bronchoskopischen Untersuchung. Nachdem auch eine AR des bronchialen Systems als Entzündung in Erscheinung tritt, könnte eine Blutungsneigung unter Bronchoskopie und damit Blut in der BALF eine AR anzeigen.

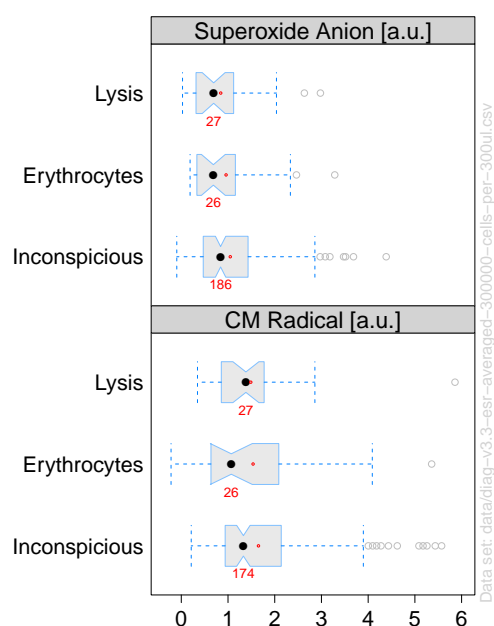


Abbildung 4.3: CM^{\bullet} und $O_2^{\bullet-}$ -Signal als Funktion des Erythrozytengehalts der BALF. Lysis: Blutig tingierte Proben, bei denen aufgrund eines hohen Erythrozytenanteils eine Erythrozytenlyse durchgeführt wurde ($n=27$). Erythrocytes: Proben mit augenscheinlich geringem Erythrozytenanteil in der BALF. Bei diesen wurde keine Erythrozytenlyse durchgeführt ($n=26$). Inconspicuous: Makroskopisch erythrozytenfreie Proben ($n=186$). **Zeichenerklärung:** siehe Abb. 4.5.

Die untersuchten Proben wurden deshalb entsprechend den Anmerkungen der Zytologie des Infektionslabors der UKGM in drei Gruppen eingeteilt und deren $O_2^{\bullet-}$ - und CM^{\bullet} -Konzentrationen untereinander verglichen (Abb. 4.3). Als unauffällig (*inconspicuous*) gelten makroskopisch erythrozytenfreie BALF-Proben. Die „Erythrocytes“ benannte Gruppe umfasst diejenigen Proben, welche dem Augenschein nach nur schwach rötlich gefärbt waren. Bei der mit „Lysis“ bezeichneten Gruppe handelt es sich um diejenigen Proben, bei denen das Infektionslabor den Erythrozytenanteil als störend hoch einschätzte und folglich, wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben, eine Erythrozytenlyse durchführte. In Abb. 4.3 ist jedoch kein Anstieg der $O_2^{\bullet-}$ - bzw. CM^{\bullet} -Konzentration in den lysierten Proben im Vergleich zu den unauffälligen oder gering kontaminierten Proben zu erkennen; eher noch zeigen die bezüglich Erythrozyten unauffälligen Proben ein geringfügig höheres Signal.

Die Fragestellung nach dem Einfluss der Erythrozyten auf die $O_2^{\bullet-}$ und CM^{\bullet} -Produktion von Immunzellen erscheint vor allem deshalb relevant, weil der O_2 -bindende Hämoglobinkomplex ein Eisen-Zentrum besitzt. Werden die Eisen-Ionen des Komplexes durch Lyse der Erythrozyten freigesetzt, könnte dies zu einem verstärkten Ablauf der Fenton-Reaktion (Glg. 1.3) und letztlich im Wege des *feed forward*-Prozesses (*ROS induced ROS*, Abs. 1.2) zu erhöhtem $O_2^{\bullet-}$ führen.

Die untersuchten Proben wurden deshalb entsprechend den Anmerkungen der Zytologie des Infektionslabors der UKGM in drei Gruppen eingeteilt und deren $O_2^{\bullet-}$ - und CM^{\bullet} -Konzentrationen untereinander verglichen (Abb. 4.3). Als unauffällig (*inconspicuous*) gelten makroskopisch erythrozytenfreie BALF-Proben. Die „Erythrocytes“ benannte Gruppe umfasst diejenigen Proben, welche dem Augenschein nach nur schwach rötlich gefärbt waren. Bei der mit „Lysis“ bezeichneten Gruppe handelt es sich um diejenigen Proben, bei denen das Infektionslabor den Erythrozytenanteil als störend hoch einschätzte und folglich, wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben, eine Erythrozytenlyse durchführte. In Abb. 4.3 ist jedoch kein Anstieg der $O_2^{\bullet-}$ - bzw. CM^{\bullet} -Konzentration in den lysierten Proben im Vergleich zu den unauffälligen oder gering kontaminierten Proben zu erkennen; eher noch zeigen die bezüglich Erythrozyten unauffälligen Proben ein geringfügig höheres Signal.

4.4.3 Charakteristika der Studienpopulation

Ltx-Indikation	Anzahl	%
CF	11	15
COPD	16	21
Lungenfibrose	30	38
PH	3	4
Sarkoidose	5	6
Andere	13	16
Summe	78	100

Tabelle 4.3: Ltx-Indikationen der Studienkohorte. Dargestellt ist der jeweilige Anteil der initialen Lungenerkrankung, die im Krankheitsverlauf zum Verlust der Lunge führte. Unter „Andere“ sind seltene Lungenerkrankungen zusammengefasst. Abk.: CF - Cystische Fibrose, COPD - Chronic Obstructive Pulmonary Disease, PH - pulmonale Hypertonie

Lungenkrankheit (DPLD) oder Lymphangioliolipomatose, die zur Ltx-Indikation und Lungentransplantation führte. Diese sind in Tabelle 4.3 unter „Andere“ zusammengefasst.

In Abb. 4.4 ist eine deutlich dreigipfelige Altersverteilung erkennbar. Die Mehrgipfeligkeit ist stark mit der initialen Lungenerkrankung der Patienten assoziiert. Der erste Peak indiziert fast ausschließlich Patienten, die an auf einen genetischen Defekt zurückzuführenden CF litten, welche bereits im Kindesalter zu einer schweren Beeinträchtigung der Lungenfunktion führt. Außerdem fallen Patienten mit einer juvenilen PH darunter (Tab. 4.3). Die Mehrzahl der Patienten, die durch den dritten Peak bei ca. 60 Jahren repräsentiert werden, waren an COPD, Lungenfibrose, letztlich einer sekundären PH erkrankt. Der Peak bei ca. 45 Jahren ist v. a. auf Überschneidungen durch ältere CF-Patienten mit dieser Gruppe zurückzuführen.

Zum Zeitpunkt der Evaluation nahmen an dieser Studie insgesamt 78 Patienten im Alter von 20 bis 73 Jahren teil. Unter ihnen befinden sich 36 Männer ($\approx 46\%$) und 42 Frauen ($\approx 54\%$). Die meisten Patienten litten vor der Lungentransplantation an einer Lungenfibrose im Endstadium (38%), *Chronic Obstructive Pulmonary Disease* (COPD) (21%) oder einer cystischen Fibrose (CF) (15%) (Tab. 4.3). Bei 16% der Patienten handelte es sich jedoch um seltene Lungenerkrankungen mit schwerem Verlauf, wie z. B. Emphysem bei Alpha-1-Antitrypsin-Mangel, diffuse parenchymale

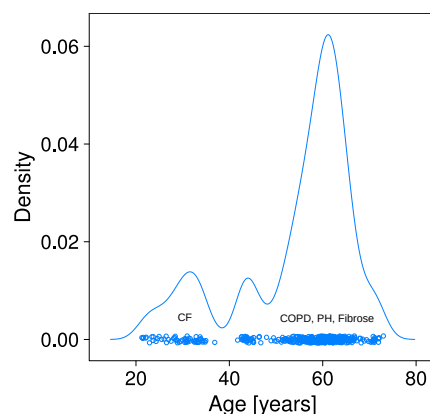


Abbildung 4.4: Mehrgipfelige Altersverteilung in Lebensjahren der in der Studienkohorte eingeschlossenen Patienten. Die dem ersten und dritten Peak zugeordneten Erkrankungen entsprechen der vorherrschenden Ltx-Indikation in diesen Altersbereichen. 1. Peak: Cystische Fibrose (CF); 2. Peak: v. a. ältere CF-Patienten; 3. Peak: Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), Lungenfibrose, sekundäre pulmonale Hypertonie (PH); Density - Verteilungsdichte

zurückzuführen.

4.4.4 Vergleich der $O_2^{\bullet-}$ -Konzentration und klinischen Routinedaten mit dem Schweregrad der AR

Zum Zeitpunkt der Auswertung umfasste die Studie insgesamt 336 Biopsien. Die $O_2^{\bullet-}$ -Konzentration wurde in 238 Fällen bestimmt (Tab. 4.4). Die Vergleiche zwischen der $O_2^{\bullet-}$ -Konzentration und der klinischen Routinedaten mit den histopathologischen Diagnosen wurden auf der Grundlage von drei unterschiedlich differenzierten Klassifikationen durchgeführt (Abs. 4.1.2, Tab. 4.1 und Tab. 4.2). Da die ISHLT-BR Klassifikation jedoch empirisch ausnahmslos ISHLT-B folgt, wie mit Glg. 2.1 im Abschnitt 2.3.2 bereits verdeutlicht wurde, erbringt diese gegenüber der direkten Verwendung von ISHLT-B keinen Informationsgewinn. Deswegen wurde der Vergleich der vorliegenden klinischen und experimentellen Daten auf die Klassifikation nach ISHLT-A (1996+2006) und ISHLT-B (1996) beschränkt. In etwa 10 % der Fälle lag kein ausreichendes parenchymales Gewebe (A_x), in knapp 3 % kein geeignetes bronchiales Gewebe (B_x) für eine histopathologische Diagnose vor. Dieser Umstand führt dazu, dass entsprechend der Definition in Glg. 4.1 das Vorliegen einer schwere Abstoßung eher konstatiert werden kann, als deren nicht-Vorliegen, nämlich dann, wenn Kombinationen wie A_x mit $B_0 \dots B_1$ oder B_x mit $A_0 \dots A_1$ auftreten. Hier könnte sich hinter der A_x oder B_x -Einstufung auch eine schwere parenchymale bzw. bronchiale Abstoßung verbergen, weshalb diese Fälle im Wege einer dreiwertigen Logik (wahr, falsch, unbestimmt) letztlich nicht in die Auswertung einbezogen wurden.

4.4.5 Fallzahlen aufgeschlüsselt nach Schwere der Abstoßung

ISHLT-A	Insgesamt	davon ESR	ISHLT-B	Insgesamt	davon ESR
A_0	167	116	B_0	207	135
A_1	132	92	B_1	104	82
A_2	9	9	B_2	11	10
A_3	2	2	B_3	5	5
A_4	0	0	B_4	1	0
A_x	26	19	B_x	8	6
Summe	336	238	Summe	336	238

(a) ISHLT-A (1996+2006) (b) ISHLT-B (1996)

Tabelle 4.4: Fallzahlen nach (a) ISHLT-A-Klassifikation (1996+2006) bzw. (b) ISHLT-B-Klassifikation (1996). Abk. A_x : Es war kein parenchymales Gewebe verfügbar. B_x : Es war kein bronchiales Gewebe verfügbar.

Als Folge der hohen Effektivität der immunsuppressiven Therapie sind bei höher gradierten AR die Fallzahlen der rein parenchymalen bzw. der rein bronchialen Abstoßung sehr klein und decken zudem nicht alle Kombinationen ab. Deshalb ist eine aus pathophysiologischer Sicht sinnvolle, streng nach ISHLT-A und ISHLT-B aufgetrennte Auswertung im Kontext einer lokalen Studie an einem vergleichsweise kleinen Zentrum noch auf viele Jahre hinaus nicht sinnvoll durchführbar (Tab. 4.5). Aus diesem Grund wurde die in Tab. 4.4 dargestellte Vielzahl an Unterteilungen gemäß Glg. 4.1 unter Verwendung der Bool'schen Operatoren \parallel (oder) bzw. $\&$ (und) sowie des Mengenoperators \in in drei therapierelevante Klassen zusammengefasst. Die aus dieser Einteilung resultierenden Fallzahlen sind in Tab. 4.6 aufgeführt.

Kategorie	Frequenz
$A_0:B_0$	114
$A_0:B_1$	48
$A_0:B_2$	3
$A_0:B_3$	1
$A_0:B_4$	1
$B_0:A_0$	114
$B_0:A_1$	80
$B_0:A_2$	2
$B_0:A_3$	1
$B_0:A_X$	10

Tabelle 4.5: Fallzahlen der rein parenchymalen (ISHLT-1996+2006 $A = A_0$) und der rein bronchialen (ISHLT-1996 $B = B_0$) AR.

$$AR(A, B) = \begin{cases} \textit{keine} & \text{wenn } A = A_0 \ \& \ B = B_0 \\ \textit{moderat} & \text{wenn } (A = A_1 \ \& \ B \in B_0 \dots B_1) \ \parallel \ (B = B_1 \ \& \ A \in A_0 \dots A_1) \\ \textit{schwer} & \text{wenn } (A \in A_2 \dots A_4) \ \parallel \ (B \in B_2 \dots B_4) \end{cases} \quad (4.1)$$

Wird das *Outcome* nach Vorliegen bzw. nicht-Vorliegen einer AR aufgeschlüsselt, lag bei männlichen in 68 % und bei weiblichen Patienten bei 61 % der Fälle eine AR vor (Tab. 4.7). Wie einleitend bereits ausgeführt, werden die Patienten im *Surveillance*-Programm der UKGM regelhaft mehrfach biopsiert, sodass auch hier die Anzahl der „Fälle“ als Anzahl der Untersuchungsfälle bzw. bioptisch gestützten Diagnosen verstanden werden soll.

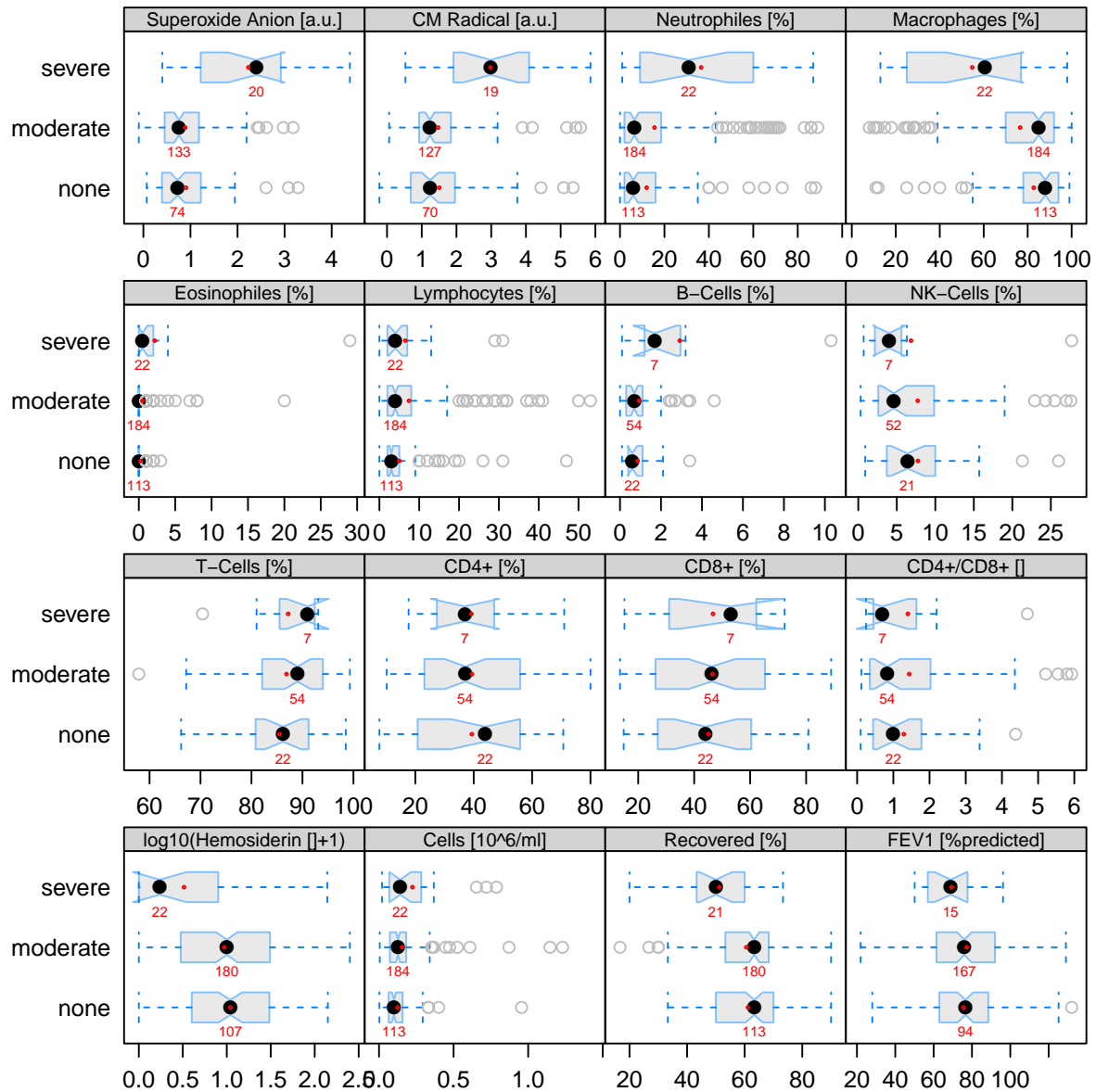
Abstoßung	Insgesamt	davon ESR
keine	114	74
moderat	184	125
schwer	22	20
Summe	320	219

Tabelle 4.6: Aus Glg. 4.1 resultierende Fallzahlen.

Geschlecht	Fälle	keine AR	moderate AR	schwere AR	Abstoßung	Abstoßung %
männlich	144	46	88	10	98	68
weiblich	176	68	96	12	108	61
Summe	320	114	184	22	206	64

Tabelle 4.7: Fallzahlen nach Diagnose und Geschlecht des Patienten. In der Kategorie „Abstoßung“ wurden moderate und schwere AR zusammengefasst.

4.4.6 Superoxid-/CM[•]-Konzentrationen und BAL-Charakteristika nach Klassifizierung als keine, moderate und schwere AR

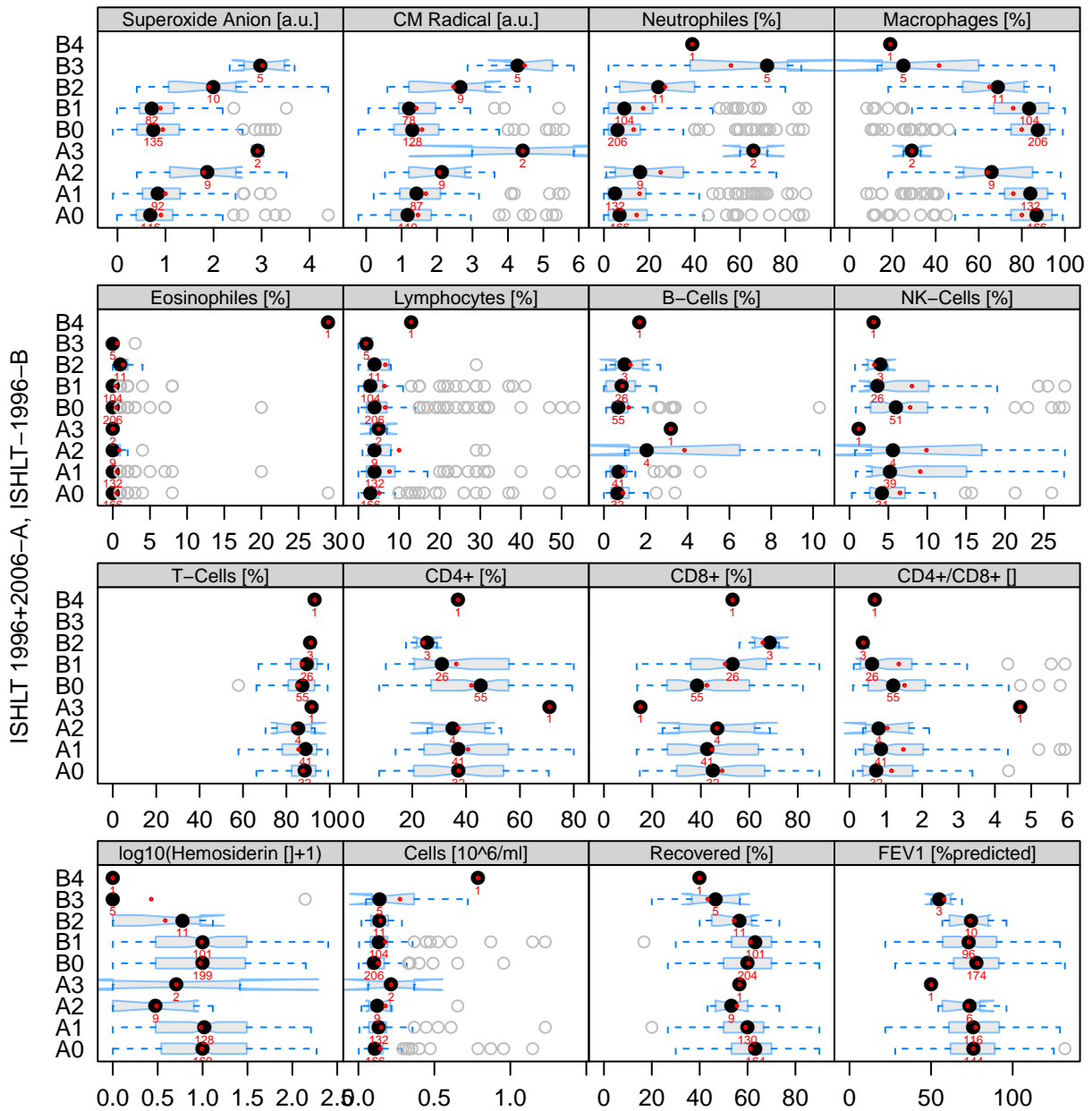


Data set: data/diag-v3.3-esr-averaged-30000-cells-per-300ul.csv

Abbildung 4.5:

O₂^{•-} und CM[•]-Konzentrationen sowie anderer BALF-Charakteristika nach Klassifizierung gemäß Glg. 4.1 nebst klinischer Routinedaten. Es zeichnet sich ein positiver Trend der CM[•]/O₂^{•-}-Konzentration, Neutrophilen und B-Lymphozyten mit zunehmenden Abstoßungsgrad ab. Ein negativer Trend ist bei Makrophagen, Hämosiderin-Score und BALF-Recovered zu erkennen. CM Radical: ESR-Signal nach Abzug des Hintergrundsignals als Maß für die Summe aus O₂^{•-} und ONOO⁻. **Zeichenerklärung:** Die kleinen roten Punkte markieren Mittelwerte, während die Mediane groß und schwarz erscheinen. Die Lage des Medians innerhalb des 50% aller Daten umfassenden Kastens vermittelt einen Eindruck von der Symmetrie der Verteilung der Daten. Die roten Zahlen darunter geben die Anzahl der Fälle je Abstoßungsgrad an. Die blauen Ausläufer entsprechen grob einem 95% aller Daten umfassenden Konfidenzintervall, als graue Kreise sind Ausreißer gekennzeichnet. Falls sich die Einkerbungen in den Boxen zweier Gruppen **nicht** überlappen und der Mittelwert in der Nähe des Medians zu liegen kommt, besteht wahrscheinlich ein signifikanter Unterschied zwischen diesen Gruppen auch bezüglich ihrer Mittelwerte. Der Hämosiderin-Score wurde zur Verdeutlichung des in den Daten enthaltenen Trends logarithmiert. Die Addition von 1 wurde vorgenommen, um den Ausdruck log(0) = -∞ zu vermeiden. „Rejection class“: Abstoßungsklasse „BALF-Recovered“: zurückgewonnene Lungenspülflüssigkeit, „FEV1 [%predicted]“: FEV₁ [%Soll],

4.4.7 Superoxid-/CM[•]-Konzentrationen und BAL-Charakteristika nach ISHLT-A (1996+2006) und ISHLT-B (1996)



Data set: data/diag-v3.3-esr-averaged-30000-cells-per-300ul.csv

Abbildung 4.6: Analyse der O₂^{•-} und CM[•]-Konzentration und der BALF-Charakteristika nach ISHLT-A (1996+2006) und ISHLT-B (1996) und klinischer Routinedaten. Es zeichnet sich ein positiver Trend zwischen O₂^{•-}- und CM[•]-Konzentration und Neutrophilen mit zunehmenden Abstoßungsgrad ab. Ein Anstieg der B-Zellen scheint mit einem höheren A-Grad einher zu gehen, ein Anstieg der CD8⁺-T-Zellen hingegen mit einem ansteigenden B-Grad. Ein negativer Trend ist bei Makrophagen, BALF-Recovered und Hämosiderin-Score erkennbar. Ein tendenzieller Abfall zeichnet sich auch bei CD4⁺-T-Zellen mit zunehmenden B-Grad ab. CM Radical: ESR-Signal nach Abzug des Hintergrundsignals als Maß für die Summe aus O₂^{•-} und ONOO⁻. **Zeichenerklärung:** siehe Abb. 4.5. „BALF-Recovered“: zurückgewonnene Lungenspülflüssigkeit, „FEV1 [%predicted]“: FEV₁ [%Soll],

4.4.8 Erhöhte $O_2^{\bullet-}$ -Konzentration bei einer schweren AR

Die nach Glg. 4.1 negativen Fälle lassen sich von moderaten bisher nicht unterscheiden (Abb. 4.7a). Dagegen ist die $O_2^{\bullet-}$ -Konzentration bei Vorliegen einer schweren akuten Abstoßungsreaktion mit $\approx 2,2$ [a.u.] gegenüber den $O_2^{\bullet-}$ -Konzentrationen bei nicht-Bestehen oder bei Vorliegen einer moderaten AR mit $\approx 0,9$ [a.u.] hochsignifikant erhöht (Abb. 4.7b). Die Berechnung erfolgte mittels eines Gamma-verteiltern glm-Modells mit ausweislich des (hier nicht dargestellten) QQ-Plots normalen Residuen auf Basis der in Tab. 4.6 aufgeführten Fallzahlen. Bei Anwendung der CM^{\bullet} -Standardkurve für gefrorene Proben (Abb. 3.9a) lassen sich aus den durchschnittlich $\approx 0,9$ [a.u.] (keine oder moderate AR) und $\approx 2,2$ [a.u.] (schwere Fälle) molare $O_2^{\bullet-}$ -Konzentrationen von $\approx 26 \mu\text{M/L}$ respektive $\approx 65 \mu\text{M/L}$ berechnen.

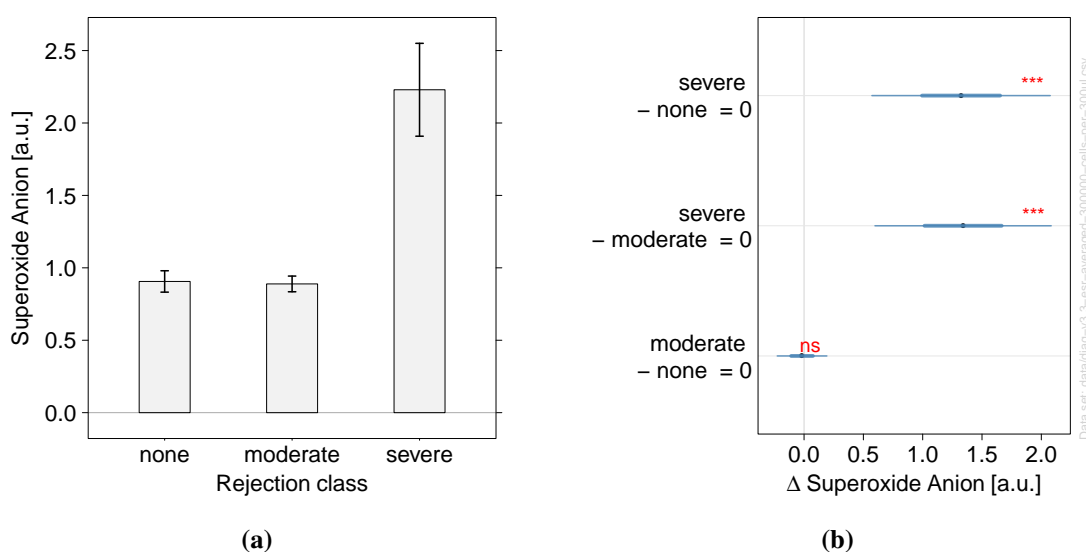


Abbildung 4.7: Vergleich der $O_2^{\bullet-}$ -Konzentrationen bei keiner, einer moderaten oder schweren AR.

(a) Die $O_2^{\bullet-}$ -Konzentration ist bei Vorliegen einer schweren AR im Vergleich zu einer moderaten oder keiner AR stark erhöht. Die dünnen Linien zeigen den Standardfehler. (b) Statistischer Vergleich zwischen einer schweren AR und keiner bzw. einer moderaten AR. Dicke Linien repräsentieren den Standardfehler der Differenz der Gruppenmittelwerte, dünne Linien das zugehörige 95% CI. *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$; ns : $p \geq 0,05$ Die Einteilung in keine (none), moderate und schwere (severe) AR erfolgte nach Glg. 4.1. Die Fallzahlen sind in Tab. 4.6 aufgeführt.

4.4.9 BAL-Charakteristika in Abhängigkeit vom Abstoßungsgrad

Um mögliche Veränderung der Zusammensetzung der Leukozytenpopulationen in der BAL während einer AR zu erkennen, wurden die durch das Infektionslabor der UKGM routinemäßig erfassten zytologischen Daten ausgewertet. Neben der Bestimmung der prozentualen Anteile an Makrophagen, Neutrophilen, Eosinophilen und Lymphozyten wurden auch der Hämosiderin-Score und die Menge der nach der Bronchoskopie zurückgewonnenen Lungenspülflüssigkeit (BALF-Recovered) analysiert. Wie im Abschnitt 2.3.3.4 beschrieben, werden im Infektionslabor des UKGM mittels FACS-Analyse auch die Anteile der B-Zellen, T-Zellen und NK-Zellen

bestimmt, wenn der Lymphozyten-Anteil der BALF $\geq 6-8\%$ ist. Dies traf jedoch lediglich bei $\approx 25\%$ der BALFs zu.

Aufgrund des meist geringen Anteils an Lymphozyten und selten vorkommenden Eosinophilen ist der prozentuale Anteil der Neutrophilen an der gesamten Leukozytenzahl in der BALF nahezu komplementär zum Anteil der Makrophagen. Die in Abb. 4.6 dargestellten Graphen zeigen einen sukzessiven Abfall der Makrophagen von A_0 bis A_3 sowie B_0 bis B_4 . Im Vergleich zum Makrophagenanteil scheint aber der Zusammenhang zwischen dem Anstieg der Neutrophilen und steigenden Abstoßungsgrad weniger markant zu sein.

Eosinophile waren nur in ca. 10% der Fälle nachweisbar. Wenn als histopathologische Diagnose ISHLT-A bzw. ISHLT-B separat zugrunde gelegt wird, ist derzeit kein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen der Schwere der AR und den Eosinophilen ersichtlich (Abb. 4.6). Bei Zusammenfassung der Diagnosen in keine, eine moderate oder eine schwere AR deutet sich ein Anstieg der Eosinophilen an (Abb. 4.5).

Der Lymphozytenanteil ist bei derzeitiger Datenlage kein Indikator für eine AR, wie anhand der fehlenden Trennschärfe der Boxplots deutlich wird (Abb. 4.5 und 4.6). Bei Differenzierung der Lymphozyten in Subpopulationen scheint jedoch ein hoher B-Zellanteil ein Hinweis auf eine AR zu sein. Mit steigendem Abstoßungsgrad zeigt sich auch ein tendenzieller Abfall des Anteils an NK-Zellen und $CD4^+$ -T-Zellen sowie ein Anstieg des Anteils an $CD8^+$ -T-Zellen. Bei diesen drei Subpopulationen sind die Trends hauptsächlich bei bronchialen mononukleären Entzündungen (ISHLT-B), nicht jedoch einer parenchymalen AR ausgeprägt (Abb. 4.6).

Eine geringere Anzahl Hämosiderin-beladener Alveolarmakrophagen, die sich in einem abfallenden Hämosiderin-Score widerspiegelt, scheint mit einer schweren Abstoßung assoziiert zu sein (Abb. 4.5 und 4.6). Hämosiderin wird u. a. als Zeichen einer Vaskulitis bewertet und könnte somit auf eine schon länger bestehenden Entzündung infolge einer AR hinweisen. Hinsichtlich der Gesamtzellzahl der BALF ist mit zunehmenden Abstoßungsgrad eine allenfalls subtile Verschiebung nach rechts zu beobachten (Abb. 4.5, „Cells [$10^6/ml$]“).

4.4.10 Korrelation zwischen Superoxid-/ CM[•]-Konzentration und Leukozytenpopulationen bei einer schweren AR

Der Zusammenhang zwischen CM[•] bzw. O₂^{•-}-Produktion und dem prozentualen Anteil der Makrophagen und Neutrophilen in der BALF wurde anhand eines linearen Regressionsmodells berechnet und zusätzlich der Korrelationskoeffizient ρ nach Spearman ermittelt (Abb. 4.8). Es wurden gemäß Tab. 4.6 diejenigen Fälle einbezogen, bei denen histopathologisch nach Glg. 4.1 eine schwere AR diagnostiziert wurde und ESR-Messungen vorlagen.

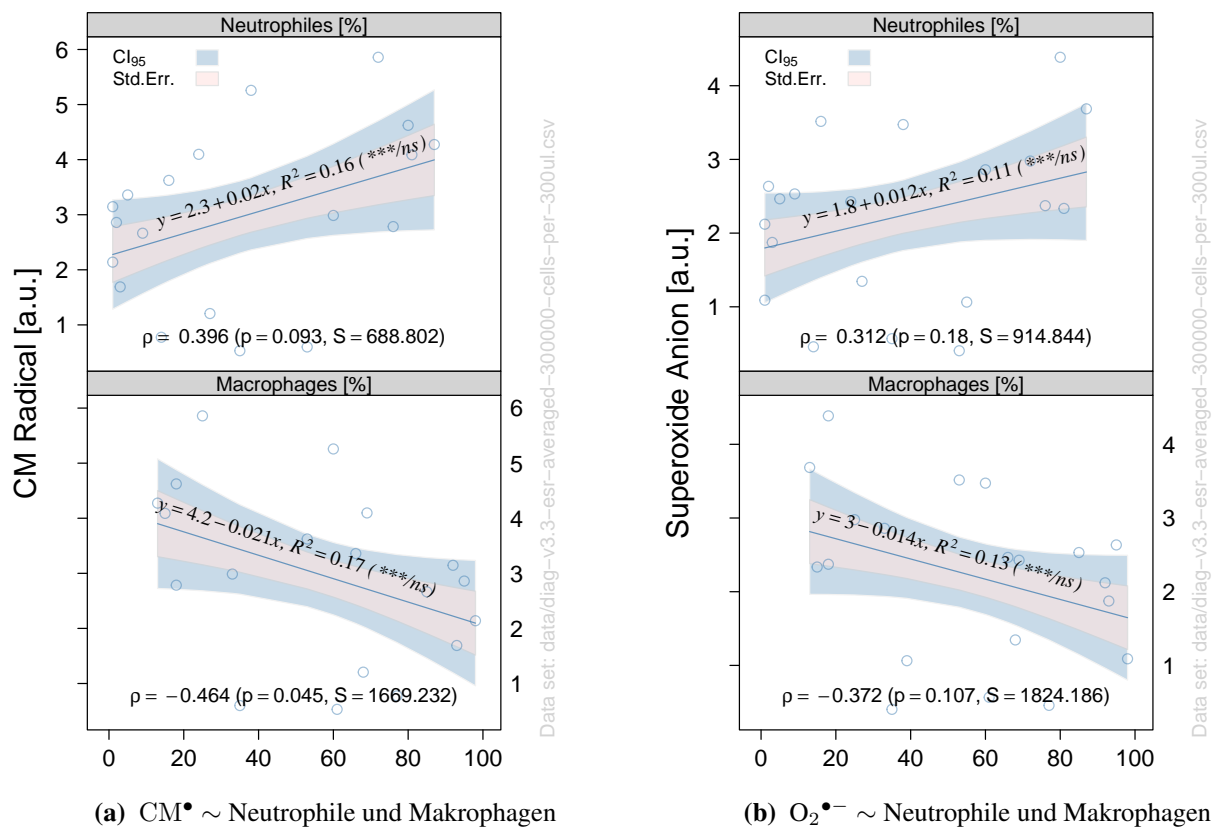


Abbildung 4.8: Regression von CM[•] und O₂^{•-} gegen den prozentualen Anteil der Makrophagen und Neutrophilen in der BALF. Zwischen der O₂^{•-}-Konzentration als auch der CM[•]-Konzentration und den beiden Leukozytenpopulationen liegt kein signifikanter linearer Zusammenhang vor. Zwischen Neutrophilen und CM[•] bzw. O₂^{•-} ist die Korrelation schwach positiv zwischen Makrophagen und CM[•] bzw. O₂^{•-} schwach negativ. Die Werte für R^2 als auch Spearman's ρ zeigen einen nur schwachen Zusammenhang an. CM Radical (CM[•]): ESR-Signal nach Abzug des Hintergrundsignals als Maß für die Summe aus O₂^{•-} und ONOO⁻. (***/**): Signifikanz des Intercept und Signifikanz der Steigung der Regressionsgeraden. *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$; ns : $p \geq 0,05$

Anhand der Steigung der Regressionsgeraden kann kein signifikanter Zusammenhang zwischen CM[•]-Konzentration als Maß für die Summe aus O₂^{•-} und ONOO⁻ (Abb. 4.8a) oder der berechneten O₂^{•-}-Konzentration (Abb. 4.8b) und dem Anteil der Neutrophilen bzw. Makrophagen nachgewiesen werden. Zwischen Neutrophilen und CM[•] bzw. O₂^{•-} besteht eine positive Korrelation ($\rho = 0,396$ bzw. $0,312$), zwischen Makrophagen und CM[•] bzw. O₂^{•-} eine negative Korrelation ($\rho = -0,464$ bzw. $-0,372$).

4.4.11 Beziehung zwischen der FEV₁ und dem Anteil der zurückgewonnenen BALF

Als quantitatives Maß der Atemwegsobstruktion (Behinderung des Atemflusses durch Verengung der Atemwege) wurde die FEV₁ sowohl mit dem prozentualen Anteil der Neutrophilen und Makrophagen als auch dem Prozentsatz der zurückgewonnenen BALF korreliert und durch lineare Regression quantifiziert (Abb. 4.9).

Es zeigte sich ein jeweils hochsignifikanter linearer Zusammenhang zwischen FEV₁ und dem Anteil der zurückgewonnenen BALF (Recovered [%]), sowie dem Anteil an Makrophagen und Neutrophilen. Anhand der zwischen FEV₁ und dem zurückgewonnenen Anteil der BALF berechneten Regression entsprach ein Abfall der zurückgewonnenen BALF um 10 % (15 ml) einer Reduktion der FEV₁ um 3,4 %. Unter den nach Spearman berechneten Korrelationen zeigte diejenige zwischen FEV₁ und dem Makrophagenanteil den höchsten Wert ($\rho = 0,37$). Die prozentualen Werte der FEV₁ und der zurückgewonnenen BALF korrelierten ebenfalls positiv ($\rho = 0,21$). Im Gegensatz dazu bestand bei dem Neutrophilenanteil eine negative Korrelation zur FEV₁ ($\rho = -0,28$).

In Abb. 4.10 wird der prozentuale Anteil der zurückgewonnenen BALF nach Schweregrad der histopathologisch diagnostizierten AR dargestellt. Abgesehen von wenigen Ausnahmen (schwerkranke Patienten) wurde ein Volumen von 150 ml physiologischer NaCl-Lösung eingesetzt. Fälle, bei denen keine oder eine moderate AR vorlag, konnten anhand des Anteils an zurückgewonnener BALF nicht voneinander unterschieden werden. Dieser lag jeweils bei ca. 60 %. Im Gegensatz dazu verminderte sich bei schweren Fällen das zurückgewonnene BALF-Volumen auf ≈ 50 %

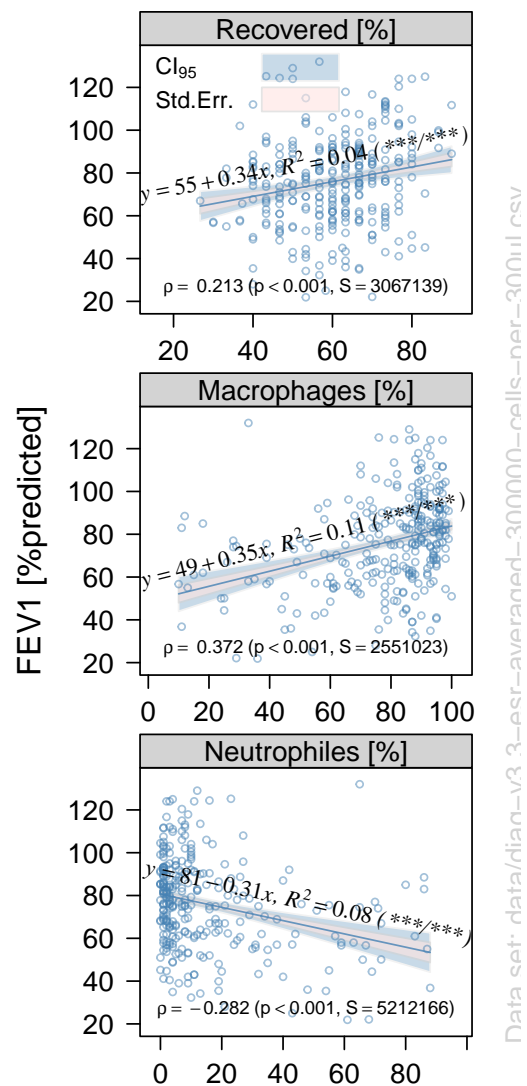


Abbildung 4.9: Regression von FEV₁ gegen BALF-Recovered [%], sowie den prozentualen Anteilen der Makrophagen und Neutrophilen. Es besteht ein signifikanter bzw. hochsignifikanter linearer Zusammenhang zwischen FEV₁ und den unabhängigen Variablen. Wegen der offensichtlich gerundeten, nicht normal verteilten Daten und dem Vorliegen von Bindungen (ties) wäre es korrekt, die Korrelation nach Kendall-B zu berechnen. Zwecks Vergleichbarkeit mit einer anderen Studie [292] wurde hier aber dennoch Spearmans ρ ausgegeben. (***/***) : Signifikanz des Intercept und Signifikanz der Steigung der Regressionsgeraden. *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$; ns : $p \geq 0,05$

(Abb. 4.10a), was gegenüber den unauffälligen und moderaten Fällen einen sehr signifikanten Rückgang darstellt (Abb. 4.10b).

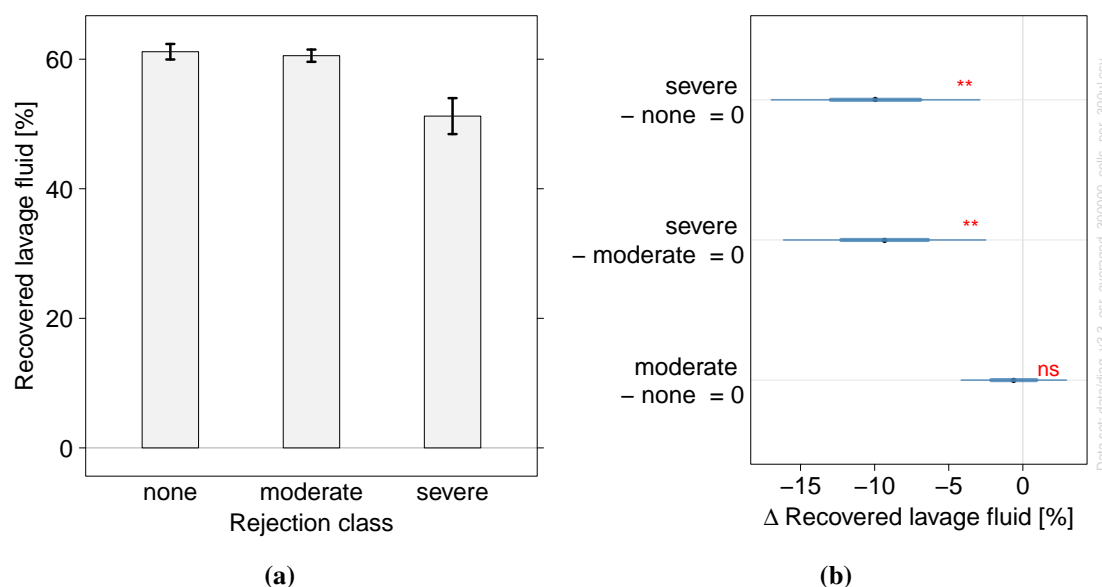


Abbildung 4.10: Vergleich der zurückgewonnenen BALF zwischen keiner, einer moderaten und schweren Abstoßung. (a) Der Anteil der zurückgewonnenen BALF (Recovered lavage fluid [%]) nach Abstoßungsklasse (Rejection class). Die dünn gedruckten, grauen Linien geben den Standardfehler an. (b) Statistischer Vergleich zwischen den Abstoßungsklassen. Die Einteilung in keine (none, $n=114$), eine moderate ($n=174$) und schwere (severe, $n=22$) AR erfolgte nach Glg. 4.1. Dicke Linien repräsentieren den Standardfehler der Differenz der Gruppenmittelwerte, dünne Linien das zugehörige 95 % CI. *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$; ns : $p \geq 0,05$

4.4.12 Diagnostische Vorhersagekraft der erfassten Parameter

Unter Verwendung des *R*-Pakets *pROC* [293] wurden die Ergebnisse der $\text{CM}^{\bullet}/\text{O}_2^{\bullet-}$ -Bestimmungen, des BALF-Zellprofils und der klinischen Parameter (FEV_1 , BALF-*Recovered*) mittels ROC-Kurven (Abs. 2.7.10) auf deren Vorhersagekraft hinsichtlich des Vorliegens einer schweren AR (Glg. 4.1) untersucht. Unter einer hohen „Vorhersagekraft“ soll im Folgenden einfach eine hohe Sensitivität bei gleichzeitig hoher Spezifität bezüglich der durch die Histopathologie jeweils vorgegeben Referenzdiagnose verstanden werden. Weil in die Berechnung von ROC-Kurven die Prävalenz (hier also der Anteil an allen untersuchten Ltx-Patienten, die zum Zeitpunkt der bioptischen Diagnostik tatsächlich an einer schweren AR litten) grundsätzlich nicht mit eingeht, kann die klinische Relevanz direkt aus dem Verlauf der Kurven abgeschätzt werden (Abb. 4.11).

Die höchste Vorhersagekraft besaß demnach mit einer AUC von 0,84 die $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Konzentration (Abb. 4.11a), die lediglich durch eine in Glg. 4.2 beschriebene, heuristische Kombination mehrerer potentieller Prädiktoren übertroffen wurde (Abb. 4.11i, AUC 0,89):

$$\text{SevereRejection} \sim \text{SuperoxideAnion/Macrophages} \times (\text{Eosinophiles} + 1) / \text{Recovered} \quad (4.2)$$

In der voranstehenden Modellgleichung werden mit dem Auftreten einer AR positiv korrelierte Messwerte untereinander multipliziert und durch negativ korrelierte dividiert.

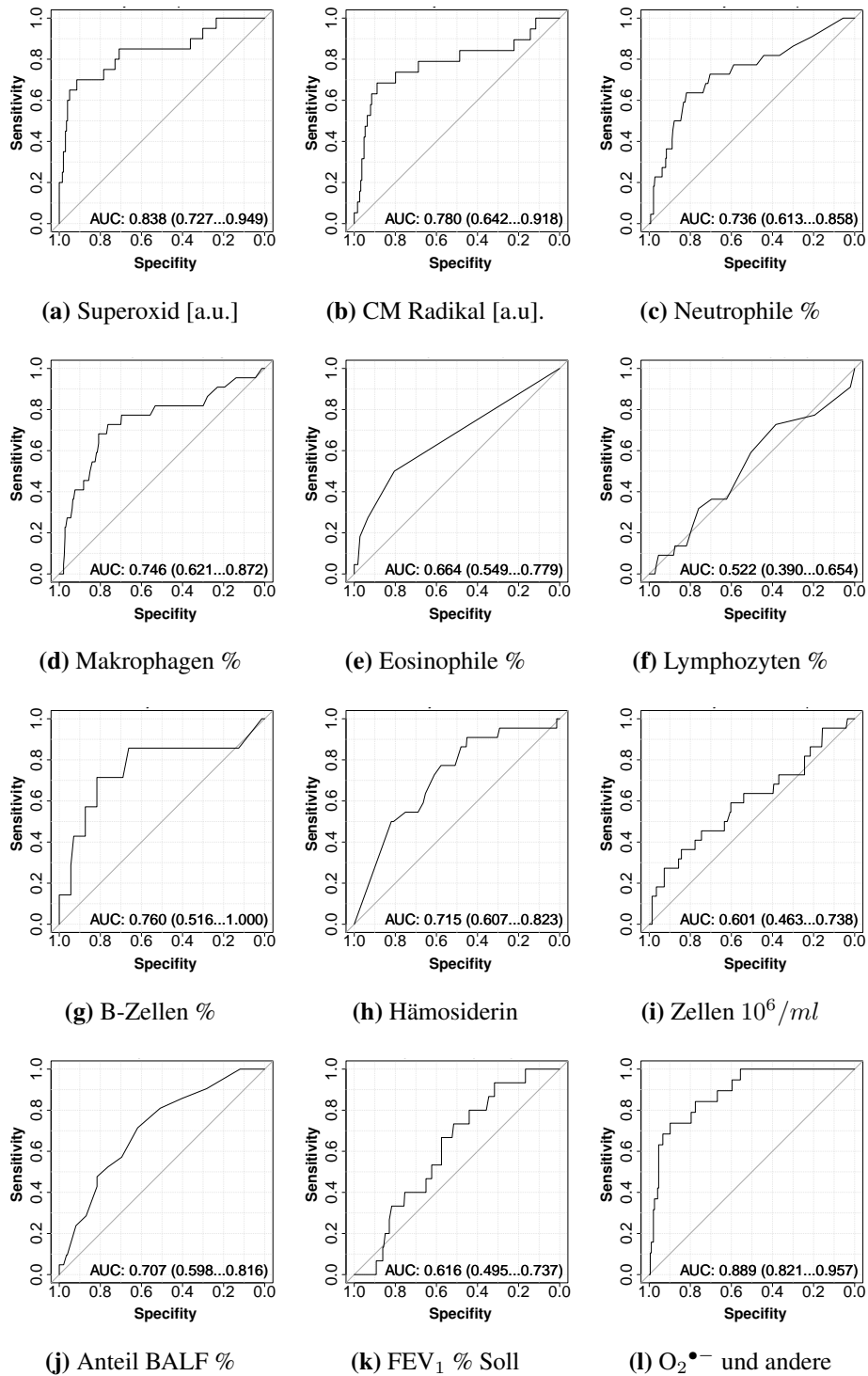


Abbildung 4.11: ROC-Kurven von mehreren potentiellen Prädiktoren der schweren AR gemäß Glg. 4.1.

(a)-(j): Zu den moderaten und starken Prädiktoren für ein schwere AR zählen die O₂^{•-} und die CM[•] Konzentration, Makrophagen, Neutrophile sowie der Anteil der B-Zellen. Eine geringe Vorhersagekraft haben hingegen Lymphozyten, Gesamt-Leukozytenzahl und FEV₁. (l): Die bislang größte Vorhersagekraft zeigt eine Kombination der in Glg. 4.2 angegebenen Prädiktoren. CM Radikal: ESR-Signal nach Abzug des Hintergrundsignals als Maß für die Summe aus O₂^{•-} und ONOO⁻. Anteil BALF: Zurückgewonnener Anteil der BALF. **y-Achse:** Sensitivität, **x-Achse:** Spezifität, AUC: Area Under Curve, Werte in Klammern: 95 % CI der AUC

Der Anteil an Eosinophilen wird um eins erhöht, weil deren Anteil in Glg. 4.2 als Faktor eingeht und dieser nur in wenigen Fällen ungleich Null ist. Aus Gründen, die nicht unmittelbar verständlich sind, ist es im Hinblick auf eine größere AUC günstiger, durch den Makrophagenanteil zu dividieren, als mit der Neutrophilenzahl zu multiplizieren. Ähnlich ist die Division durch den Anteil der zurückgewonnenen BALF günstiger als die Division durch FEV_1 , deren Einbeziehung die AUC immer mindert. Letzteres hängt vermutlich mit der breiteren Streuung der Ergebnisse der Lungenfunktionsdiagnostik zusammen, die eben auch von der Tagesform und der Motivationslage der Patienten abhängen.

Weitere Prädiktoren mit einer vergleichsweise hohen AUC (>0.7) waren die CM^\bullet -Konzentration, Makrophagen, Neutrophile und B-Zellen. Lymphozyten in ihrer Gesamtheit eigneten sich nicht als Prädiktor einer schweren AR (Abb. 4.11f). FEV_1 (AUC = 0,62) sowie die Gesamtzellzahl (AUC = 0,60) gehörten zu den relativ schwachen Prädiktoren, ebenso der Eosinophilen-Anteil mit einer AUC von nur 0,66. Dies ist insoweit überraschend, als Eosinophile in mehreren Studien als möglicher Prädiktor einer AR angesehen werden [294–296], und erklärlich dadurch, dass sie nur in ca. 10 % aller erfassten Fälle auftraten.

4.4.13 Abhängigkeit des Outcomes vom Geschlecht des Patienten

In einer nach dem Geschlecht der Patienten getrennten Darstellung zeigten sich sowohl bei der CM^\bullet - und $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Konzentration als auch dem Neutrophilen- und Eosinophilenanteil deutliche Unterschiede (Abb. 4.12). Auf die Darstellung der Lymphozyten-Subpopulationen wurde verzichtet, weil diese mit einer AUC von nahe 0,5 ähnlich wie auch FEV_1 und Lymphozyten (gesamt) im Wesentlichen Rauschen wiedergeben.

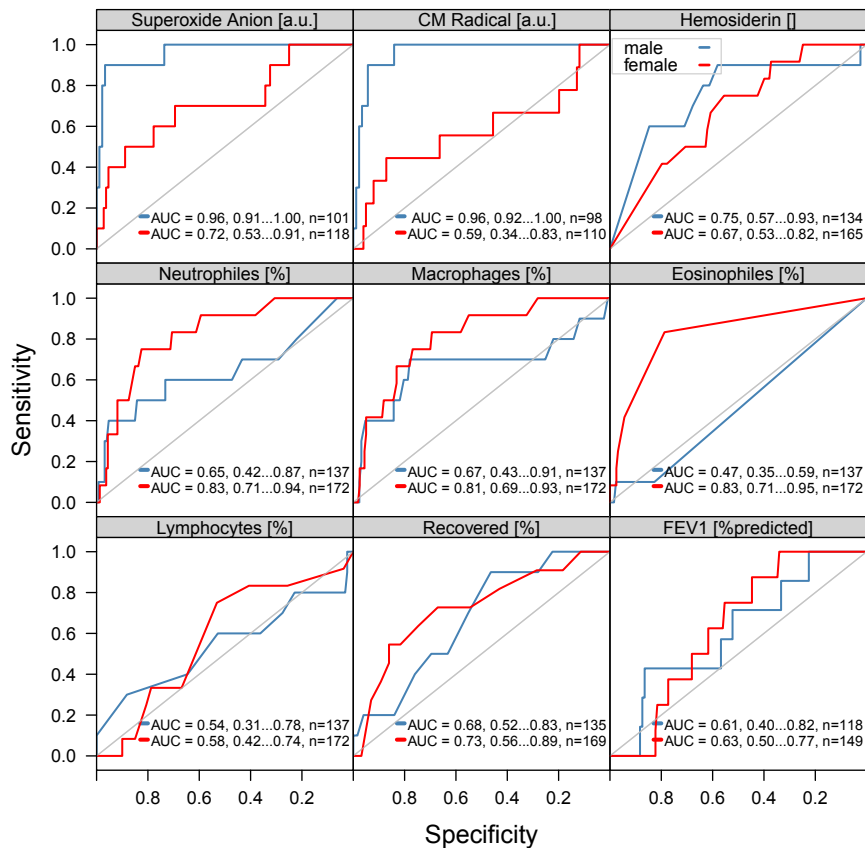


Abbildung 4.12: Geschlechtsspezifischer Vergleich der ROC-Kurven/AUC potentieller Prädiktoren einer schweren AR. Die anhand der AUC zu bemessende Vorhersagekraft verschiedener Prädiktoren einer schweren AR unterscheidet sich teils stark zwischen den Geschlechtern. Bei Männern (blaue ROC-Kurven) zeigten $\text{O}_2^{\bullet-}$ und CM^\bullet eine sehr hohe AUC, wohingegen bei Frauen (rote ROC-Kurven) für CM^\bullet nahezu keine und $\text{O}_2^{\bullet-}$ lediglich eine moderate Vorhersagekraft berechnet wurde. CM^\bullet (CM Radical): ESR-Signal nach Abzug des Hintergrundsignals als Maß für die Summe aus $\text{O}_2^{\bullet-}$ und ONOO^- . AUC: Area Under Curve, Bereichsangabe nach AUC-Wert: 95 % CI

Bei männlichen Patienten (blaue Kurven) erwiesen sich mit einer AUC von 0,96 sowohl $\text{O}_2^{\bullet-}$ als auch CM^\bullet als nahezu ideale Prädiktoren, wohingegen bei Frauen (rote Kurven) für ROS nahezu keine (AUC = 0,59) und für $\text{O}_2^{\bullet-}$ lediglich eine moderate (AUC = 0,72) Vorhersagekraft berechnet wurde. Anhand der in den Diagrammen eingedruckten 95 %-Konfidenzintervalle lässt sich auch erkennen, dass sich diese Intervalle für Superoxid bei Männern und Frauen grenzwertig überdecken, was auf einen grenzwertig signifikanten Unterschied hindeutet. Hinsichtlich des CM^\bullet -Signals überdecken sich diese Intervalle überhaupt nicht. Geringere Unterschiede zeigten

sich ebenfalls in Bezug auf den Anteil der Neutrophilen (AUC 0,83 vs. 0,65) und den Anteil der Makrophagen (AUC 0,81 vs. 0,67). Sichtbar dramatisch zeichnete sich der Geschlechtsunterschied bei den Eosinophilen ab (AUC 0,83 bei Frauen vs. 0,47 bei Männern), wobei aber zu bedenken ist, dass das Auftreten von Eosinophilen nur selten beobachtet wird. Bei männlichen Patienten wurden lediglich in zwei von zehn schweren Fällen ein Eosinophilenanteil von >0 in der BALF nachgewiesen, weshalb deren ROC-Kurve nahezu auf der Diagonalen liegt. Bei weiblichen Patienten hingegen war nur in einem Fall kein Eosinophiler präsent - die verbleibenden Fälle wiesen einen Anteil zwischen 1 und 25 % auf. Lymphozyten, Hämossiderin-Score, BALF-Recovered und FEV₁ zeigten kaum geschlechtsspezifische Unterschiede, was sich auch an den sich weit überdeckenden Konfidenzintervallen der zugehörigen AUCs erkennen lässt.

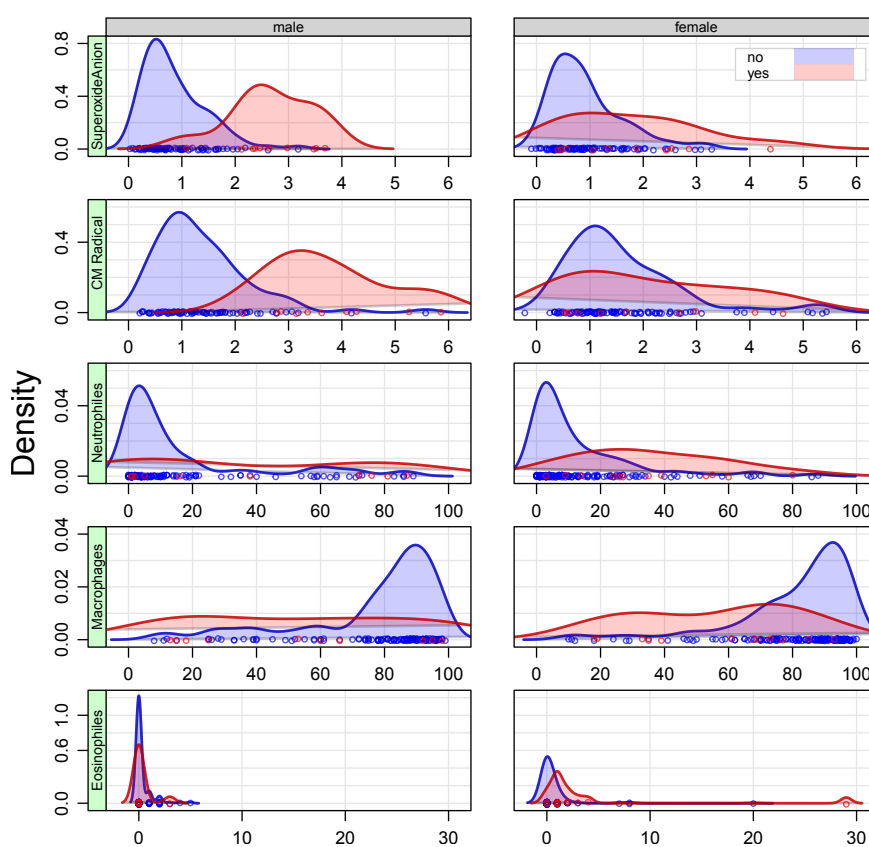


Abbildung 4.13: Wahrscheinlichkeitsdichten nach Geschlecht und AR. Die Panels der linken Seite bilden die Wahrscheinlichkeitsdichten für die $O_2^{\bullet-}$ - und CM^{\bullet} Konzentrationen in a.u. sowie der Makrophagen, Neutrophilen und Eosinophilenanteile der männlichen Patienten in Prozent ab; die rechten Panels zeigen das Gleiche für weibliche Patienten. **CM Radical** (CM^{\bullet}): ESR-Signal nach Abzug des Hintergrundsignals als Maß für die Summe aus $O_2^{\bullet-}$ und $ONOO^-$. Legende: **no** - keine/moderate AR (blaue Kurven), **yes** - schwere AR (rote Kurven). **Density**: Wahrscheinlichkeitsdichte.

In Abb. 4.13 werden die Wahrscheinlichkeitsdichten getrennt nach männlichen und weiblichen Patienten für $CM^{\bullet}/O_2^{\bullet-}$, Neutrophile, Makrophagen und Eosinophile graphisch dargestellt (Abb. 4.13). Bei Männern (linke Panels), die eine schwere AR (rote Kurve) erlitten, war hinsichtlich der $CM^{\bullet}/O_2^{\bullet-}$ -Konzentration eine deutliche Verschiebung nach rechts zu beobachten, d.h. hohe Konzentrationen in der BALF sind Indikatoren für eine schwere AR. Bei Frauen

(rechte Panels) hingegen überlappten sich die Verteilungen von schweren AR (rote Kurve) und unauffälligen Diagnosen (blaue Kurve) weitestgehend. Die Neutrophilen und Eosinophilen waren während einer schweren AR erhöht; der Makrophagenanteil entsprechend erniedrigt. Bei Männern überlappten sich die Verteilungen der Neutrophilen und Eosinophilen hingegen nahezu vollständig, sodass damit keine Trennung zwischen einer schweren AR und einer moderaten bzw. keiner AR möglich ist.

4.4.14 Signifikanz der Gruppenunterschiede der BALF-Fractionen

Nachdem eine Beta-Verteilung keine gute Anpassung der Leukozytenfraktionen der BALF ergeben hatte, wurde die Varianzanalyse auf die Fragestellung beschränkt, ob sich zwischen den nach Glg. 4.1 definierten Abstoßungsgraden signifikante Differenzen abzeichnen. Hierzu wurde die Funktion *dunnTest* aus dem R-Paket *FSA* [297] eingesetzt, welche intern den parameterfreien, auf Rangsummen basierenden *post-hoc* Test nach Kruskal-Wallis verwendet; die errechneten p-Werte wurden innerhalb der Gruppen nach Bonferroni korrigiert.

	Z	p	<i>p</i> _{adj}			Z	p	<i>p</i> _{adj}	
Neutrophiles					Neutrophiles				
moderat - keine	1.549	0.1213	0.3638	ns	moderat - keine	0.238	0.8118	1.0000	ns
schwer - moderat	1.213	0.2250	0.6749	ns	schwer - moderat	3.699	0.0002	0.0006	***
schwer - keine	1.975	0.0483	0.1448	ns	schwer - keine	3.740	0.0002	0.0006	***
Macrophages					Macrophages				
moderat - keine	-2.576	0.0100	0.0299	*	moderat - keine	-0.729	0.4662	1.0000	ns
schwer - moderat	-1.300	0.1936	0.5808	ns	schwer - moderat	-3.358	0.0008	0.0024	**
schwer - keine	-2.598	0.0094	0.0281	*	schwer - keine	-3.655	0.0003	0.0008	***
Eosinophiles					Eosinophiles				
moderat - keine	1.439	0.1502	0.4507	ns	moderat - keine	-0.516	0.6059	1.0000	ns
schwer - moderat	-0.761	0.4469	1.0000	ns	schwer - moderat	5.081	0.0000	0.0000	***
schwer - keine	0.030	0.9758	1.0000	ns	schwer - keine	4.710	0.0000	0.0000	***
Lymphocytes					Lymphocytes				
moderat - keine	1.410	0.1585	0.4756	ns	moderat - keine	0.504	0.6144	1.0000	ns
schwer - moderat	-0.767	0.4428	1.0000	ns	schwer - moderat	0.737	0.4611	1.0000	ns
schwer - keine	0.009	0.9931	1.0000	ns	schwer - keine	0.977	0.3287	0.9860	ns
(a) Männer					(b) Frauen				

Tabelle 4.8: Ergebnisse für den Vergleich zwischen den Schweregrade einer AR innerhalb von Makrophagen, Neutrophilen, Eosinophilen und Lymphozyten BALF mittels des Signifikanztests nach Kruskal-Wallis [297]. Betrag und Vorzeichen der standardisierten Gruppendifferenz Z geben einen Anhalt für Größe und Richtung der Gruppenunterschiede. p: p-Wert des Vergleichs; *p*_{adj}: innerhalb der Gruppe nach Holm adjustierter p-Wert. * : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$; ns : $p \geq 0,05$**

In den in Tab. 4.8 dargestellten Ergebnissen zeigt sich erneut, dass sich die Gruppen der männlichen und weiblichen Patienten stark voneinander unterscheiden. Im Unterschied zu ersteren

zeigten weibliche Patienten bezüglich der schweren AR hochsignifikante Unterschiede hinsichtlich der Zahl der Neutrophilen, Makrophagen und der Eosinophilen, während sich für Männer allein hinsichtlich der Zahl der Makrophagen signifikante Unterschiede ergaben. Nachdem am UKGM zwar Grenzwerte hinsichtlich der Zusammensetzung der Leukozytenpopulationen in der BALF für gesunde Nichtraucher (Tab. 2.2), nicht jedoch für lungentransplantierte Patienten verfügbar sind, und in Abb. 4.5 sowie Abb. 4.6 als auch in Tab. 4.8 mit zunehmendem Abstoßungsgrad teils dramatische zytologische Veränderungen erkennbar wurden, die zudem noch vom Geschlecht des Patienten abhängen, wie Tab. 4.8 als auch die ROC-Diagramme in Abb. 4.12 nahelegen, erscheinen Referenzbereiche speziell für lungentransplantierte Patienten sinnvoll.

4.4.15 Referenzbereiche nach Geschlecht und Grad der AR

Weil sich unter der Annahme einer Beta-Verteilung der einzelnen Leukozytenfraktionen mittels der Funktion *fitdistr* aus dem R-Paket MASS [233] keine bzw. keine brauchbare Anpassung ergab, wurde mittels der Funktion *bayesboot* aus dem gleichnamigen R-Paket [239] auf Basis von 10 000 Stichproben eine parameterfreie Anpassung berechnet, mit deren Ergebnissen die Quantile in Tab. 4.9 berechnet wurden. Unter Verwendung des R-Pakets *modeest* [298] wurde außerdem der Modus, also das jeweilige Maximum der Wahrscheinlichkeitsdichte nach der Methode von *Parzen* bestimmt.

Die Gruppe „keine Abstoßung“ besteht gemäß Glg. 4.1 zunächst aus 114 Fällen, bei denen die histopathologische Diagnose zugleich auf A_0 als auch auf B_0 lautete. Weil nach Arcasoy et al. die Entscheidung zwischen A_0 und A_1 sowie B_0 und B_1 häufig falsch getroffen wird [299], wurde im Kontext der Erstellung des Referenzbereichs für die bzgl. einer AR histopathologisch negativen Fälle der Umstand genutzt, dass erhöhte C-reaktives Protein (CRP)-Werte außer mit Infektionen auch mit der Diagnose einer AR assoziiert sind [300]. Damit kann die vergleichsweise große Gruppe der histopathologisch negativen Fälle durch die zusätzliche Bedingung negativer CRP-Werte auf 47 Fälle (von 114) eingengt werden (21 männlich, 26 weiblich), was zwar die statistische Basis dieser Gruppe verkleinert, aber den Anteil falsch-negativer AR-Diagnosen darin minimieren sollte.

Ansonsten entsprechen die zugrunde liegenden Fallzahlen den in Tab. 4.7 in den Spalten „moderate AR“ und „schwere AR“ aufgeführten, weil die Bedingung negativer CRP-Werte bei Vorliegen einer AR nicht sinnvoll eingesetzt werden kann, nachdem CRP als Entzündungsmarker auch bei Vorliegen einer AR erhöht ist. Jedoch wird am UKGM bei klinischem Verdacht auf eine Infektion der Lunge eher nicht bronchoskopiert und jedenfalls nicht biopsiert, sondern zunächst antibiotisch bzw. antimykotisch therapiert, weshalb der Datensatz (auch aufgrund der dadurch unmöglichen histopathologischen Einordnung) *a priori* nur wenige die Lunge betreffende Infektionsfälle beinhalten sollte.

Zelltyp	Geschlecht	Modus	Quantil				
			0.025	0.25	0.5	0.75	0.975
keine AR							
Neutrophile	Männer	10.0	5.8	8.7	10.8	13.5	19.7
Neutrophile	Frauen	6.8	4.1	6.1	7.4	9.1	12.6
Makrophagen	Männer	84.3	74.9	80.7	83.2	85.5	88.9
Makrophagen	Frauen	87.8	82.0	85.6	87.2	88.7	91.2
Eosinophile	Männer	0.1	0.0	0.1	0.2	0.3	0.5
Eosinophile	Frauen	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.2
Lymphozyten	Männer	4.9	3.7	4.6	5.4	6.3	8.7
Lymphozyten	Frauen	4.8	3.5	4.4	5.0	5.8	7.5
moderate AR							
Neutrophile	Männer	17.5	12.9	15.8	17.5	19.3	23.3
Neutrophile	Frauen	12.6	9.8	11.6	12.6	13.8	16.3
Makrophagen	Männer	74.3	68.7	72.2	74.1	75.7	78.4
Makrophagen	Frauen	79.8	75.7	78.5	79.9	81.2	83.4
Eosinophile	Männer	0.3	0.2	0.3	0.4	0.4	0.6
Eosinophile	Frauen	0.4	0.2	0.3	0.4	0.5	0.8
Lymphozyten	Männer	7.8	6.3	7.3	8.0	8.7	10.3
Lymphozyten	Frauen	6.6	5.2	6.2	6.8	7.6	9.2
schwere AR							
Neutrophile	Männer	36.7	18.4	30.4	37.8	45.3	59.2
Neutrophile	Frauen	34.5	24.2	31.3	35.2	39.4	48.0
Makrophagen	Männer	53.9	35.0	46.5	53.3	60.0	72.5
Makrophagen	Frauen	56.6	41.9	51.1	55.9	60.6	68.8
Eosinophile	Männer	0.0	0.0	0.1	0.2	0.4	1.0
Eosinophile	Frauen	1.9	1.3	2.2	3.2	4.7	9.1
Lymphozyten	Männer	7.1	3.4	5.8	7.8	10.3	16.1
Lymphozyten	Frauen	4.8	3.3	4.4	4.9	5.6	7.0

Tabelle 4.9: Bestimmung der Referenzbereiche für Neutrophile, Makrophagen, Lymphozyten und Eosinophile nach Schweregrad der AR und Geschlecht der Patienten mittels bayesboot [239]. Die Einteilung in keine, eine moderate oder schwere AR erfolgte nach Glg. 4.1, wobei die Gruppe der Patienten, bei denen keine Abstoßung vorlag, zusätzlich auf negative CRP-Werte eingengt wurde. Der Median ist jeweils fett hervorgehoben. Der Modus gibt das Maximum der Wahrscheinlichkeitsdichte an. Abk.: AR - akute Abstoßung; CRP - C-reaktives Protein

4.4.16 Klassifizierung anhand eines Entscheidungsbaums

Für die beispielhafte Erstellung eines Entscheidungsbaums wurde der C5.0 Algorithmus [244] unter Verwendung folgender Parameter eingesetzt: $O_2^{\bullet-}$ und $CM^{\bullet-}$ -Konzentration, Anteile der Neutrophilen, Makrophagen, Eosinophilen, Lymphozyten sowie Häm siderin-Score, Gesamtzellzahl, zurückgewonnenen BALF, FEV₁, Alter, Geschlecht und Transplantatüberlebenszeit in die Analyse einbezogen. Entsprechend C5.0 Algorithmus war aber nur die $O_2^{\bullet-}$ -Konzentration, der Anteil an Makrophagen und der zurückgewonnenen BALF mit akzeptablen Fehlerraten behaftet.

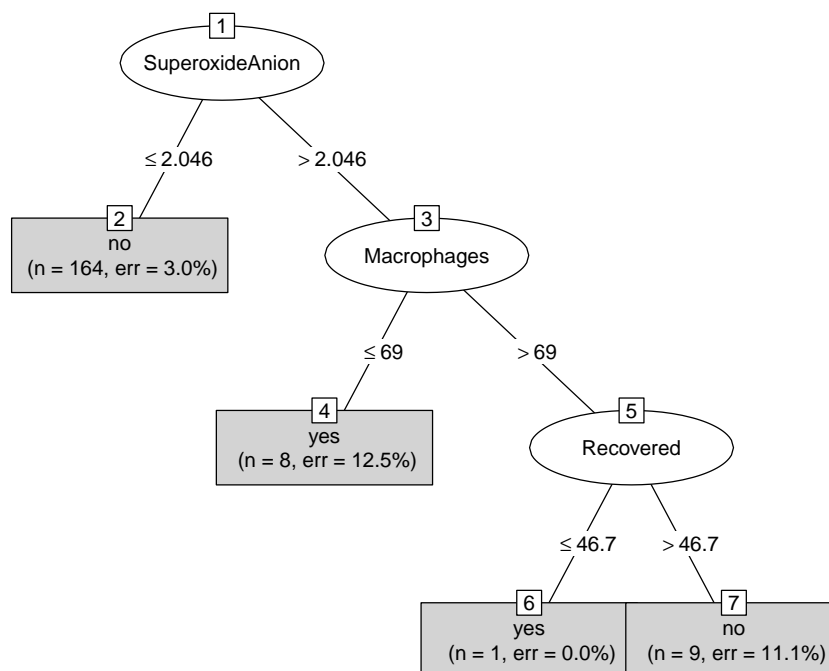


Abbildung 4.14: Entscheidungsbaum für eine schwere AR nach dem C5.0-Algorithmus. Die $O_2^{\bullet-}$ -Konzentration (SuperoxideAnion) hat die höchste Aussagekraft hinsichtlich der Vorhersage einer schweren AR (1 $\hat{=}$ Wurzelknoten des Entscheidungsbaums). Bei einer $O_2^{\bullet-}$ -Konzentration von ≤ 2.046 lag in 164 von 182 Fällen keine schwere AR vor (Knoten 2). War die $O_2^{\bullet-}$ -Konzentration > 2.046 und der Makrophagenanteil (Knoten 3) in der BALF $\leq 69\%$ wurden 8 von 18 Fällen als schwere AR klassifiziert (Knoten 4). Die zurückgewonnene BALF („Recovered“) wurde anhand des C5.0 Algorithmus als dritter relevanter Parameter für eine Vorhersage einer schweren AR eingeordnet (Knoten 5). err: Anteil der falsch positiv oder falsch negativ klassifizierten Parameter

Kapitel 5

Diskussion

5.1 ROS- und $O_2^{\bullet-}$ -Nachweis im pulmonalen System

Die Quantifizierung von ROS und RNS in Zellkulturen, Gewebe, BAL und Blut als auch im Kontext von isolierten Organen ist von großem biologischen und medizinischem Interesse. Zum einen sind ROS/RNS als Signalmoleküle bei der Regulation einer Vielzahl physiologischer Prozesse wie Proliferation, Migration, Differenzierung und Immunabwehr involviert [2, 14, 301]. Eine exzessive ROS/RNS-Bildung kann hingegen zu oxidativen Schäden und Apoptose führen und somit zur Beschleunigung von Alterungsprozessen und u. a. der Pathogenese kardiopulmonaler Erkrankungen, Ischämie/Reperfusionsschäden oder Transplantatabstoßungen beitragen [19–22, 24, 25]. Damit haben sie auch diagnostische und therapeutische Bedeutung. Zu den derzeit am häufigsten angewandten Nachweismethoden gehören Chemilumineszenz- und Fluoreszenz-basierte Methoden [214, 215]. Als gegenwärtig sensitivste Nachweismethode gilt die ESR-Spektroskopie mittels *Spin traps* und *Spin probes* [225, 250]. Besonders die Verfügbarkeit von Hydroxylamin-*Spin probes* ermöglicht es, sehr kleine Konzentrationen von freien Radikalen und anderen paramagnetischen Spezies *in vitro*, *ex vivo* und sogar *in vivo* zu bestimmen [72].

Hydroxylamin-*Spin probes* reagieren in erster Linie mit $O_2^{\bullet-}$. Sie können jedoch auch mit weiteren ROS/RNS reagieren. So kann CMH u. a. durch $ONOO^-$ und Peroxylradikale, nicht jedoch durch $\bullet NO$ oder H_2O_2 zum stabilen CM^\bullet oxidiert werden [250]. Um den $O_2^{\bullet-}$ -spezifischen Anteil zu quantifizieren, ist es somit erforderlich, Probenansätze mit CMH alleine und parallel dazu Ansätze von Zellen zu inkubieren, die mit SOD vorbehandelt sind. Die Differenz zwischen den ESR-Intensitäten beider Ansätze entspricht dem $O_2^{\bullet-}$ -Anteil (Abs. 3.2.3.1). Nachdem aber SOD nicht oder nur sehr langsam Zellmembranen und -wände passiert [302], wird bei Einsatz dieses Enzyms hauptsächlich extrazelluläres $O_2^{\bullet-}$ dismutiert. Die in den meisten Experimenten eingesetzte, mit Polyethylenglycol konjugierte SOD (pSOD) ist dagegen membrangängig. Damit kann durch deren Einsatz sowohl extrazelluläres als auch intrazelluläres $O_2^{\bullet-}$ dismutiert werden. Die Konjugation der nativen SOD mit diesem Polymer erleichtert jedoch nicht nur das

Eindringen in Zellen und Zellkompartimente, sondern verlängert auch die Halbwertszeit und damit die antioxidative Kapazität des Enzyms [303, 304]. Entsprechend zeigten die Ergebnisse im untersuchten Bereich von 10 000 bis 150 000 mPASC je Ansatz zwar eine lineare Zellzahl-abhängigkeit der $O_2^{\bullet-}$ -Freisetzung, jedoch – bei gleicher Konzentration in U/ml – auch eine größere Steigung für den Ansatz mit pSOD gegenüber dem Ansatz mit SOD (Abs. 3.2.3.1).

Ein mit dem Ziel der Bestimmung des intrazellulären $O_2^{\bullet-}$ -Anteils unternommene Differenzbildung zwischen dem ESR-Signal von zusammen mit CMH inkubierter SOD einerseits und der Kombination von CMH mit pSOD andererseits erscheint dagegen nicht sinnvoll, weil die Verteilung und tatsächliche Konzentration von pSOD in den Zellen gegenüber der homogenen Verteilung und Konzentration der SOD außerhalb der Zellen nur unter Zuhilfenahme sehr aufwendiger Methoden und dann auch nur exemplarisch für einen bestimmten Zelltyp und eine festgelegte Zellkulturmethode und Inkubationsprozedur quantifiziert werden kann. Hinzu kommt die in Abs. 3.2.3.2 demonstrierte Nichtlinearität des CM^{\bullet} -Signals in Abwesenheit oder Gegenwart von nur wenigen Zellen, die einerseits aus CMH-Chargen mit bereits bei Lieferung nachweisbarem CM^{\bullet} -Anteil herrührt und andererseits nur mit einer quantitativ relevanten Reduzierbarkeit des eigentlich als über Stunden stabil angesehenen CM^{\bullet} [72, 250] erklärt werden kann. Wenn keine Zellen zugegen waren, verhielt sich die pSOD in Kombination mit CMH in einigen, hier nicht gezeigten Fällen so, dass teils enorm hohe ESR-Signale detektiert wurden, wobei in den Spektren außer einer großen P2P-Distanz nichts ungewöhnliches zu bemerken war. In ausnahmslos allen Fällen wurde das in den zellfreien Kontrollen hohe Anfangssignal in Gegenwart von Zellen auf normal erscheinende Werte heruntergedrückt. Eine Ursache oder favorisierende Begleitumstände für das inkonstant irreguläre Verhalten der pSOD konnte trotz Rücksprache mit Noxygen und dem Hersteller Sigma-Aldrich bisher nicht ausgemacht werden.

Unabhängig vom teils extremen Verhalten der pSOD in zellfreien Proben eröffnet eine quantitativ relevante Reduzierbarkeit von CM^{\bullet} die Möglichkeit, eine Verschiebung des zellulären Redox-Gleichgewichts nicht nur über eine mehr oder weniger steil ansteigende Akkumulationsrate von CM^{\bullet} zu beobachten. Die Steigung des Signals sollte sich somit bei reduzierenden Verhältnissen tatsächlich ins Negative drehen, das Signal also auch absolut geringer werden. Die Inkubationszeit von 30 min für CMH legt dabei eine obere Grenze für die Zeitspanne fest, innerhalb derer die CM^{\bullet} -Reduktion abgelaufen sein muss. Für CMH lässt sich aus Abb. 3.23 ein CM^{\bullet} -Signalunterschied von 0,14 a.u. zwischen 0 und 10 000 Zellen/300 μ l detektieren. Dieser kann mit der in Abb. 3.9a links oben angegebenen, nach der Konzentration umzustellenden Regressionsgleichung für gefrorene Proben, in eine Konzentrationsdifferenz \pm Standardfehler von $1,8 \pm 2,5 \mu\text{mol/l}$ berechnet werden. Linear auf eine Inkubationszeit von 30 min umgerechnet entspricht dies einer Reduktionsrate von $0,06 \pm 0,08 \mu\text{mol } CM^{\bullet} \text{ pro Minute}$. Diese hier noch unsichere Beobachtung einer quantitativ bedeutsamen Reduzierbarkeit eines Nitroxids steht jedoch nicht für sich alleine. Dikalov et al. haben bereits 1997 in vier getrennten Experimenten

CP[•]-Reduktionsraten in Anwesenheit von Cystein (1 mM), GSH (1 mM), Asc (1 mM) aber auch in Anwesenheit einer sehr kleinen Anzahl von SMC (4 000 Zellen/ml) bestimmt [222]. Dabei ergab sich für Cystein und GSH ein Absinken des CP[•]- Signals um 0,012 $\mu\text{mol}/\text{min}$.

In Anwesenheit von Asc sank das Signal um 0,23 $\mu\text{mol}/\text{min}$; SMCs bewirkten ein Absinken um 0,06 $\mu\text{mol}/\text{min}$. Ähnliche Werte ergaben sich für die radikalische Form der *Spin probe* TEMPONE-H, deren Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{O}_2^{\bullet-}}$ derjenigen von CMH gleich ist. Für die Reaktion von CP[•] mit Asc wird ein k von $(0,11 \pm 0,01) \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ angegeben, was gegenüber der Oxidationsreaktion von CPH gemäß Tab. 2.5 um einen Faktor von 30 000 langsamer ist. Demgegenüber läuft die Reduktion von TEMPONE[•] durch Asc mit einem k von $(7,8 \pm 0,8) \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ab und ist damit nur noch 1500 mal langsamer als die Oxidationsreaktion [222].

Abb. 5.1 zeigt ein auf mehreren *in vitro* Experimenten basierendes Redox-Schema für Tempol aus Zhang et al. (1999) [305]. Ausgehend von der dort als TPL-H bezeichneten Hydroxylaminform, wird diese in Anwesenheit von $\text{O}_2^{\bullet-}$ oder dessen protonierter Form HO_2^{\bullet} mit der Rate k_8 in das Nitroxid TPL oxidiert, welches dann pH-abhängig mit der gegenüber k_{10} sehr geringen Geschwindigkeit k_9 zum Oxoammoniumkation TPL^+ oxidiert wird. Unter NADH-Verbrauch wird dieses mit der Rate k_{14} zum Hydroxylamin reduziert, womit sich der Kreis schließt. Die mit der Geschwindigkeit k_{11} verlaufende Reaktion ist eine Komproportionierungsreaktion, die im betrachteten pH-Bereich zwischen 6,5 und 8 nicht nachweisbar war. Die Rate k_9 ist als einzige pH-abhängig und sinkt mit ansteigendem pH, womit sich die Gleichgewichtslage bei ausreichend $\text{O}_2^{\bullet-}$ infolge der schnellen Gegenreaktionen in Richtung Nitroxid verschiebt, insofern kein NADH verfügbar ist. Bei relativem Mangel an $\text{O}_2^{\bullet-}$ und Verfügbarkeit von NADH läuft die Reaktion zum Teil in Richtung des Hydroxylamins. Intrazellulär konkurrieren Hydroxylamine mit $\bullet\text{NO}$ oder Antioxidantien wie SOD um das verfügbare $\text{O}_2^{\bullet-}$ [305]. Nach Versuchen von Chen et al. (1989) mit dem Nitroxid 5-Doxylstearate wird das Hydroxylamin in Abhängigkeit vom Oxidationszustand der mitochondrialen Atmungskette durch die Cytochrom *c* Oxidase (Komplex IV) zum Nitroxid oxidiert oder umgekehrt das Nitroxid durch die Cytochrom *c* Reduktase (Komplex III) zum Hydroxylamin reduziert, wobei unter Hypoxie (deren Dauer nicht angegeben wird) die Reduktion schneller als die Oxidation ablaufen soll [306].

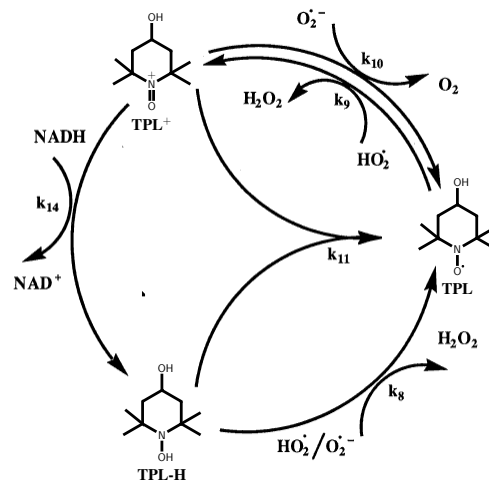


Abbildung 5.1: Redoxzyklus des Nitroxids Tempol (Synonym TPL) auf Grundlage von *in vitro* Experimenten, anhand derer folgende Geschwindigkeitskonstanten jeweils in $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ berechnet wurden: $k_8 = 2,1 \times 10^3$, $k_9 = 1 \times 10^5$, $k_{10} = 1,5 \times 10^{10}$, $k_{14} = 1 \times 10^6$, k_{11} ist sehr gering. TPL-H: Hydroxylaminform, TPL⁺: Oxoammonium-Kation. Nur TPL ist ESR-aktiv. Adaptiert für TPL anstatt TPO nach Zhang et al. [305].

Temperaturabhängigkeit des ESR-Signals flüssiger Proben

In der in Abs. 3.2.2.1 dargestellten Zeitreihe ist eine starke Abhängigkeit des ESR-Signals von der Temperatur (Glg. 3.4) direkt ersichtlich. Bei genauerer Betrachtung ist das Verständnis des Kurvenverlaufs dadurch erschwert, dass sich hier ein chemischer Prozess einem physikalischen überlagert: Einerseits hängt die Oxidationsrate der *Spin probe* von der Temperatur ab, andererseits ist infolge der Temperaturabhängigkeit der von der Boltzmann-Verteilung beschriebenen Besetzungswahrscheinlichkeit der Energieniveaus (Abb. 3.1) auch die ESR-Absorption der Probe linear von der Temperatur abhängig.

Unmittelbar nach einer Absenkung der Temperatur verringerte sich das Absorptionssignal bzw. stieg bei Temperaturerhöhung wieder an. Diese Beobachtung beruht zum einen auf die Abhängigkeit der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 und der Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 von der Temperatur. Umso höher die Temperatur, umso mehr Spins befinden sich im angeregten (antiparallelen) Zustand (Abb. 3.1). Somit benötigen die Spins mehr Zeit, um ihre Energie an die Moleküle der Flüssigkeit (bzw. an das Kristallgitter bei Feststoffen) abzugeben. Die starke Temperaturabhängigkeit beschrieben Sterk et al. bereits 1979 anhand von T_1 -Messungen verschiedener Nukleoside [307]. Die P2P-Methode erwies sich gegenüber der *SpinFit*-Methode als etwas weniger sensitiv hinsichtlich Temperaturänderungen (Abs. 3.2.2.1 vs. 3.2.2.3). Dies ist einerseits ein Hinweis darauf, dass ein wesentlicher Beitrag zum Wert des *SpinFit*-Integrals aus der Temperaturabhängigkeit der Linienbreite stammt, welche ihrerseits linear mit der Temperatur zunimmt [270]. Andererseits spiegelt sich hier eine Unzulänglichkeit der *Xenon SpinFit*-Bedienoberfläche, welche die manuelle Vorgabe eines Temperaturwerts oder gar einer Temperaturreihe, wie sie hier zur Berechnung der tatsächlichen Zahl der Spins erforderlich wäre (Glg. 3.4), nicht vorsieht. Zwar kann ein einzelner Temperaturwert manuell in die von *Xenon* nach Abschluss der Messung erzeugte BES³T Datensatzbeschreibungdatei (.DSC) eingetragen werden, jedoch würde dieser dann gleichförmig auf eine u. U. mehrere Tausend Spektren umfassende Reihe angewandt, was für Zeitreihen mit zeitlich veränderlichen Probertemperaturen nicht sonderlich sinnvoll ist.

Sauerstoffabhängigkeit des ESR-Signals flüssiger Proben

Der Verlauf P2P-Amplituden der über 24 Stunden gemessenen Zeitreihe einer zellfreien Probe (Abs. 3.2.2.3) zeigt, dass eine Erhöhung der O₂-Konzentration von 1 auf 21 % zu einer unmittelbaren, starken Verringerung der P2P-Amplitude und einer deutlichen Verbreiterung der Spektrallinien führt. Ein im Verlauf vergleichbarer, wenn auch im Rahmen der Regelungsgrenzen im Vergleich zur O₂-Konzentration deutlich schwächerer Effekt auf die Amplitude bei Änderung des Druckes des zugeführten Gases erklärt sich durch eine Vergrößerung der Anzahl sich in Lösung befindlicher O₂-Moleküle. Der Vergleich der durch O₂ bedingten Auslenkung anhand der

hoch aufgelösten Abbildungen 3.17a und 3.17b zeigt außerdem, dass die Auslenkung des Signals von der zwischenzeitlich erreichten Signalhöhe abhängt. Die CO_2 -Konzentration im zugeführten Gasgemisch scheint hingegen keinen Einfluss auf die Amplitude zu haben, obwohl sie zu einer pH-Verschiebung führen muss. Dies ist als weiteres Indiz für die gezeigte pH-Stabilität von CMH bzw. CM^\bullet über einen weiten Wertebereich (Abs. 3.2.2.2).

Das eigentlich lange bekannte Phänomen der Abhängigkeit vom O_2 -Gehalt wird mit einem Spinaustausch zwischen molekularem O_2 und dem stabilen Nitroxid erklärt [269, 270, 308, 309]. Dabei nimmt die Wahrscheinlichkeit eines Austauschereignisses mit der Kollisionsrate, also mit ansteigender Radikal- als auch einer ansteigenden O_2 -Teilchendichte zu. In verdünnten Lösungen ist sie wegen der im Verhältnis zu O_2 etwa um den Faktor drei kleineren Diffusionskonstante von *Spin probes* proportional zur O_2 -Konzentration plus einer Konstante, falls die Konzentration des Radikals sich nicht gleichzeitig stark ändert [267, 268].

Zur Kompensation wurde seitens Bruker BioSpin empfohlen, die Spektren mittels des innerhalb von *Xenon* verfügbaren *SpinFit-t* Moduls zu analysieren, da mit der *SpinFit*-Methode (Abs. 3.2.1.1) die Radikalkonzentration nahezu unabhängig von der O_2 -Konzentration in der Probe bestimmt werde. Das Problem tritt jedoch, wenn auch in vermindertem Ausmaß, bei der Analyse der Spektren mittels *SpinFit* ebenfalls auf und ist über die *Xenon*-Oberfläche durch keine der im *SpinFit*-Dialog wählbaren Optionen besser unterdrückbar als in Abb. 3.16 demonstriert wurde.

Die Abhängigkeit der Relaxationszeit von Temperatur und Aggregatzustand ist möglicherweise der Grund dafür, dass bei gefroren gemessenen Proben, die unter hypoxischen Bedingungen inkubiert und direkt im Anschluss in flüssigem N_2 schockgefroren und bei etwa dieser Temperatur auch gemessen wurden, tatsächlich kein Anstieg der P2P-Amplitude im Vergleich zu normoxischen Proben erkennbar war (Abs. 3.2.2.5). Eher ergab sich ein kleiner, wenn auch insignifikanter Abfall, der mit einer infolge Hypoxie verminderten Autoxidationsrate der *Spin probe* in Verbindung zu stehen dürfte. Eine naheliegende Erklärung könnte darin bestehen, dass die im Vergleich zu flüssigen Proben lange Relaxationszeit gefrorener Proben bereits mit sehr breiten Absorptionslinien einhergeht, auf die sich der über die Spinaustausch-Wahrscheinlichkeit gleichfalls temperaturabhängige Effekt einer unterschiedlichen O_2 -Konzentration im Maßstab kaum noch auswirkt.

Im Kontext von Experimenten, die auf einen Unterschied im Verhalten biologischer Proben bzgl. Normoxie und Hypoxie zielen, ist eine O_2 -Abhängigkeit unvermeidbar. Deshalb sollte vor einer statistischen Bewertung der Differenzen zwischen flüssig gemessenen, normoxischen und hypoxischen Proben eine Abschätzung des rein physikalisch bedingten O_2 -Effekts vorgenommen werden. Erstaunlicherweise zeigt die modifizierte Doppelintegration (Abs. 2.7.9) des Differenzsignals ein von der O_2 -Konzentration am wenigsten beeinflusstes Ergebnis (Abb. 3.17).

Kompensation der O₂-Abhängigkeit des ESR-Signals flüssig gemessener Zeitreihen

Für die Erfassung hochaufgelöster Zeitreihen im Kontext von *ex vivo* Experimenten wie der ROS/RNS-Freisetzung einer ILU als auch bei *in vivo* Experimenten kommen aus Handhabungsgründen v. a. Messungen in flüssiger Phase in Betracht. Abb. 3.17 zeigt eine durch Hypoxie induzierbare Variation der Amplitude von ca. 15 % des jeweils erreichten Wertes. Bei generell eher geringeren Signalen biologischer Proben kann der O₂-vermittelte Effekt einen genuin physiologischen Effekt nahezu vollständig überdecken. Deswegen stellte sich die Frage, ob eine Kompensation des O₂-Effekts dadurch möglich ist, dass die O₂-Spannung in der Probenschleife auf einem konstanten Wert gehalten wird. Diesem Ziel gleichermaßen dienlich wäre sowohl eine Abreicherung als auch eine Anreicherung von O₂ in der Probenschleife, wobei eine Anreicherung allerdings auch eine höhere Autoxidationsrate der *Spin probe* zur Folge hätte. Im Modellversuch ergab die Einschaltung eines einzelnen Kanals eines HPLC-Durchlaufentgasers in die Probenschleife eine Dämpfung des O₂-induzierten Signals auf etwa 30 % des Ausgangswertes (Abs. 3.2.2.4). Die Effizienz der O₂-Abreicherung hängt bei solchen Geräten einerseits von der im umgekehrt proportionalen Verhältnis zur Durchflussgeschwindigkeit stehenden Kontaktzeit und andererseits von der Diffusionsfläche und Qualität des Vakuums ab. Während die Leistung der eingebauten Vakuumpumpe festgelegt ist, kann die Kontaktzeit und Diffusionsfläche durch Reihen- oder Parallelschaltung von mehreren Kanälen erhöht werden, sodass sich bei gegebenem Fluss die Kontaktzeit und damit die Effizienz erhöht. Der Hersteller Gynkotek existiert nicht mehr, sodass technische Angaben für den *Degasser* nicht mehr zugänglich sind. Nach Auskunft eines Vertriebsingenieurs der Firma Postnova Analytics werden bei vergleichbaren Geräten 90 % O₂-Abreicherung je Kanal als erreichbar angesehen. Drei hintereinander geschaltete Kanäle würden demnach die O₂-Konzentration theoretisch auf ein Promille des Ausgangswerts senken.

Zur quantitativen Beurteilung des physiologischen Signalanteils am detektierten ESR-Signal der im Kontext von *ex vivo* Normoxie-Hypoxie Experimenten erfassten Zeitreihen wurde eine CM[•]-Standardreihe unter Verwendung des *AquaX* erstellt (Abs. 3.2.1.3). Allerdings bleibt auch hier das Problem, dass das absolute Ausmaß der Signalabsenkung auch von der Anzahl der gemessenen Spins abhängt (Abb. 3.17a und 3.17b). Im *Degasser*-Modellexperiment ist dies nur deshalb vernachlässigbar, weil die Messung hier nicht im steil ansteigenden Teil der Signalkurve (vgl. Beginn des Experiments) erfolgte.

O₂-Transienten in ESR-Zeitreihen

Die in Abs. 3.2.2.3 dargestellten Zeitreihen zeigen sehr deutlich, dass im Kontext flüssig gemessener Proben der Einfluss des pO₂ erheblich ist und durch die Anpassung von Modellspektren via *SpinFit* nicht ausreichend kompensiert werden kann. Festzuhalten ist, dass die Doppelintegration zwischen den beiden äußeren Linien des Nitroxids in dieser Hinsicht bessere Ergebnisse erbringt

als *SpinFit*. Die Änderung des CO₂-Partialdrucks zeigt keinen Einfluss, obwohl CO₂ ca. 30 Mal schneller durch TPX hindurch diffundiert als O₂. Dies ist wahrscheinlich der Pufferung durch den KHB zuzuschreiben (Abs. 3.2.2.2). Die mit dem verwendeten Gas-Controller maximal erreichbare Druckänderung zeigte dagegen einen geringen Einfluss, der sich im einfachsten Fall aus der mit der Druckabsenkung einhergehenden absoluten Konzentrationsänderung aller Gase, eben auch von O₂ erklärt. Wegen des Einsatzes mechanischer Druckregler im Inneren des Geräts kommt aber auch eine Verschiebung des Verhältnisses der Partialdrucke untereinander in Frage.

Abhängigkeit der O₂^{•-}-Produktion von der Zellpassage

Eine Abhängigkeit des freigesetzten O₂^{•-} von der Zahl der Passagen wurde zumindest bei mPASCs nachgewiesen (Abs. 3.2.3.4). Die O₂^{•-}-Konzentration in P₁ war gegenüber P₀ signifikant und gegenüber P₂ und P₃ jeweils hochsignifikant erhöht. Zwischen P₂ und P₀ bestand kein Unterschied, jedoch fiel die O₂^{•-}-Freisetzung bei P₃ signifikant ab. Vom anfänglichen Anstieg abgesehen steht eine mit zunehmender Passagezahl ab P₁ einhergehende Verminderung des O₂^{•-}-Signals im Gegensatz zu verschiedenen Publikationen, worin erhöhte ROS-Konzentrationen als Mediator zellulärer Seneszenz beschrieben [13, 310] und geschädigte oder apoptotische Mitochondrien verdächtigt werden, zu einem Anstieg der ROS-Bildung beizutragen [94, 98]. Beispielsweise haben Lee et al. (1999) an humanen Fibroblasten per DCF-Fluoreszenz und anschließender FACS-Analyse beobachtet, dass *late passage* Zellen (>35 Verdopplungen der Population) gegenüber *mid passage* Zellen (25-35 Verdopplungen) einen deutlichen Anstieg der DCF-Fluoreszenz (→ Anstieg von H₂O₂) erbrachten [311].

Ein Grund für eine mit dem Zellalter abnehmende O₂^{•-}-Freisetzung könnte darin bestehen, dass alternde Zellen einen gedämpften Energiestoffwechsel aufweisen und damit auch weniger Reduktionsequivalente (NADH, FADH₂) aus dem Citrat-Zyklus für den Elektronentransport der mitochondrialen Atmungskette bereit gestellt werden können. Durch einen geringeren ETC-generierten Elektronenfluss ist auch die Bildung von O₂^{•-} limitiert, welche unter physiologischen Bedingungen zwischen 1 und 5 % liegt [4]. Während des Elektronenflusses werden außerdem H⁺ aus der inneren Mitochondrienmembran freigesetzt, die das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) aufrecht erhalten [16, 23]. Da die mitochondriale Respiration positiv mit der Höhe des $\Delta\Psi_m$ assoziiert ist, wird dieses oft als Surrogat für die mitochondriale Funktion genutzt [16, 312]. Ein erhöhtes $\Delta\Psi_m$ begünstigt wiederum die Produktion von mtROS [313]. Im Kontext des Passage-Experiments kann daher die Hypothese aufgestellt werden, dass das $\Delta\Psi_m$ bei mPASCs negativ mit dem Zellalter assoziiert ist. Sie könnte durch eine passagenabhängige, zytofluorometrische Analyse mittels des Membranpotential-abhängigen Fluoreszenzfarbstoffs JC-1 einerseits und durch Respirometrie andererseits bewiesen oder widerlegt werden [314]. Eine derartige Untersuchung kann mit einem geeignetem Gerät (z. B. O₂k-FluoRespirometer, Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich) auch gleichzeitig an derselben Probe durchgeführt

werden. S. Schörner hat im Rahmen ihrer Promotion bei PSMCs des Kaninchens anhand der Ergebnisse respirometrischer Messungen keine Unterschiede zwischen den Passagen P₀ bis P₂ hinsichtlich der mitochondrialen Atmung feststellen können [315]. Vergleichbare Untersuchungen bei murinen pulmonal-arteriellen Zellen sind nicht bekannt.

Möglicherweise sollte zwischen Zellalterung und zellulärer Seneszenz unterschieden werden. Erstere steht mit Reifung und Adaptation in Beziehung und kann mit einer deutlich abfallenden O₂^{•-}-Produktion einhergehen, wie in diesen Versuchen für die Passagen P₂ und P₃ gezeigt wurde. Diese beiden Passagen würden demnach eher der durch Lee et al. beschriebenen *mid passage*, nicht jedoch der *late passage* entsprechen [311]. Die Seneszenz, Synonym für Vergreisung, ist mit funktionalen Ausfällen aufgrund zunehmender zellulärer und mitochondrialer Schädigung durch exzessive ROS-Produktion verbunden und würde mit den von Turrens oder Cadenas et al. berichteten Daten einhergehen [94, 98]. Bei Bestätigung obiger Zellalterungshypothese könnte O₂^{•-} als potentieller Marker herangezogen werden, um zwischen Zellalterung (*mid passage*) und Seneszenz (*late passage*) zu unterscheiden und einen funktionellen Schwellwert bei sich in Kultur befindlichen Zellen zu definieren.

Kompartimentspezifität von *Spin probes*

Aufgrund der kurzen Halbwertszeit der meisten ROS ist es wichtig, diese nahe am Bildungsort nachzuweisen. Dies setzt idealerweise die Verfügbarkeit von *Spin probes* voraus, welche in der Nähe der ROS-Quelle (z. B. NADPH-Oxidasen oder mitochondriale ETC) eines bestimmten Zellkompartiments akkumulieren und dort zu stabilen, mittels ESR detektierbaren Nitroxiden oxidiert werden. Es wurden vier verschiedenen Hydroxylamin-*Spin probes* getestet, die sich in Lipophilie und Polarität unterscheiden (Abs. 3.2.4). Beide Eigenschaften sind wichtige Faktoren, welche die Zellpermeabilität von Substanzen modulieren bzw. beeinflussen [249].

CMH ist aufgrund einer hohen Lipophilie gut membrangängig, sodass sowohl extra- und intrazelluläres, aber auch intramitochondriales ROS detektiert werden kann [249, 316]. CPH weist hingegen eine geringe Lipophilie auf, vermutlich weil deren Karboxylgruppe bei physiologischem pH-Wert ionisiert vorliegt. Dadurch wird die Zellpermeabilität stark beeinträchtigt. PPH besitzt laut Dikalov et al. (2011) die geringste Lipophilie [249]. Die zur Detektion von mitochondrialen O₂^{•-} verwendbare, lipophile *Spin probe* MitoTEMPO-H ist gut membrangängig und akkumuliert aufgrund der Konjugation mit dem kationischen Triphenylphosphonium (TPP⁺) bevorzugt in der Mitochondrienmatrix [317, 318]. Daten zur intrazellulären Verteilung von MitoTEMPO-H wurden bisher nicht publiziert.

Bei Anwendung von CMH wurde ein deutlich erhöhtes O₂^{•-}-Signal im Vergleich zu den anderen *Spin probes* detektiert (Abs. 3.2.4). Dies kann auf die bereits beschriebene bessere Membranpermeabilität zurückzuführen sein, wodurch ROS sowohl extra- und intrazellulär als auch mitochondrial detektiert wird. MitoTEMPO-H zeigte hingegen das niedrigste ESR-Signal. Die

gemessenen ESR-Intensitäten von CP• und PP• waren vergleichbar hoch und betragen $\approx 50\%$ von CM•. Allerdings ist ein direkter Vergleich der ESR-Intensitäten zwischen den verschiedenen *Spin probes* und damit die Darstellung auf einer gemeinsamen Skala nur aus einem praktischen Blickwinkel, nämlich hinsichtlich der in vergleichbaren Ansätzen erwartbaren Signalhöhen sinnvoll, weil die Reaktionsgeschwindigkeiten bezüglich $O_2^{\bullet-}$ (Tab. 2.5) als auch ihre chemischen Eigenschaften hinsichtlich Polarität und Lipophilität teils sehr verschieden sind. Dies sollte über ein jeweils unterschiedliches Diffusionsverhalten sowohl zu unterschiedlichen intrazellulären Durchschnittskonzentrationen als auch zu differenten intrazellulären Verteilungsmustern führen.

In Bezug auf die verschiedenen Reaktionsgeschwindigkeiten ließe sich entgegenhalten, dass infolge der in biologischen Proben geringen $O_2^{\bullet-}$ -Konzentrationen [249] und einer verhältnismäßig hohen Reaktionsgeschwindigkeit der *Spin probe* [220, 249] bei allen verwendeten *Spin probes* innerhalb der 30-minütigen Inkubationszeit ein Gleichgewicht erzielt wird. Dadurch wäre der Einfluss der unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeit bzgl. ROS von untergeordneter Bedeutung. Es verbliebe aber immer noch ein unterschiedliches Diffusionsverhalten. Ein definitiver Beweis, dass die verwendeten *Spin probes* vergleichbar diffundieren oder kompartimentspezifisch akkumulieren und auch tatsächlich kompartimentspezifisch radikalisiert werden, kann auf der Grundlage von Momentaufnahmen im Bereich des approximativ linearen Anstiegs des ESR-Signals über die Zeit nicht geführt werden. Eine Möglichkeit zur Kompensation des unterschiedlichen Diffusionsverhaltens könnte in der Messung von Zeitreihen, die bis zum Abflachen der Kurven fortgeführt werden, wo sich Oxidation und Reduktion im Gleichgewicht befinden, bestehen. Weil aber mit zunehmender Inkubationszeit ein wesentlicher Anteil der Radikalisierung der *Spin probes* autoxidativ bedingt sein kann, besagt der asymptotische Verlauf dieser Kurve zunächst nur, dass sich die eingesetzte Menge an *Spin probe* nach Ablauf der Zeit x im chemischen Gleichgewicht mit ihrem Radikal befindet. Infolge der unterschiedlichen Diffusionsverhalten und Reaktionsgeschwindigkeiten dürfte diese Zeit spezifisch für jede *Spin probe* sein. Um aber den zellspezifischen Anteil daran herauszurechnen, müssten für jede *Spin probe* Zeitreihen von Zellkonzentrationsreihen gemessen werden. Ähnlich könnten die Zellen nach und nach abzentrifugiert und das ESR-Signal nach Resuspension des Pellets in frischem KHB gemessen werden, woraus sich eine Radikalkonzentration je Zelle über die Zeit errechnen lässt, und daraus ein effektiver Diffusionskoeffizient auf Zellebene. Eine Alternative ist der Einsatz von Kaliumferrizyanid, eine geladene, paramagnetische und membranimpermeable Verbindung, welche spezifisch extrazellulär das Nitroxidsignal auslöscht [306].

Um ROS mit subzellulärer Auflösung detektieren zu können, wurden in Rahmen einer Promotionsarbeit sogenannte *double spin traps* entwickelt, wie z. B. die sich im Mitochondrium anreichende, fluoreszierenden *Spin trap* Nitrostilbennitron [319]. Bei diesem Fluorophor verursacht die Bildung eines Radikal-Adduktes nicht nur ein ESR-Signal, sondern auch das Auslöschung der Fluoreszenz aufgrund des nahe gelegenen stabilen Radikals. Nachteile der Methode sind

das *Photobleaching*, die Zytotoxizität und die kurze Halbwertszeit der fluoreszierenden *Spin trap*, weshalb diese für eine Anwendung im Zellkulturmodell keine Option ist. Ein weiterer experimenteller Ansatz zur Bestimmung der Kompartimentspezifität einer *Spin probe* bestünde in einer für *Spin probes* anzupassenden autoradiographischen Methode, die Nitroxide mit β -Strahlern (z. B. Tritium) markiert und den mikroradiographischen Film anschließend Licht- oder elektronenmikroskopisch abbildet [*light microscope autoradiography* (LMARG) bzw. *electron microscope autoradiography* (EMARG)] [320–322]. Diese derzeit in China infolge einer dort häufigen Bodenbelastung mit Seltenen Erden wieder aktuelle Methode wird dort zum Verständnis der Aufnahmemodalitäten der für pflanzliche wie tierische Organismen toxischen Lanthanoide durch Agrarpflanzen eingesetzt. So konnten Yang et al. mittels EMARG sehr eindrücklich die intrazelluläre Verteilung von ^{160}Tb darstellen, welches spezifisch in der Zellwand, den Membranen der Mitochondrien und der Zellkerne von Wurzelzellen akkumuliert und dort zur Lipidperoxidation führt [323]. Ebenfalls mittels EMARG stellten Wang et al. hochaufgelöst die Verteilung der radioaktiv markierten Cer-Verbindung $^{141}\text{CeCl}_3$ in Wurzelzellen von *Armoracia rusticana* dar [324]. Eine autoradiographische Darstellung des Gehirns mit ^{14}C markiertem, dort MCPROXYL genanntem CM^\bullet wurde 1997 von Miura et al. vorgenommen, um damit zu beweisen, dass venös infundiertes CM^\bullet die Blut-Hirn Schranke passieren kann [325].

Nachweis der nichtradikalischen reaktiven Spezies ONOO^- und H_2O_2

Wie bereits erwähnt, reagieren Hydroxylamin-*Spin probes* aber auch die *Spin traps* BMPO und DEPMPO in erster Linie mit $\text{O}_2^{\bullet-}$, das den Hauptteil der freien organischen Radikale *in vivo* und *in vitro* repräsentiert [316, 326]. Eine sensitive und spezifische Detektion der nichtradikalischen reaktiven Spezies ONOO^- und H_2O_2 ist aufgrund deren Rolle im Kontext des Redox-Signalling und pathophysiologischen Prozesse von Interesse.

ONOO^- wird besonders im Kontext oxidativer Schädigung von Lipiden, Proteinen und Nucleinsäuren (oxidativer Distress) genannt und dessen Rolle bei Entzündungen und der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen hervorgehoben [3, 327, 328]. In Abs. 3.2.5.1 konnte anhand von zellfreien Proben in KHB eine nahezu lineare Abhängigkeit der CM^\bullet -Bildung von der ONOO^- -Konzentration als auch von der Zeit ($100\ \mu\text{M}\ \text{ONOO}^-$) demonstriert und somit nachgewiesen werden, dass CM^\bullet nicht spezifisch mit $\text{O}_2^{\bullet-}$ reagiert, sondern auch durch ONOO^- oxidiert werden kann. Markant war der steile Einbruch des CM^\bullet -Signals zwischen der 31sten und 40sten Inkubationsminute nach einem bis dahin exponentiellen Anstieg. Da ONOO^- ein sehr starkes oxidierendes bzw. nitrierendes Agens ist, besteht der Verdacht, dass CM^\bullet in Gegenwart von ONOO^- eben nicht über mehrere Stunden stabil ist (Abs. 3.2.2.1), sondern deutlich früher zu einem ESR-stummen Reaktionsprodukt zerfällt. Nachdem im Gegensatz zu $\text{O}_2^{\bullet-}$ kein ONOO^- -spezifischer Inhibitor bekannt ist, wurde bei zellhaltigen ESR-Proben vermutet, dass der Anteil des nicht durch pSOD-inhibierbaren CM^\bullet -Signals dem ONOO^- -Anteil

am Gesamt-ESR-Signal entspricht. ONOO^- kann zwar durch die Anwendung von Harnsäure inhibiert werden [53], allerdings wirkt dieses Antioxidanz nicht spezifisch gegen ONOO^- , sondern reagiert ebenfalls mit $\bullet\text{OH}$, $^1\text{O}_2$ und Ozon [127]. Kürzlich konnte *in vivo* gezeigt werden, dass *Edaravone* im Vergleich zu Harnsäure ca. 30 mal schneller mit ONOO^- reagiert und möglicherweise ein spezifischerer Inhibitor ist. Allerdings besitzt dieser Wirkstoff auch gegenüber $\text{LOO}\bullet$ eine hohe antioxidative Kapazität [277]. In Ermangelung von *Spin probes*, *Spin traps* und Antioxidantien die spezifisch mit ONOO^- reagieren, bleibt zum jetzigen Zeitpunkt die Anwendung der HPLC bzw. LC-MS (Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung) die Nachweismethode der Wahl [329–331].

Während nahezu ausschließlich pathophysiologische Wirkungen von ONOO^- bekannt sind, hat H_2O_2 als zellulärer Redox-Sensor im Kontext von Redox-*Signalling* und der Redox-Regulation auch eine große physiologische Bedeutung [2, 332]. Der direkte Nachweis von H_2O_2 mittels ESR-Spektroskopie ist aufgrund des diamagnetischen Charakters dieser Verbindung schwierig. H_2O_2 kann nicht durch *Spin traps* detektiert werden, da diese ausschließlich mit freien Radikalen zu ESR-aktiven Addukten reagieren. Auch durch *Spin probes*, die nicht nur mit freien Radikalen, sondern teilweise auch mit bestimmten reaktiven Anionen (ONOO^- , NO_2^-) stabile Nitroxide bilden, ist kein direkter H_2O_2 -Nachweis möglich [250]. Laut Dikalov et al. (2007) sind Interaktion von CMH mit H_2O_2 vernachlässigbar klein [224]. Möglicherweise können Übergangsmetalle in Gegenwart von H_2O_2 die Oxidation von CMH zu $\text{CM}\bullet$ stimulieren [333]. Durch Zugabe der Chelatoren Deferoxamin und *Diethyldithiocarbamic acid silver salt* (DETC) zum KHB, die mit Übergangsmetallen Metallionenkomplexe bilden, wird diese Reaktion unterbunden und somit eine Falschinterpretation der Ergebnisse weitgehend vermieden.

Durch Anwendung der von Matsuo et al. entwickelten p-AP/HHTIO-Methode ist es jedoch durch HRP-vermittelte Co-Oxidation der *Spin probe* HHTIO und Bildung eines freien Phenoxyradikals als Intermediär-Produkt möglich, H_2O_2 mittels ESR spezifisch nachzuweisen [271]. Unter Anwendung dieser Methode zeichnete sich bei zellfreien Proben ein linearer Anstieg des ESR-Signals in einem H_2O_2 -Konzentrationsbereich von 5 bis $100\ \mu\text{M}$ ab, während die Bildung von $\text{HTIO}\bullet$ durch die Anwendung von Cat (500 U/ml) vollständig inhibiert werden konnte (Abs. 3.2.5.2). Der gewählte Konzentrationsbereich umfasst damit diejenigen H_2O_2 -Konzentrationen, die extrazellulär während einer adaptiven Stressantwort mit Stimulation antioxidativer Signalwege (z. B. Nrf2), während oxidativem Disstress aber auch intrazellulär während einer mit exzessiven oxidativen Stress verbundenen Entzündungsreaktion und Zelltod zu erwarten wären [2]. Die p-AP/HHTIO-Methode wäre damit eine Option zur spezifischen H_2O_2 -Detektion mittels ESR-Spektroskopie. Allerdings wird beschrieben, dass die HRP nicht gut in Zellen aufgenommen werden kann [334], was bedeuten würde, dass mittels p-AP/HHTIO-Methode v. a. extrazelluläres H_2O_2 detektiert wird. Nachteilig ist auch, dass die Umsetzung von HHTIO stark temperatur- und pH-abhängig ist. Das Temperaturoptimum von HHTIO entspricht

zwar mit 37 °C der Zellkulturbedingung für pulmonal-arterielle Zelltypen und wäre somit bei genauerer Temperaturkontrolle auch bei *in vitro* Experimenten einsetzbar. Ein reproduzierbares ESR-Signal mit einer guten SNR-Ratio wird jedoch bei einem pH-Wert zwischen 6,0 und 7,0 mit einem Optimum bei 6,5, erzielt [335], was deutlich außerhalb des für pulmonal-arterielle Zellen physiologischen pH-Wertes von 7,4 liegt. Ein weiteres Problem bei der Anwendung von HHTIO zum Nachweis von zellulären H₂O₂ besteht darin, dass das Hydroxylamin nicht wasserlöslich ist, sondern in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst werden muss. DMSO ist jedoch selbst ESR-aktiv und wirkt bereits in einer sehr geringen Konzentration (5 µM) zytotoxisch [258, 336].

Vor- und Nachteile von *Spin probes* und *Spin traps*

Eine interessante Alternative zu *Spin probes*, ist der ESR-spektroskopische ROS/RNS-Nachweis mittels *Spin traps* (Abs. 3.1.6). Da diese mit unterschiedlichen reaktiven Spezies verschiedene Addukte bilden, ist es möglich, innerhalb desselben ESR-Spektrums anhand von spezifisch ausgebildeten Spektrallinien mehrere initiale Radikale gleichzeitig zu identifizieren [220, 272, 337]. Die in dieser Arbeit eingesetzten *Spin traps* DEPMPO und BMPO reagieren in erster Linie mit O₂•⁻ und •OH [220, 337]. Kriterien für die Auswahl dieser beiden *Spin traps* waren, dass deren Adduktstabilität mit einer Halbwertszeit (t_{1/2}) von 14 - 18 min (DEPMPO) bzw. 20 - 23 min (BMPO) bei einem physiologischen pH-Wert und Raumtemperatur deutlich höher als von anderen *Spin traps* wie z. B. der häufig eingesetzten DMPO (t_{1/2} = 30 - 60 s) und die Toxizität geringer ist [220, 225, 226, 338].

Bei den mit MLF durchgeführten Experimenten zeigte sich ein Anstieg der O₂•⁻-Spin-Addukte BMPO-OOH und DEPMPO-OOH innerhalb der ersten 15 min (Abs. 3.2.6). Die CM•-Bildung stieg hingegen linear über die gesamte Versuchszeit an. Während die Intensität des DEPMPO-OOH Signals in den nachfolgenden 15 min nahezu konstant blieb, setzte bereits der Zerfall von BMPO-OOH ein. Die Zerfallskinetik von BMPO-OOH über 30 min Reaktionszeit stimmt mit der von Zhao et al., also der Arbeitsgruppe, die BMPO erstmals synthetisierte, gut überein [337]. Allerdings konnten im Gegensatz zu Zhao et al. lediglich drei anstatt vier klar voneinander abgrenzbaren Spektrallinien detektiert werden, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass kein •OH-Addukt gebildet wurde. Lediglich bei ESR-Spektren einzelner mit BMPO inkubierten Proben deutete sich eine sehr schwache zusätzliche Spektrallinie bei ≈3 400 Gauß an (Abb. 3.32b, 3.32e), welche auf BMPO-OH hindeuten könnte. Möglicherweise findet unter unstimulierten Bedingungen keine oder nur eine sehr geringe •OH-Bildung statt, oder die Konzentration der ROS liegt unterhalb des Detektionslimits von *Spin traps*. Vorausgesetzt, dass MLF unter basalen Bedingungen prinzipiell •OH extrazellulär freisetzen, könnten die zellulären ROS-Quellen stimuliert oder eine höhere *Spin trap*-Konzentration eingesetzt werden, um ein deutlicheres ESR-Signal detektieren zu können. Khan et al. untersuchten die konzentrationsabhängigen Effekte verschiedener *Spin traps* auf die Zell-Viabilität und Zellfunk-

tion (O_2 -Verbrauchsrate) bei *Chinese Hamster Ovary* (CHO)-Zellen und 9L-Tumorzellen. Sie beobachteten, dass sowohl BMPO als auch DEPMPO in biologischen Systemen bereits ab einer Konzentration von 2,5 mM toxisch sind [339]. Dessen ungeachtet arbeiten die meisten Gruppen mit *Spin trap*-Konzentrationen zwischen 20 und 100 mM. Der Grund für den Einsatz hoher Konzentrationen zur ROS-Detektion in Zellversuchen ist die geringe Reaktionsgeschwindigkeit von *Spin traps* in Gegenwart $O_2^{\bullet-}$ (Tab. 2.5), weshalb sie mit zellulären Antioxidantien (z. B. SOD oder Asc) kaum konkurrieren können [340]. Es ist zu vermuten, dass bei Veröffentlichungen verschiedener Arbeitsgruppen, eine durch zu hohe *Spin trap*-Konzentrationen verbundene Zytotoxizität der eigentliche Auslöser für oxidativen Stress und verstärkte ROS/RNS-Bildung ist, was letztendlich zu einem erhöhten ESR-Signal und zur Fehlinterpretation der Ergebnisse führen kann.

Spin probes sind hinsichtlich $O_2^{\bullet-}$ wesentlich sensitiver und stabiler. Deswegen können sie in deutlich niedrigeren Konzentrationen als *Spin traps* eingesetzt werden [225, 250]. Die Reaktionsgeschwindigkeit (k) mit $O_2^{\bullet-}$ der hier verwendeten *Spin probes* gegenüber *Spin traps* ist um 10 bis zu 150-fach höher. So beträgt k von CMH $\approx 1,2 \times 10^4 M^{-1}s^{-1}$, von BMPO jedoch lediglich $\approx 77 M^{-1}s^{-1}$. Damit sind *Spin probes* besser in der Lage, mit endogenen Antioxidantien um reaktive Spezies zu konkurrieren ($k_{SOD} \approx 6,4 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$). Auch sind sie stabiler gegenüber einer Reduktion durch SOD und Asc [137, 220, 249, 337].

Trotz der im Vergleich zu BMPO (10 mM) und DEPMPO (10 mM) 20-fach niedrigeren Konzentration von CMH (0,5 mM) wurde nach 15 min (maximale ESR-Intensität der *Spin trap*-Addukte) ein ca. dreifach höheres ESR-Signal detektiert (Abs. 3.2.6). Mit CMH (0,5 mM) vergleichbare Ergebnisse wurden in unabhängigen Experimenten mittels der *Spin probes* CPH, PPH und MitoTEMPO-H (jeweils 0,5 mM) bei CMT-Zellen erzielt (Abs. 3.2.4, Abb. 3.28). CM^{\bullet} , das Nitroxid aus der Reaktion von CMH und $O_2^{\bullet-}/ONOO^-$, ist bei Raumtemperatur über mehrere Stunden (Abs. 3.2.2.3) und einen weiten pH-Wert Bereich von ca. 3 bis 9 stabil (Abs. 3.2.2.2). Dadurch sollte der Einfluss des pH auf das gemessene ESR-Spektrum selbst dann noch unerheblich sein, wenn sich dieser im Verlauf des Experiments um eine Log-Stufe ändert. Demgegenüber ist die Addukt-Stabilität von *Spin traps* stark pH-abhängig. DEPMPO zeigt z. B. bei einem pH von 7,4 eine $t_{1/2}$ von 17,7 min und bei 8,0 eine $t_{1/2}$ von nur noch 10,4 min [220].

Sowohl *Spin probes* als auch *Spin traps* reagieren sensitiv auf Temperaturänderung. Während die Temperaturerhöhung bei *Spin probes* zur verstärkten Autoxidation führt (Abs. 3.2.2.1), wird bei *Spin traps* der Zerfall der Spin-Addukte beschleunigt [220]. Außerdem hat die Lagerungstemperatur (-20 °C oder -80 °C) von in KHB gelösten CMH-Aliquots einen starken Einfluss auf die durch Autoxidation verursachte CM^{\bullet} -Bildung. Bereits nach einer Woche Lagerung konnte bei -20 °C gelagerten CMH-Aliquots ein deutlich höheres ESR-Signal detektiert werden, im Vergleich zu bei -80 °C gelagerten (Abs. 3.2.2.2). Deswegen sollte im Hinblick auf eine

möglichst geringe Anfangsaktivität die Lagerung von *Spin probe*-Aliquots bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ erfolgen oder am Versuchstag angesetzte Stammlösungen verwendet werden.

Der Hauptnachteil von *Spin probes* gegenüber *Spin traps* besteht in deren mangelnden Spezifität, die keine direkte Identifikation der reagierenden ROS/RNS anhand der Spektrallinien ermöglicht. Stattdessen wird das Oxidationsprodukt, d. h. das zur eingesetzten *Spin probe* korrespondierende Nitroxid (Abb. 2.3, unterer Teil) detektiert. Weil Hydroxylamin-*Spin probes* neben $\text{O}_2^{\bullet-}$ auch mit ONOO^- reagieren oder bereits bei einer Lieferung unterschiedliche Aktivität aufweisen können, ist es notwendig, Antioxidantien wie SOD oder Inhibitoren von ROS-Quellen wie NADPH-Oxidasen, Xanthin-Oxidasen oder Enzyme der mitochondrialen ETC einzusetzen, um den spezifischen Anteil einer reaktiven Spezies am ESR-Signal bestimmen zu können [53, 341, 342].

Effekt der O_2 -Konzentration auf die ROS/RNS-Produktion pulmonaler Zellen

PASMC sprechen sensibel auf eine Änderung des pO_2 an. Sie reagieren bei akuter Hypoxie mit Kontraktion, was eine Besonderheit pulmonal-arterieller SMC ist. Demgegenüber dilatieren SMCs anderer Organe unter Hypoxie [187, 189] und verhalten sich somit ähnlich wie die SMC des *Ductus arteriosus*, welche unter normoxischen Bedingungen den fötalen Umgehungskreislauf der Lunge schließen [190]. PASMCs gelten sowohl als Sensor als auch als Effektorzellen der HPV [189, 191]. Unter chronischer Hypoxie reagieren PASMC mit verstärkter Proliferation bei verminderter Kontraktion.

Vergleichbare Reaktionen sind auch bei isolierten PASMCs zu beobachten [188, 202, 343]. Deswegen wird dieser Zelltyp als *in vitro* Modell zur Untersuchung der Mechanismen herangezogen, welche eine HPV auslösen oder regulieren und letztlich zu einer pulmonalen Hypertonie (PH) führen können. Dabei gelten die Mitochondrien der PASMC als die entscheidenden O_2 -Sensoren [99]. Die nachgeschalteten, in die zelluläre ROS-Regulation involvierten Signalwege werden hingegen kontrovers diskutiert [344, 345]. Grundsätzlich werden zwei diametral verschiedene Hypothesen verfolgt. Die Anhänger der „Redox-Hypothese“ behaupten, dass die HPV mit einem Abfall an mtROS und einem damit verbundenen, stärker reduzierenden zytosolischen Redox-Milieu assoziiert sei [346], während die Anhänger der „ROS-Hypothese“ der Ansicht sind, dass die HPV als Antwort auf eine erhöhte ROS-Bildung initiiert werde [347].

In dieser Arbeit wurde die akute intra- und extrazelluläre ROS/RNS-Bildung von mPASMCs und MLF in Abhängigkeit vom pO_2 in der Gasphase als Konzentrationsreihe mittels ESR bestimmt (Abs. 3.2.7.1). Die akute Hypoxieexposition (5 min) der zuvor über drei bis vier Wochen bei 21 % O_2 bis zur P_2 kultivierten mPASMC führte bei 1 % O_2 , nicht jedoch bei 5, 10 und 15 % O_2 zu einem hochsignifikanten Anstieg der intra- und extrazellulären CM^{\bullet} - und $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Konzentration im Vergleich zur Normoxie (21 %). Auffällig ist auch, dass die ROS/RNS-Produktion bei 21 % O_2 in der Gasphase gegenüber den mittleren Konzentrationen sich ähnlich

hoch darstellte wie diejenige bei 5 % O₂ und somit die ROS-Produktion einen U-förmigen Verlauf nahm, mit einem Minimum bei 10 bis 15 % O₂. Ein pO₂ von 40 mmHg (≈5 % O₂) gilt als der für große Pulmonalarterien physiologische pO₂ [99, 348]. Dieser entspricht zwar der O₂-Spannung von der Lunge zugeführten gemischt-venösen Blut, nicht jedoch derjenigen in der Wandung der kleinen pulmonalen Arteriolen von ca. 20 - 80 µm Durchmesser, wo sie wegen der direkten O₂-Diffusion aus den benachbarten Alveolen höher liegt [99].

Für Hunde lässt sich nach einem Modell von Marshall (1988), welches auf einem empirisch gewichteten Durchschnitt zwischen dem alveolären und gemischt-venösem pO₂ basiert, bei einem angenommenen pO₂ von 13 % in den Alveolen und 5 % O₂ im gemischt-venösen Blut ein Schwellwert von 7 % (≈53 mmHg) in der Umgebung der PASMCS berechnen, ab dem eine beobachtbare Kontraktion auftritt [23, 349, 350]. Untersuchungen an isolierten Arteriolen von Ratten haben ergeben, dass eine Kontraktion von PASMCS bei einem pO₂ von etwa 60 mmHg (8 %) beginnt, wobei die Interpretation dieser Experimente deshalb etwas schwierig ist, weil in deren größeren Zahl isolierte Arteriolen ohne zusätzliche Stimulation durch Vasokonstriktoren wie Angiotensin durch Hypoxie alleine nicht reproduzierbar ausgelöst oder aufrechterhalten werden kann [23]. Aaronson et al. geben einen pO₂ von 20 - 60 mmHg für eine moderate physiologische Hypoxie bei isolierten Pulmonalarterien an [351]. *In situ* Messungen des pO₂ in der Wandung von pulmonalen Arteriolen zwecks Eingrenzung der physiologischen O₂-Spannung in der Umgebung von PASMCS scheinen bisher nicht vorgenommen worden zu sein.

Bei gedanklicher Einordnung all dieser Werte ist zu bedenken, dass Literaturangaben für den pO₂ mit Bezug auf eine durchaus physiologische HPV teils in Form von Schwellwerten für eine gerade noch beobachtbare Kontraktion mitgeteilt werden, teils Bereichsangaben für eine halbmaximale oder maximale Antwort auf einen Hypoxiereiz darstellen, und teils inspiratorisch, teils alveolär oder bei isolierten Zellen als pO₂ der Gasphase zu verstehen sind. Abb. 5.2

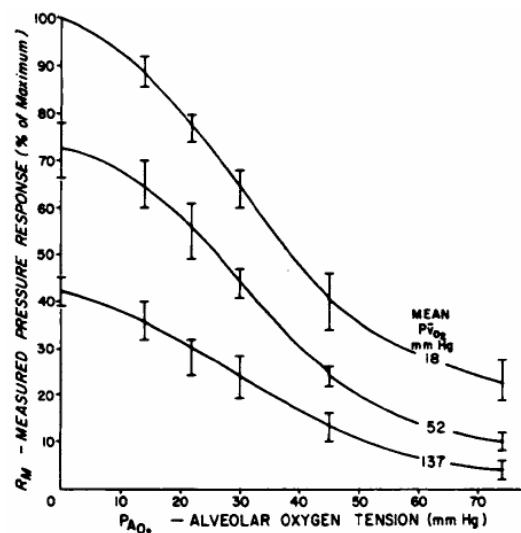


Abbildung 5.2: Druckantwort der Widerstandsgefäße in Abhängigkeit des pO₂ im pulmonal-arteriellen Blut und den Alveolen. Dieser historische Versuch zeichnete über einen Ballonkatheter die Druckantwort der präterminalen Widerstandsgefäße in Abhängigkeit des alveolären pO₂ bei drei verschiedenen Sauerstoff-Partialdrücken im pulmonal-arteriellen Blutstrom auf. Dabei sorgte eine geregelte Pumpe für einen konstanten Blutfluss \dot{V} , sodass sich die Kontraktion der Widerstandsgefäße linear in einen Druckanstieg übersetzen ließ ($P = R \times \dot{V}$, mit $\dot{V} = const$). Die obere Kurve entspricht einem stark hypoxischen pO₂ von 18 mmHg ≈2,5 % O₂, die mittlere etwa dem von gemischt-venösen Blut in der Arteria pulmonalis (52 mmHg ≈7 % O₂), während die untere etwas über der O₂-Sättigung von arterialisiertem Blut im linken Vorhof liegt (137 mmHg ≈18,3 % O₂); nach Marshall (1983) [349]. Mean P_VO₂: mittlerer pO₂ im zuführenden Blut; P_{AO₂} - Alveolar Oxygen Tension [mmHg]; alveolärer pO₂ [mmHg]; R_M - Measured Pressure Response (% of Maximum); gemessene Druckantwort als Prozentsatz des Maximalwertes des pulmonal-arteriellen Drucks (PAP); \dot{V} : physikalische Notation für den Fluss als Ableitung des Volumens V nach der Zeit.

zeigt, dass die Druckantwort im Kontext der in etwa physiologischen mittleren Kurve bei einer alveolären O_2 -Konzentration von 75 mmHg (10 %) flach gegen höhere O_2 -Konzentrationen hin ausläuft, und umgekehrt gegen niedrigere alveoläre O_2 -Konzentrationen bis etwa 60 mmHg nur langsam ansteigt. Die als normal geltende alveoläre O_2 -Konzentration von 100 mmHg entspricht einem pO_2 von 13 % [113].

Für die Interpretation der Messergebnisse ist auch die Überlegung von erheblicher Bedeutung, dass der O_2 -Partialdruck der Gasphase während der Kultivierung der PASMC eigentlich den physiologischen Verhältnissen in deren natürlichen Umgebung entsprechen sollte und eben nicht dem viel höheren Partialdruck von ≈ 157 mmHg ($\approx 21\% O_2$) bzw. alveolär 100 mmHg, der für die Mehrzahl der landlebenden Säugetiere normal ist [352]. Bei Kultivierung der Zellen unter hyperoxischen Bedingungen können sich Adaptationsprozesse auswirken, die zu einer Induktion redox-sensitiver Signalwege wie Nrf2 und somit zur verstärkten Expression antioxidativ wirksamer Enzyme, zu einer Erhöhung der intrazellulären GSH-Synthese oder einer Herabregulation von ROS-generierenden Enzymen führen [113, 157, 353].

Entsprechende Ergebnisse haben auch Kumar et al. anhand des Vergleichs von bei 13 % und 21 % kultivierten Ansätzen der humanen alveolären Epithelzelllinie A549 erhalten, deren physiologische Normoxie bei 13 % liegt. Nachdem bei 21 % O_2 als Folge einer Adaptation an die aus zellulärer Sicht hyperoxische Umgebung eine Vielzahl Nrf2-regulierter Antioxidantien erhöht exprimiert wurden, warnen die Autoren ausdrücklich vor den Implikationen, die sich aus der Kultur von Zellen bei einer unangemessenen O_2 -Spannung ergeben [113]. Auch Chapple et al., welche Endothelzellen der *vena umbilicalis* sowohl bei zellphysiologischen 5 % als auch bei 21 % O_2 kultivierten, beobachteten eine Überexpression von endogenen Antioxidantien unter Hyperoxie [354].

Durch eine einerseits für PASMCs physiologische O_2 -Konzentration von ca. 10 % und andererseits durch die zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung infolge einer mehrwöchigen Kultur bei 21 % O_2 bereits erhöhte Expression von Antioxidantien wäre erklärbar, dass im Bereich zwischen 5 und 21 % O_2 , also zwischen zelltypspezifischer Hypoxie und Hyperoxie, die ROS-Produktion von mPASMCs nahezu konstant und im Vergleich zu den Extremen an beiden Enden minimal ist (Abb. 3.34). Dennoch fällt ein exponentiell anmutender Anstieg in Richtung sehr niedriger O_2 -Konzentrationen auf, der, obwohl bisher nicht explizit getestet, jeweils hochsignifikante Unterschiede zum ROS-Signal bei nominal 1 % O_2 erbringen dürfte.

Obschon ihre äußere Lage an den Arteriolen zu einer etwas höheren physiologischen O_2 -Spannung führen sollte, reagierten MLFs gegensätzlich zu PASMCs. Bei MLFs wurde bei 15 bis 21 % O_2 die höchste ROS-Konzentration detektiert, welche bei 10 % um ca. die Hälfte abfiel und bis 1 % O_2 nahezu stabil blieb (Abs. 3.2.7). Noch eindrücklicher erschien der mit einer abnehmenden O_2 -Konzentration fast lineare Abfall der $O_2^{\bullet-}$ -Konzentration bei MLFs. Aufgrund ihres annehmbar geringeren O_2 -Verbrauchs liegt es nahe, dass MLFs als Teil des Binde- und

Stützgewebes auf sehr geringe O_2 -Konzentrationen anders reagieren als die PSMCs, nämlich durch Reduktion ihres Stoffwechsels.

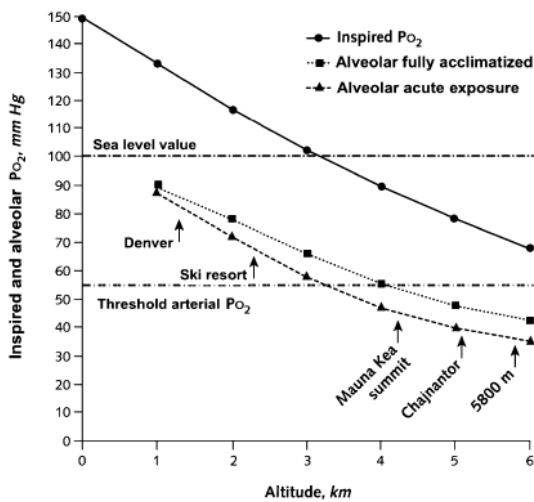


Abbildung 5.3: Atmosphärische und alveoläre O_2 -Konzentrationen in Abhängigkeit von der Höhe über dem Meeresspiegel. Inspired and alveolar pO_2 , mmHg – Inspirierter pO_2 und alveolärer pO_2 mmHg; Altitude, km – Höhe in Kilometern; Sea level value – pO_2 Wert auf Meereshöhe; Threshold arterial pO_2 – Grenzwert des arteriellen pO_2 ab dem COPD Patienten einen Sauerstoffkonzentrator mitführen; Inspired pO_2 – pO_2 in der inspirierten Luft.

Aveolar fully acclimatized – alveolärer pO_2 bei voll akklimatisierten Personen. Aveolar acute exposure – alveolärer pO_2 bei akut exponierten Personen; nach West (2012) [167].

Aus Abb. 5.3 ist zu ersehen, dass ein alveolärer Partialdruck von 5 % O_2 bereits einer Höhe von 5 000 Metern über dem Meeresspiegel entspricht, während ein pO_2 von 1 % erst in einer mit dem Leben nicht mehr zu vereinbarenden Höhe von 25 km auftreten würde. Somit liegt die Frage nahe, welche pathophysiologische oder therapeutische Relevanz die Untersuchung von Partialdrücken weit unterhalb von 5 % O_2 hat, insofern diese O_2 -Konzentrationen innerhalb der Einwirkungszeit von 5 min auch tatsächlich erreicht werden.

Andererseits sind physiologische pO_2 -Werte auf zellulärer Ebene in der Wand kleiner Arteriolen auch heute noch nur schwer verlässlich zu messen. Gemäß einem Review von Ward et al. aus 2008 liegt der in der Wand von systemischen präkapillären Arteriolen gemessene pO_2 bei 21,5 - 30 mmHg (3 - 4 kPa) [99]; die Verhältnisse in den kleinen Arteriolen der Lunge seien vergleichbar (J. Ward, persönliche Mitteilung).

Hinzu kommt, dass isolierte PSMC erst bei geringeren O_2 -Partialdrücken mit Kontraktion reagieren als PSMCs im Gewebeverband einer intakten Lunge. Dies liegt möglicherweise darin begründet, weil die im Vergleich großen Diffusionstrecken in üblicherweise von oben begasten, 2 - 5 mm dicken Schichten zu einem steilen O_2 -Gradienten innerhalb der Schicht führen [99] und so der tatsächlich bestehende, mittlere pO_2 gegenüber dem aus der Gasphase abgeleiteten nominalen pO_2 falsch eingeschätzt wird.

Einfluss der Dauer der Hypoxie-Exposition auf die ROS und $O_2^{\bullet-}$ -Freisetzung

In einem 2009 erschienenen Review unterteilten Ward und McMurty die Pathogenese einer PH in drei Phasen [178]. Anhand des Hypoxie-induzierten Anstiegs des pulmonalen Gefäßwiderstandes, der Ca^{2+} -abhängigen und der Ca^{2+} -unabhängigen Vasokonstriktion sowie des vaskulären Remodelling unterschieden sie in eine akute (10-15 min, Phase 1), prolongierte (≥ 15 min bis einige Stunden, Phase 2) und eine chronische Phase (mehrere Tage bis Monate, Phase 3) [178]. In anderen Arbeiten wird die akute Phase auf eine Zeitspanne zwischen 5 bis 20 min festgelegt [191, 200, 351, 355], wobei für kultivierte PSMC eine akute Phase von institutsüblichen 5 min angewendet wurde. Die prolongierte Phase wird als temporäre (partielle) Vasodilatation

definiert, welche von einer zweiten vasokonstriktiven Antwort gefolgt wird und mehrere Minuten bis Stunden, teils Tage andauern soll [189].

Um nun neben der akuten Phase (Abs. 3.2.7.1) auch die prolongierte und die chronische Phase einer HPV (Abb. 1.7) hinsichtlich der ROS/RNS-Produktion von mPASCs im Zellmodell abzubilden, wurden zusätzlich ESR-Messungen nach 3, 48 und 120 h Hypoxie (1 % O₂) durchgeführt (Abs. 3.2.7.2). Sowohl CM• als auch O₂•⁻ nahmen mit der Dauer der hypoxischen Expositionszeit ab, wobei der Abfall der O₂•⁻-Konzentration als über die Zeit linear imponierte. Betrachtet man die O₂•⁻-Bildung von Zellen, die entweder für 3 oder 48 h unter Hypoxie inkubiert wurden, bestand zwar kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur normoxischen Kontrollgruppe, aber dennoch ein positiver (3 h) bzw. negativer (48 h) Trend entlang der Zeitachse (Abs. 3.2.7.2). Die O₂•⁻-Produktion der PASCs war nach 3 h Hypoxie gegenüber atmosphärischer Normoxie merklich, jedoch nicht signifikant erhöht. Nach 48 h war die O₂•⁻-Bildung bereits stark abgesunken. Das Ergebnis glich dem von PASCs unter chronischer Hypoxie (120 h), war jedoch gegenüber der normoxischen Referenz nicht signifikant niedriger. Nach 120 h Hypoxie war mittels ESR kaum noch extra- und intrazelluläres O₂•⁻ nachweisbar. Das Ergebnis war hochsignifikant zu dem von unter Normoxie (21 %) kultivierten Zellen verschieden. Im Gegensatz zu O₂•⁻ war hinsichtlich der ROS/RNS-Freisetzung überraschend bereits nach 48 h Hypoxie ein hochsignifikant niedrigeres ESR-Signal zu beobachten. Dies könnte dahingehend interpretiert werden, dass nach 120 h Hypoxie zu einem deutlich höheren Anteil ONOO⁻ gebildet wird.

Vergleichbare Ergebnisse wurden mittels Fluoreszenzmessungen bei mPASCs der auch für die ESR-Messungen eingesetzten Tiere nach 120 h Hypoxie erzielt. Dabei ergaben sowohl das mittels DHE gemessene intrazelluläre O₂•⁻ als auch das mittels DCFDA bestimmte intrazelluläre H₂O₂ im Vergleich zur Normoxie deutlich niedrigere Werte. Keine Signifikanz, aber doch eine entsprechende Tendenz zeigte sich in den Daten des mittels MitoSOX bestimmten mitochondrialen ROS (Abs. 3.2.7.3). Zumindest unter Normoxie bestand zwischen den Ergebnissen der ESR-Spektroskopie für CM• und der DHE-Methode ein stark positiver, bei chronischer Hypoxie ein moderat positiver Zusammenhang, was ein Hinweis darauf ist, dass beide Methoden im Kontext des Versuchsansatzes überwiegend die gleichen Spezies nachweisen. Insoweit erweist sich DHE als eine vergleichbar sensitive Nachweismethode für ROS und somit als Alternative zur ESR-Technik.

Im Unterschied zu DHE waren die mit dem DCFDA-Assay gewonnenen H₂O₂-Daten negativ mit CM• korreliert, was bedeutet, dass mit zunehmender CM•-Konzentration das intrazelluläre H₂O₂ abnimmt. Dieser Zusammenhang wird besonders in Abb. 3.37 deutlich, in welcher die Signale der Fluoreszenzsonden und die mittels ESR ermittelten O₂•⁻-Konzentrationen gegen die CM•-Konzentrationen je Tier aufgetragen und getrennt für Normoxie und chronische Hypoxie eine lineare Regression durchgeführt wurde. Die Darstellung gibt auch einen Hinweis auf die

Variabilität, die sich anhand der klein gedruckten Nummern der Einzeltiere nachverfolgen lässt, und welche ähnlich einer Standardreihe in ihrer Gesamtheit eine ROS-Konzentrationsreihe mit verdeckten Etiketten bilden, die über alle Assays gleich ist. Mäuse, welche aufgrund von stärker aktivierten ROS-Quellen viel $O_2^{\bullet-}$ oder H_2O_2 produzieren, zeigen in fast jedem der fünf Diagramme hohe Signale. Besonders eindrücklich stellt sich dies bei Zellen von Maus 14 dar, bei denen durchgängig hohe bis sehr hohe ROS-Konzentrationen nachgewiesen wurden (Abb. 3.37). Eine Beziehung zur vorangehenden Balkengraphik in Abb. 3.36 lässt sich dadurch herstellen, dass gedanklich die Gruppen der jeweils blau und grau gezeichneten Werte je Assay über die Abszisse gemittelt werden.

Da $O_2^{\bullet-}$ schnell durch SOD1 oder SOD2 zu H_2O_2 katalysiert wird, schließen die Autoren zahlreicher Publikationen von einer hohen $O_2^{\bullet-}$ - auf eine hohe H_2O_2 -Konzentration. H_2O_2 diffundiert leicht durch Mitochondrien- und Zellmembranen [37, 198]. Deswegen wird angenommen, dass zwischen 20 und 30 % des zytosolischen H_2O_2 mitochondrialen Ursprungs sei [63, 65]. Die hier vorliegenden Ergebnisse deuten eher auf eine Gleichgewichtssituation unter Normoxie hin, und darauf, dass eine Beziehung zwischen der Konzentration von $O_2^{\bullet-}$ sowie $ONOO^-$ einerseits und H_2O_2 andererseits gerade in umgekehrter Richtung besteht, wobei der Gleichgewichtspunkt auf Seiten von $O_2^{\bullet-}$ und $ONOO^-$ liegt.

Einfluss Nrf2-regulierter Enzyme auf die ROS-Produktion pulmonal-arterieller Zellen

Die $O_2^{\bullet-}$ -Freisetzung von MLF von Nrf2-KO-Mäusen und WT-MLF wurde unter basalen Bedingungen untersucht (Abs. 3.2.7.4). Die Untersuchungen sind Teil der Publikation von Tomasovic et al. (2015) [205]. MLF, die aus Nrf2-KO Mäusen isoliert wurden, zeigten eine signifikant erhöhte $O_2^{\bullet-}$ -Produktion gegenüber der von WT-MLF (Abb. 3.41). Dieses Ergebnis veranschaulicht, dass Nrf2-regulierte antioxidativ wirksame Enzyme bereits unter basalen Bedingungen einen starken Einfluss auf die Regulation der zellulären Redox-Homöostase haben. Allerdings konnten trotz der deutlich höheren ROS-Freisetzung bei Nrf2-KO Zellen unter unstimulierten Bedingungen keine zellulären Schädigungen durch oxidativen Stress nachgewiesen werden. Messier et al. (2013) hingegen wiesen bei alveolären Typ II-Epithelzellen (ATII)-Zellen von Nrf2-KO Mäusen nach, dass diese empfindlich gegenüber der Schädigung durch Zigarettenrauch reagieren [356]. Eine Nrf2-Defizienz und folglich die verminderte Genexpression antioxidativ und zytoprotektiv wirksamer Enzyme zur Regulation des Redox-Gleichgewichtes führten dort zu einer Akkumulation von ROS und zur Induktion von DNA-Schäden, Entzündung und Apoptose. Die Arbeitsgruppe berichtete darüber hinaus, dass Zigarettenrauch als ein starker Stimulus für eine überschießende ROS-Produktion bei WT-Zellen eine starke Gegenregulation durch die Aktivierung des antioxidativen und zytoprotektiven Systems zur Folge hat und somit ein reduzierendes, intrazelluläres Milieu hervorruft.

Bei COPD-Patienten ist trotz intensiver Untersuchung Nrf2-regulierter Gene das Erscheinungs-

bild der Stressantwort weniger klar. Eine Vielzahl an Studien, die eine genomweite Expressionsanalyse durchführten, wiesen eine Heraufregulation bzw. keinen Unterschied in der Genexpression im Epithel der Atemwege und Lungengewebe von COPD-Patienten nach [205, 357, 358]. Andere Studien berichteten wiederum über einen Abfall der Nrf2-Aktivität mit zunehmenden Schweregrad der COPD [359]. Tomasovic et al. zeigten, dass eine Aktivierung des Sestrin2/Nrf2-Signalweges in Lungen von Patienten mit einer schweren COPD zur Suppression des *Platelet-derived Growth Factor Receptor β* (Pdgfr β) führte, da der Wachstumsfaktor in einem reduzierten Milieu proteosomal abgebaut wird [205]. Da Pdgfr β die Regeneration von Lungengewebe und die Heilung von Verletzungen induziert, kann dessen Suppression aufgrund fehlender oder schwacher ROS-Stimuli somit fatale Auswirkungen auf die bereits schwer geschädigte Lunge haben. Bei Nrf2-KO MLF konnte im Gegensatz zum Wildtyp sowohl eine hochsignifikant erhöhte $O_2^{\bullet-}$ -Konzentration als auch Pdgfr β -Expression nachgewiesen werden. Dadurch waren Nrf2- als auch Sestrin2-defiziente Mäuse wiederum gegenüber der Entwicklung eines durch Zigarettenrauch induzierten pulmonalem Emphysems im Vergleich zu WT-Tieren besser geschützt [205, 206, 360].

Diese Ergebnisse scheinen die zuvor von Messier et al. [356] bei ATII-Zellen von Nrf2-KO Mäusen beschriebenen zu widerlegen. Das Paradoxon liegt darin begründet, dass einerseits eine erhöhte Expression von Antioxidantien zu vermindertem oxidativen Stress führt. Im Fall der Nrf2-defizienten ATII-Zellen kann bei zusätzlichem starken ROS-Stimulus wie Zigarettenrauch keine effektive Adaptation an oxidativen Stress erfolgen. Andererseits sind ROS essentielle Signalmoleküle und als solche in die Transduktion verschiedener Regulationsmechanismen wie von Pdgfr β involviert. Bei bereits schwer geschädigtem Gewebe, wie im Fall eines Lungenemphysems, wäre demnach oxidativer Stress in bestimmten Maßen als Stimulus für zelluläre Reparaturprozesse unabdingbar. Eine Verminderung der Nrf2-Aktivität oder Inhibition des Transkriptionsfaktors könnte sich demnach vorteilhaft auswirken könnte.

Desweiteren wurde in der vorliegenden Arbeit bei mPASC die Proteinexpression der Nrf2-regulierten Enzyme SOD1, SOD2 und Cat bei Normoxie sowie nach 3 und 120 h Hypoxie bestimmt (Abs. 3.2.7.4). Die Unterscheidung nach zytosolischer und mitochondrialer SOD (SOD1 und SOD2) war angebracht, da postuliert wird, dass Hypoxie kompartimentspezifisches Redox-Signalling in PASCs auslöst [361]. Dabei soll besonders während der akut hypoxischen Phase mitochondriales ROS freigesetzt werden [198, 347], welche mit der SOD2-Expression positiv korreliert [198].

Die Expression der in dieser Arbeit untersuchten Antioxidantien unterschied sich nur unwesentlich zwischen der normoxischen und für 3 h Hypoxie-exponierten Gruppe. Allerdings sank bei SOD2 nicht jedoch bei SOD1 und Cat die Expression unter chronisch hypoxischen Bedingungen (120 h, 1 % O_2) deutlich ab. Somit scheint lediglich die Proteinexpression von SOD2 positiv mit den mittels ESR bestimmten $O_2^{\bullet-}$ -Konzentrationen zu korrelieren (Abs. 3.2.7.2).

Auch die Expression von Cat folgt nicht dem Trend der intrazellulären H_2O_2 -Bildung, welche mittels der DCFDA-Methode nachgewiesen wurde (Abs. 3.2.7.3), sondern scheint nach 120 h Hypoxieexposition leicht anzusteigen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die zytosolischen Antioxidantien (SOD1 und Cat) konstitutiv exprimiert werden und relativ insensitive gegenüber dem hier vorherrschenden pO_2 und der Dauer der Hypoxieexposition sind. Die SOD2-Expression wird hingegen erst als Antwort auf die Hypoxie-induzierte mtROS-Produktion in der akuten Phase exprimiert.

Darüber hinaus ist zu bedenken, dass die für den ESR-spektroskopischen $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Nachweis verwendete *Spin probe* CMH nicht kompartimentspezifisch ist, sondern mitochondriales, zytosolisches und extrazelluläres $\text{O}_2^{\bullet-}$ detektiert. Dadurch ist die Vergleichbarkeit der $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Produktion mit der Proteinexpression nur bedingt möglich. Jedoch zeigt der fluorometrische Nachweis von mitochondrialem und intrazellulärem $\text{O}_2^{\bullet-}$ sowie H_2O_2 sowohl bei Normoxie als auch bei chronischer Hypoxie die gleichen Trends (Abs. 3.2.7.3). Das Ergebnis ist ein weiterer Hinweis, dass der während akuter und prolongierter Hypoxie auftretende oxidative Stress hauptsächlich durch mitochondriale ROS-Produktion forciert wird. Klingt dieser mit zunehmender Dauer der Hypoxie ab, ist auch das gesamte $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Signal und in diesem Zusammenhang, die SOD2-Expression niedrig. Waypa et al. gelang es mittels roGFP, einer redox-sensitiven Variante des *green fluorescent protein* (GFP), ein kompartimentspezifischer Nachweis der $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Konzentration im Zytosol, der mitochondrialen Matrix und dem mitochondrialen Intermembranraum (IMS). Dabei zeigten sie einen $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Anstieg im IMS und Zytosol, aber einen Abfall in der Matrix nach 30 min Hypoxie (1,5 % O_2) [347, 362]. Mit dem unterschiedlichen Beitrag der ROS-Quellen zur intrazellulären ROS-Produktion während der Hypoxie, und der Annahme, dass die Produktion der Antioxidantien grundsätzlich positiv mit der ROS-Produktion korreliert, wäre das abweichende Ergebnis in der Proteinexpression zu erklären, wonach bei chronischer Hypoxie die intrazelluläre SOD1- und Cat-Expression, aber das mitochondriale $\text{O}_2^{\bullet-}$ sowie die SOD2-Expression abfällt (Abs. 3.2.7.4). Ein weiterer interessanter Gedanke ist, dass SOD2 scheinbar als Tumorrepressor agiert. Archer et al. wiesen bei SOD2-defizienten PASMC eine erhöhte Proliferationsaktivität nach [198]. Der Umkehrschluss wäre eine mögliche Erklärung dafür, dass PASMC unter chronischer Hypoxie, im Gegensatz zu denen unter akuter Hypoxie verstärkt proliferieren, da die SOD2-Expression, wie in den hier vorliegenden Ergebnissen dargestellt, nach 120 h Hypoxie deutlich herabreguliert ist.

Pilotversuch ILU-ESR

Die ILU ist ein Versuchssystem zur Untersuchung der Lungenfunktion und ihrer lokalen Regulationsmechanismen, mit dem sich (patho-)physiologische Prozesse auf Organebene nachvollziehen und die Auswirkungen von Pharmazeutika oder Toxinen als Zeitreihen beobachten lassen. Obwohl die isolierte Lunge nicht im Kontext des Gesamtorganismus steht, kann sie durch Ventilation und Perfussion am Leben erhalten und dadurch deren physiologische Re-

gelungsmechanismen über mehrere Stunden untersucht werden. Während durch das Fehlen von zentralen integrativen Mechanismen (sowohl neural als auch humoral) der Blick auf die lokale Ebene eingeschränkt wird, bleibt im Gegensatz zu aus der Lunge isolierten Primärzellen der anatomische und funktionale Zusammenhang erhalten. Damit verlaufen die transzellulären Transport- und Diffusionsmechanismen ähnlich wie sie auch im intakten Gesamtorganismus ablaufen würden [363]. Primärzellen stellen dagegen ein vollkommen artifizielles System dar, bei welchem Zell-Zell-Interaktionen zwischen den unterschiedlichen Zelltypen der Pulmonalarterien (Epithelzellen, Fibroblasten der Adventitia, SMCs der Media, Endothelzellen der Intima) nicht mehr möglich sind. Dazu zählt die Produktion von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren sowie von parakrinen Substanzen, welche die Proliferation, Migration und biosynthetische Aktivität von Nachbarzellen stimulieren [181].

Die Etablierung einer ESR-Umgebung für eine isolierte, ventilierte und perfundierte Lunge stellt deshalb eine experimentelle Alternative dar, um den in den vorangehenden Abschnitten herausgestellten Beschränkungen von Zellkulturen zu begegnen. Eine als Zeitreihe gemessenen ROS-Konzentration ermöglicht es, zeitlich parallel dazu erfasste physiologische Parameter in Beziehung zu stellen, wofür der im Abs. 3.2.9 beschriebene Pilotversuch als Einstieg dienen sollte.

Das hier eingesetzte rezirkulierende Perfusionssystem ist allerdings nicht das einzig denkbare. Von Vorteil ist zwar die Einstellung eines Equilibriums zwischen Perfusat und Lungengewebe, was im Zusammenhang mit Normoxie/Hypoxie-Versuchen auch dazu genutzt wird, um die O_2 -Konzentration im der Lunge zuströmenden Perfusat ohne Einschaltung eines externen Oxygenators zwischen hohen und niedrigen Konzentrationen hin und her zu treiben. Als nachteilig wird gesehen, dass bei fortgesetzter Substratverarmung eine Akkumulation ggf. toxischer Metaboliten erfolgt oder denaturierte Proteine und durch die Pumpmechanik abgelöste Partikel im System akkumulieren. Nachdem derartige Experimente über Stunden laufen, besteht auch die Möglichkeit eines kontaminationsbedingten, exponentiellen Keimwachstums, dem antibiotisch nicht leicht zu begegnen ist, weil dadurch die Interpretation der Ergebnisse erschwert werden kann [364].

Im Kontext dieses ESR-Experiments bedeutet die Rezirkulation auch, dass die Höhe des Gesamtsignals zu jedem Zeitpunkt von allen früheren Zeitpunkten abhängig ist, wobei sich im Verlauf des Experiments im Perfusat das Verhältnis vom Hydroxylamin zunehmend zum Nitroxid hin verschiebt. Intrazellulär kann dieses Verhältnis anders sein: Unter zunehmender Hypoxie besteht dort eine zunehmend reduzierende Umgebung, welche das Nitroxid/Hydroxylamin-Verhältnis zum Hydroxylamin hin verschiebt [306].

Weil Hydroxylamine im Gegensatz zu Nitroxiden diamagnetisch sind, wurden die paramagnetischen Nitroxide seither eingehend auf ihre Eignung als Magnetresonanz-Tomographie (MRT) Kontrastmittel untersucht, auch weil sie sich zur Darstellung des lokalen Redox-Status und damit

als Tumorkontrastmittel eignen [365]. Entsprechend zeigen auch *electron paramagnetic resonance imaging* (EPRI)-Untersuchungen eine gewebsabhängig unterschiedlich schnell ablaufende Reduktion von intravenös verabreichten Nitroxiden [366]. Im Kontext eines ILU-Experiments auf Basis von CMH ist die Tatsache von besonderer Bedeutung, dass neben dem Hydroxylamin auch CM^\bullet gut gewebeängig ist [325, 367, 368]. Das bedeutet letztlich, dass intrazellulär gebildetes Nitroxid direkt in das Perfusat übertreten und umgekehrt extrazelluläres Nitroxid aus dem Perfusatsystem zurück in die Zellen diffundieren kann. Dabei bestimmt, wie oben erwähnt und in Abs. 5.1 näher ausgeführt, der Redox-Zustand der Atmungskette das intrazelluläre Verhältnis zwischen Nitroxid und Hydroxylamin.

In Abb. 3.43 ist nach Zugabe von CMH eine kurz andauernde, aber deutliche PAP-Einsenkung zu erkennen. Zumindest unter Hypoxie ist die PAP-Absenkung eine bekannte Wirkung von Nitroxiden [369] und generell auch eine bekannte Wirkung auf systemische VSMCs [370, 371].

Obwohl CMH als nicht toxisch beworben wird [372], ist abhängig von Konzentration, Zelltyp und Einwirkungsdauer durchaus mit toxischen Effekten zu rechnen. Kinoshita et al. haben 2010 für Tempol und dessen Hydroxylamin an HepG2 und HUVEC-Zellen eine dosisabhängige Zytotoxizität nachgewiesen. Mit HepG2-Zellen und 500 μM Nitroxid oder Hydroxylamin über 24 h war die Zahl überlebender Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen auf etwa 50 % vermindert, mit 1 mM Nitroxid überlebten 40 %, während mit 1 mM der Hydroxylaminform nur 20 % am Leben blieben [373].

Physiologischer Anteil am ILU-ESR Signal

Die in Glg. 3.5 beschriebene O_2 -Abhängigkeit des Gesamtsignals stellt das Grundproblem von ESR-Messungen in flüssigen Medien bei wechselnder O_2 -Konzentration heraus, welches zunächst vor allem darin besteht, dass die jeweils erreichte Signalhöhe von der im Perfusat gerade bestehenden O_2 -Konzentration moduliert wird, was wiederum als Folge der konzentrationsabhängigen Wahrscheinlichkeit gesehen werden kann, dass ein sich in Lösung befindliches CM^\bullet -Molekül auf ein O_2 -Molekül trifft und ein Spinaustausch zwischen ihnen stattfindet. Somit trägt sowohl eine Konzentrationsänderung des Nitroxids als auch eine Konzentrationsänderung des im Perfusat gelösten O_2 multiplikativ zum Signal bei.

Bei ILU-Experimenten mit geschlossenem Kreislaufsystem könnte der pO_2 im Perfusat vom Perfusatvolumen im Verhältnis zur Flussrate, weiterhin von der Beatmungsmethode (positiver oder negativer Druck) und deren Parametern abhängen. Ein weiterer Faktor ist die O_2 -Transportkapazität der Lunge, welche aufgrund der autonomen Regelung des PAP (\rightarrow Kontaktzeit im Kapillargebiet), einem veränderlichen interstitiellen Druck (hypoxieabhängiges Ödem) und letztlich auch der Fluss durch Umgehungskreisläufe (*Shunts*) eine Funktion der Zeit sein kann. Die Dauer der Normoxie/Hypoxie-Phasen liegt bei institutsüblichen 15 bzw. 10 min fest, während das Verhältnis zwischen Perfusatvolumen und Fluss zwischen den verwendeten Tier-

arten variiert. Mit Kaninchenlungen wird bei einem Perfusatvolumen von 350 ml ein Fluss von 150 ml/min angestrebt [172, 195], bei Mauslungen sind es 2 ml ml/min bei einem Perfusatvolumen von 16 ml. Damit dauert eine vollständige Umwälzung bei Experimenten mit Mauslungen acht Minuten, während bei Kaninchenlungen das Perfusatsystem einmal alle zwei Minuten vollständig umgewälzt wird.

Unabhängig von der Frage, ob das in Abs. 3.2.9.1 nahezu perfekt angepasste pharmakokinetische Modell tatsächlich überwiegend O_2 modelliert, sollten die daraus ermittelten Halbwertszeiten zwischen 60 und 200 s (Abb. 3.48a) auch in Beziehung zum Perfusatvolumen stehen.

Unter der Annahme, dass das Modell vornehmlich O_2 spiegelt, stehen diese Halbwertszeiten aber in einigem Gegensatz zu Weissmann et al. 1995, welche an drei PEEP-beatmeten Kaninchenlungen unter Einsatz eines vor der Lunge in den Perfusatzulauf eingeschleiften Oxygenators einen vom pO_2 in den *arteriae pulmonales* unabhängigen pO_2 im von der Lunge abströmenden Perfusat beobachtet hatten, während der Oxygenator den pO_2 im der Lunge zulaufenden Perfusat auf 23 oder 156 mmHg festhielt [172]. Die im aktuellen Experiment berechneten Signalhalbwertszeiten sind aber vereinbar mit Weissmann et al. (2004), deren ILU-Experimente an mit negativem Druck ventilierten Mauslungen im von der Lunge abströmenden Perfusat gemessenen pO_2 Halbwertszeiten von etwa einer Minute ergaben, was sich an ihrer Abb. 2 ablesen lässt [279].

Die funktionelle Eröffnung von *Shunt*-Gefäßen der Lunge, welche üblicherweise als *intrapulmonary arteriovenous anastomoses* (IPAVA) bezeichnet werden, stellt eine schon lange bekannte Reaktion auf ein erhöhtes Herzzeitvolumen dar [374]. Obwohl 1948 an der Lunge erstmals von Prinzmetal beschrieben [375], sind IPAVAs anatomisch noch immer nicht abschließend dargestellt und auch hinsichtlich ihrer physiologischen bzw. pathophysiologischen Relevanz umstritten. Die Diskussion dreht sich vornehmlich um drei Fragen: Ob sie an der Regulation des pulmonal-arteriellen Drucks beteiligt sind, ob sie die Effizienz des Gasaustausches vermindern und ob sie in paradoxe Embolien, also anderweitig unerklärliche, embolisch bedingte Organinfarkte involviert sind, indem sie Mikrothromben oder größere Gasblasen passieren lassen [376]. Bei ILU-Experimenten wurden diese *Shunts* im Gegensatz zu entsprechenden Untersuchungen an lebenden Tieren überwiegend (aber nicht immer) als geschlossen beobachtet. Hinsichtlich dieses Widerspruchs zu ihren eigenen Ergebnissen vermuten Conhaim et al. (2016), dass der negative intrapleurale Druck spontan atmender Tiere die Öffnung der *Shunts* begünstigt [377]. Nach Tremblay (2015) bewirkt die Hypoxie selbst die Öffnung der Anastomosen in Abhängigkeit von der alveolär-arteriellen O_2 -Partialdruckdifferenz, welche üblicherweise als *alveolar to arterial oxygen difference* (AADO₂) bezeichnet wird [374]. Allerdings haben Bates et al. 2017 an isolierten Mauslungen demonstriert, dass der β -Agonist Isoproterenol ebenfalls IPAVAs rekrutiert, so dass ein niedriger pO_2 nicht der einzige Auslöser sein dürfte [378]. Obwohl große *Shunts* im Vergleich zur Kapillardichte als rar angesehen werden, soll bereits ein Anteil von 1-2 % erhebliche Auswirkungen auf den Gasaustausch haben [379]. Hypoxie unter Normaldruck erhöht den

als \dot{Q}_{IPAVA} bezeichneten Fluss durch diese Anastomosen. Bei gesunden Versuchspersonen und einem inspiratorischen $p\text{O}_2$ von 10 % wurde mittels ^{99m}Tc markierter Albuminmakroaggregate ein Anteil von 5 % des Gesamtflusses gemessen [376, 380].

Aus dem Versuch zur Beeinflussung des ESR-Signals durch O_2 lässt sich ablesen (Abb. 3.44C), dass sich die Linienbreite infolge der Umschaltung zwischen 1 % und 21 % der Gasphase um ca. 0,08 G ändert und dabei anfänglich um einen Mittelwert von 2,12 G, später um 2,14 G oszilliert. Der entsprechende Wert zentriert sich im ILU-Versuch anfänglich bei 2,14 G, mit einer hier als Min/Max Distanz verstandenen Amplitude von anfänglich ca. 0,02 G, gegen Ende von 0,01 G.

Weil der Beitrag der CM^\bullet -Konzentrationsänderung zur Linienbreite im Bereich zwischen etwa 20 und 100 μM klein ist (Abb. 3.8f), reflektiert die Linienbreite überwiegend und linear den $p\text{O}_2$ im Perfusat. Somit lässt sich aus den obigen Werten berechnen, dass der mittlere $p\text{O}_2$ im Perfusat anfänglich nahe bei 75 mmHg gelegen und die O_2 -Amplitude anfänglich etwa 37 mmHg, später 17 mmHg betragen haben sollte. Entsprechend oszillierte der $p\text{O}_2$ im Perfusat zwischen ca. 60 mmHg und 90 mmHg, woraus sich schließen liesse, dass die Verhältnisse auf Perfusatsseite über die Dauer dieses Versuchs so hypoxisch waren, als wäre unter idealen Verhältnissen der $p\text{O}_2$ im Gasstrom jeweils zwischen 8 und 12% umgeschaltet worden. Ohne einen Kalibrierungsversuch unter ILU-Bedingungen ist diese Schlussfolgerung jedoch unsicher.

Der ansteigende Trend in den Residuen des *SSasymptOff*-Modells der Spinkonzentration (Abb. 3.44A) kann als Folge der mit der Zeit exponentiell ansteigenden Spinkonzentration gesehen werden, weil die Amplitude der Auslenkungen von der zum jeweiligen Zeitpunkt erreichten Spinkonzentration abhängen (Abb. 3.43A). Aus dem gleichen Grund zeigen die in Abb. 3.47 dargestellten Residuen des pharmakologischen Modells entlang der Phasen ebenfalls noch einen zunehmenden Trend der Amplituden, der anhand der bekannten absoluten Spinkonzentrationen kompensierbar sein sollte. Hinter den aus dem pharmakologischen Modell berechneten Halbwertszeiten in Abb. 3.48a versteckt sich jedoch kein solcher Trend, weil sie aus dem Wert der Rate k in Glg. 3.6 abgeleitet sind und damit in Beziehung zur hier phasenweise wechselnden Transportkapazität für Sauerstoff stehen.

Unter den möglichen Einflussgrößen auf das ESR-Signal steht damit ein veränderlicher O_2 -Partialdruck im aus der Lunge abströmenden Perfusat an vorderster Stelle. Aus der Halbwertszeit der Transienten im ESR-Signal lässt sich eigentlich bereits aus Abb. 3.44A schließen, dass ein Diffusionsmodell für parallel geschaltete Kapillaren den Zusammenhang ohne die Annahme von *Shunts* nicht erfolgreich modellieren kann: Lungenkapillaren haben einen mittleren Durchmesser von 6,5 μm , weshalb für eine nahezu vollständige Aufsättigung oder Auswaschung von O_2 maximal einige zehntel Sekunden vergehen sollten. Tabuchi et al. haben im Mausmodell mittels intravitaler Mikroskopie und multispektraler Oxymetrie zweidimensional die O_2 -Sättigung nahe der Lungenoberfläche abgebildet und eine vollständige Aufsättigung über eine Strecke von

130 μm innerhalb von 100 ms gemessen. Präkapilläre Arteriolen $< 30 \mu\text{m}$ hatten daran einen Anteil von 50 % [381]. In einem Review zur Technik der ESR-Oxymetrie aus 2010 weisen Ahmad und Kuppusamy jedoch darauf hin, dass die dort *Hyperspectral Imaging* genannte Technik ähnlich wie die Infrarotspektroskopie Desoxihämoglobin und Cytochrom *c* wegen überlappender Spektren nicht gut unterscheiden kann [267].

Angesichts der Unsicherheiten erscheint ohne eine unabhängige, direkte Messung des pO_2 zumindest kurz vor dem ESR-Resonator eine weitergehende Analyse oder Modellentwicklung wenig sinnvoll. Zusätzlich oder alternativ sollte ein vor dem Sensor eingeschalteter Degasser die O_2 -Transienten erheblich dämpfen. Weiterhin sind zur Klärung des tatsächlichen Verlaufs des pO_2 im Perfusat O_2 -Sensoren im Zu- und Abstrom der Lunge auch im Hinblick auf ILU-Experimente zur Auswirkung der *Shunts* auf die Oxygenierung von großem Interesse.

Neben der Messung der Partialdrucke fehlt im Versuchsaufbau auch ein Körpersimulator, eine Sauerstoffsенke oder -quelle, welche die Partialdrucke im zuführenden Perfusat auf einem einstellbaren Sollwert festhalten kann. Diese Funktion könnte ein an einen programmierbaren Gas-Controller gekoppelter Oxygenator (Abb. 5.4) übernehmen, der es darüber hinaus auch ermöglichen würde, einen definierten zeitlichen Verlauf zumindest des pO_2 im zuführenden Perfusat vorzugeben.

Eine letzte Modifikation dieses Experiments könnte in der Verwendung von CM^\bullet anstelle des Hydroxylamins bestehen. Da auch das Nitroxid membrangängig ist, würde der exponentiell-asymptotische Anstieg zu Beginn entfallen und damit auch der Aufwand zur Darstellung des eigentlich interessierenden physiologischen Signals sich stark vermindern.

Versuchsaufbau eines ILU-ESR-Experiments mit Oxygenator

Als Fazit für zukünftige ILU-ESR-Experimente zeigt Abb. 5.4 einen möglichen ILU-Versuchsaufbau. Vor der Mauslunge wird ein Oxygenator eingeschleift und mit einem Gas-Controller verbunden, der anhand nachgeschalteter O_2 -, pH- und Temperatursensoren den Partialdruck des Sauerstoffs im der Lunge zufließenden Perfusat regelt und die aktuellen Messwerte aufzeichnet. Ein O_2 -Sensor kurz nach dem linken Ventrikel dient zur Überwachung der Lungenfunktion. Kurz vor dem ESR-Spektrometer, nach dem Degasser wird zusätzlich ein O_2 -Sensor angebracht, welcher den O_2 -Partialdruck aufzeichnet. Mit dessen Daten könnte ein Modell kalibriert werden, welches die nach dem Degasser verbliebenen pO_2 -Druckschwankungen aus dem gemessenen ESR-Signal eliminieren könnte. Davon abgesehen sollte es die Anordnung ermöglichen, definierte O_2 -Profile in den *arteriae pulmonales* vorzugeben.

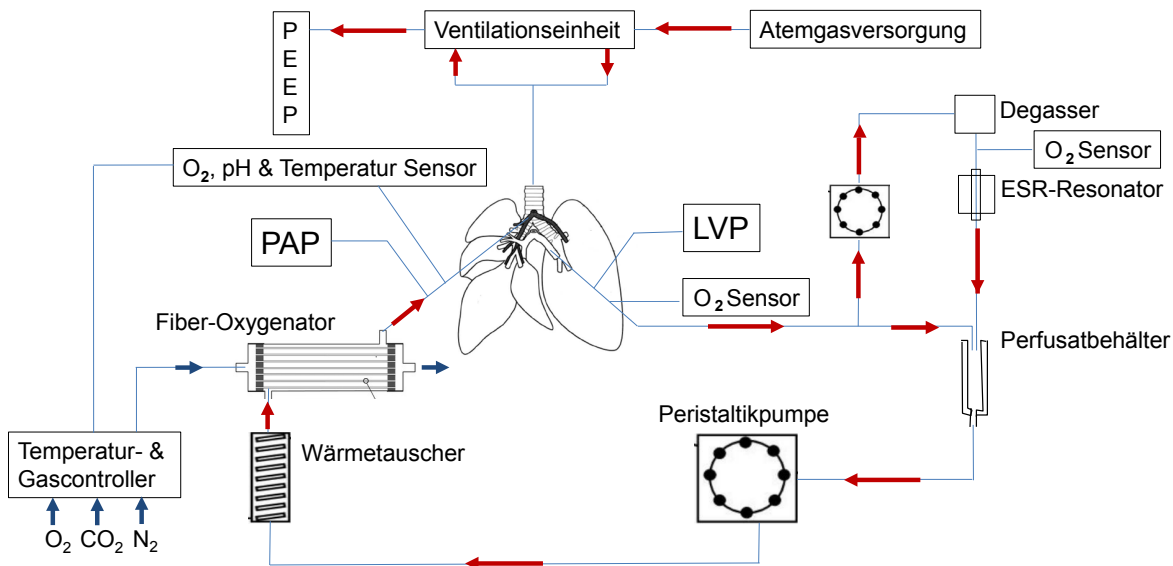


Abbildung 5.4: Schematischer Versuchsaufbau ILU-ESR Experiment mit eingeschleiftem Oxygenator, O₂-Sensoren und Degasser. Die roten Pfeile zeigen die Fließrichtung des Perfusats im System an. Anders als im Schema der Abb. 2.5 dargestellt, wird in den Perfusatzulauf ein Oxygenator eingeschleift, dessen Gaszufuhr hinsichtlich Temperatur, O₂ und CO₂ von einem Steuergerät geregelt wird, welches die Temperatur, den pO₂ und pH des Perfusats aus nachgeschalteten Sensoren bezieht. Im Abstrom wird möglichst nahe am linken Ventrikel nochmals der pO₂ gemessen, um die pO₂-Differenz über der Lunge zu messen. Zwischen Linksherzkatheder und Perfusatbehälter wird ein Teil des Abstroms über einen Degasser geführt, um den Einfluss von Änderungen des pO₂ auf das ESR-Signal zu dämpfen. Direkt vor dem Resonator erfasst ein O₂-Sensor nochmals den pO₂, um eine Grundlage für die Modellierung der verbleibenden O₂-induzierten Signalschwankung zu schaffen. Modifiziert nach Schäfer [228]. Abk.: PAP - pulmonal-arterieller Druck, LVP - linksventrikulärer Druck, PEEP - positiver end-expiratorischer Druck

Wirkung von Vitamin E als Nahrungsmittelzusatz bei Ratten

Die Studie „Einfluss der Vitamin E-Konzentration und des Diätfettes auf die Superoxid-Freisetzung im Leber- und Lungengewebe von Ratten“ (Abs. 3.2.8) wurde mit dem Ziel durchgeführt, den Effekt der Vitamin E-Konzentration auf die ROS-Produktion und das durch Nrf2 regulierte antioxidative System zu untersuchen [273].

Die O₂^{•-}-Konzentrationen im Gewebe wurden mittels ESR-Spektroskopie nachgewiesen. Es wurde die lipophile und membranpermeable *Spin probe* CMH eingesetzt, mit welcher neben O₂^{•-} auch die während der Lipidperoxidation entstehenden Peroxylradikale detektiert werden können [249, 250]. Bei Ratten, die mit Fischöl und der geringsten Vitamin E-Dosis als Nahrungszusatz gefüttert wurden, konnte die höchste O₂^{•-}-Produktion im Leber- wie auch im Lungengewebe nachgewiesen werden. Das Ergebnis mit Bezug zum Lebergewebe ist mit Studien vergleichbar, in denen nachgewiesen werden konnte, dass eine Kombination aus PUFA-reichem Diätfett und einer moderaten Toc-Konzentration die ROS-Produktion verstärkte [382, 383]. Studien, bei denen der Einfluss einer vergleichbaren Supplement-Zusammensetzung auf die ROS-Produktion im Lungengewebe untersucht wurde, sind bislang nicht bekannt. Bei mit Lachsöl gefütterten Tieren zeigte sich eine exponentielle Dosis-Wirkungsbeziehung sowohl im Leber- als auch im Lungengewebe. Der Abfall der O₂^{•-}-Konzentration mit zunehmender Vitamin E-

Konzentration ist gut mit einem Sättigungseffekt vereinbar. Aber auch im Lungengewebe von Ratten, die mit Sojaöl angereicherter Nahrung gefüttert wurden, war ein signifikanter Abfall der $O_2^{\bullet-}$ -Produktion bei den Gruppen, die mit einer moderat oder exzessiv erhöhten TE-Dosis gefüttert wurden, zu beobachten. Im Lebergewebe hingegen war lediglich ein tendenziell erhöhtes ESR-Signal bei der geringsten TE-Konzentration im Vergleich zur moderat und exzessiv erhöhten Dosis nachweisbar. Durch eine weitere Erhöhung der Vitamin E-Dosis in der Nahrung von 250 mg TE/kg auf 2500 mg TE/kg wurde keine weitere Reduktion der $O_2^{\bullet-}$ -Konzentration im Gewebe erreicht. Offensichtlich wurde bei der Kombination Sojaöl und 250 mg TE/kg bereits der maximale Schutz gegen oxidativen Stress in der Leber erreicht.

Entsprechend den Erwartungen war die $O_2^{\bullet-}$ -Produktion in Proben von Ratten, die mit Sojaöl als Diätfett gefüttert wurden im Vergleich zu Lachsöl geringer, da Lachsöl zu höheren Anteilen aus der ω -6-Fettsäure Linolsäure besteht. Interessant war jedoch, dass dies nur für die niedrigste TE-Dosis zutraf. Bei moderat bzw. exzessiv erhöhten TE-Konzentrationen waren keine deutlichen Diätfett-abhängigen Effekte zu beobachten. Möglicherweise war bei 250 mg TE/kg bereits ein maximaler Schutz gegen Lipidperoxidation bei Ratten, die mit Lachsöl gefüttert wurden, erreicht.

Die Abbauprodukte der Linolensäure EPA und DHA weisen mit fünf bzw. sechs Doppelbindungen mehr Doppelbindungen als die ω -3-Fettsäure α -Linolensäure auf, die den Hauptanteil von Sojaöl bildet. Aufgrund der hohen Sensitivität von EPA und DHA gegenüber Peroxidationsprozessen, welche auf deren hohe Anzahl an Doppelbindungen zurückzuführen ist, entsteht ein erhöhter postabsorptiver Vitamin E-Verbrauch und eine geringere Wirksamkeit gleicher Vitamin E-Dosierungen im Vergleich zu α -Linolensäure [26, 276, 384].

Die Leber wurde als Zielorgan der Vitamin E-Studie gewählt, da diese eine hohe metabolische Aktivität aufweist und somit anfälliger für prooxidative Bedingungen und erhöhte ROS-Bildung ist [273]. Außerdem spielt Nrf2 in der Leber bei der Regulation antioxidativer, zytoprotektiver und detoxifizierender Enzyme eine herausragende Rolle [385]. Darüber hinaus wird in diesem Organ die Toc-Konzentration direkt durch die mit der Nahrung aufgenommene Vitamin E-Konzentration beeinflusst, da es dort sowohl gespeichert als auch durch das in der Leber befindliche α -Tocopherol-Transfer-Protein (α -TTP) in den Blutkreislauf transportiert wird [386]. Als Vergleichsorgan wurde Gewebe der Lunge herangezogen, die aufgrund der großen, zum Gasaustausch zwischen Luft und Blut dienenden epithelialen Oberfläche durch oxidativen Stress gefährdet ist. Der pO_2 im Alveolarepithel ist mit ≈ 100 mmHg im Vergleich zu dem in der Leber mit 35-65 mmHg deutlich höher [99, 356, 387]. Um die Redox-Homöostase und damit die normale Lungenfunktion aufrechtzuerhalten, kann jedoch die Lunge zusätzlich antioxidative Enzyme, unter anderem aus der ELF aktivieren. Die Alveolarflüssigkeit enthält große Mengen Glutathion (100-fach höher als im Plasma), das zu 90 % in reduzierter Form vorliegt, sowie Cat, SOD und GPX aber auch Antioxidantien wie Asc und Vitamin E [387, 388].

Überraschend ist das Ergebnis, dass die $O_2^{\bullet-}$ -Konzentration im Lungengewebe gegenüber dem Lebergewebe sechs- bis zehnmal erhöht war. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass aufgrund des hohen pO_2 im Alveolarepithel das prooxidative Potential von Vitamin E ebenfalls erhöht ist. Wird Toc^{\bullet} , aufgrund unzureichender Mengen effektiver Co-Antioxidantien wie Asc, nicht vollständig reduziert, kann das Radikal im Gewebe akkumulieren [149, 152], wodurch es dort zu oxidativen Stress führt. Ein Grund für die niedrige $O_2^{\bullet-}$ -Produktion von Leberzellen ist möglicherweise, dass die Leber das Hauptspeicher- und Kontrollorgan des Vitamin E-Metabolismus ist [152, 389]. Gerade aufgrund der höheren Toc-Konzentration im Vergleich zur Lunge könnte dort eine höhere antioxidative Wirksamkeit erzielt werden. Auch exzessiv erhöhte Toc-Konzentrationen führten nicht zu oxidativen Stress. Ein wesentliches Ergebnis der Studie war, dass eine erhöhte $O_2^{\bullet-}$ -Produktion in der Leber, wie sie bei mit Lachsöl und einer Vitamin E-Dosis von 25 mg TE/kg gefütterten Ratten detektiert wurde, nicht mit einer erhöhten Expression der Nrf2-Zielgene korreliert. Es konnten auch keine Unterschiede in der mRNA- und Protein-Expression wie auch der Enzymaktivität von GPX, SOD1 und Cat im Vergleich zu Ratten, denen Sojaöl und hohe Vitamin E-Konzentrationen (250 mg TE/kg oder 2 500 mg TE/kg) dem Futter beigemischt wurde, nachgewiesen werden [273].

Die durch freie Radikale ausgelöste Lipidperoxidation ist bei der Pathogenese verschiedener Erkrankungen involviert. Unter den natürlichen, exogenen Antioxidantien hat Vitamin E das größte Potential, *in vivo* zu agieren [52, 149, 152]. Niedriger oder moderat erhöhter oxidativer Stress ist jedoch für die Regulation einer Vielzahl physiologischer Prozesse erforderlich. Es wird kontrovers diskutiert, ob exzessive Vitamin-Konzentrationen gesundheitsschädliche Auswirkungen haben können, da dadurch die ROS-Produktion zu stark vermindert und als Folge das ROS/RNS-Signalling gestört oder unterbrochen werden kann [390, 391]. Die Ergebnisse der Studie geben jedoch keinen Hinweis auf einen adversen Effekt einer hohen Vitamin E-Konzentration. Sowohl im Lungen- wie auch Lebergewebe war die $O_2^{\bullet-}$ -Akkumulation bei einer Dosis von 2 500 mg TE/kg geringer als bei 25 mg TE/kg. Außerdem ist anzumerken, dass Vitamin E (und Vitamin C) die physiologische wichtigen Signalmoleküle $O_2^{\bullet-}$ und H_2O_2 nicht effektiv abfangen kann [34], sodass ein schädlicher Effekt bei einem gesunden Individuum wenig wahrscheinlich ist. Um einen direkten Effekt von Vitamin E auf die Lipidperoxidation zu bestimmen, wäre es außerdem sinnvoll, Abbauprodukte wie Malondialdehyd und 4-Hydroxynonenal z. B. mittels Massenspektroskopie (MS) oder Antikörper-basiert mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) nachzuweisen. Zu den derzeit besten verfügbaren Biomarkern für Lipidperoxidation zählen Isoprostane. Sie gehören zu den Eicosanoiden und werden hauptsächlich durch ROS-vermittelte Oxidation aus Arachidonsäure, DHA und EPA gebildet. Entsprechend sollte die Bildung von Isoprostanen in Gegenwart von oxidativen Stress ansteigen [392, 393].

5.2 ROS als potentieller diagnostischer Marker einer schweren Abstoßungsreaktion

Als Referenzmethode oder Goldstandard für die Diagnose einer AR wird derzeit die histopathologische Klassifizierung endoskopisch gewonnener, transbronchialer Lungenbiopsien (TBB) nach ISHLT angesehen. Die TBB ist allerdings eine sehr invasive Methode und birgt eine Vielzahl von Risiken, u. a. Blutungen oder die Entwicklung eines Pneumothorax. Bei schwer kranken Patienten oder infektionsbedingter Verengung der Atemwege wird sie deswegen oft nicht durchgeführt [281, 394]. Darüber hinaus ist die Verlässlichkeit der TBB-Befunde sowohl durch die Qualität des Biopsiematerials als auch durch die hohen Variabilität der histopathologischen Bewertung limitiert. Bei Beurteilung der Histologie des gleichen Präparates durch verschiedene Pathologen zeigt sich eine teils beträchtliche Varianz, die vermutlich auch durch Faktoren bedingt ist, die sich nicht allein auf eine unscharf anmutende Definition der AR-Grade zurückführen lässt. So wurde in einer 2011 publizierten Studie von Arcasoy et al. anhand des Materials der *LARGO*-Studie die histopathologischen Diagnosen von mehr als 1500 lokalen Zentren in Europa, Kanada und den USA durchgeführten Biopsien von einer zentralen Expertengruppe erneut evaluiert [299]. Hierbei zeigten sich sehr unterschiedliche Einschätzungen des Schweregrades. Hinsichtlich der A_0 -Diagnose ergab sich eine Übereinstimmung von 80 %, bei A_1 35 %. Bei Einstufung der AR als A_2 stimmten 60 % der Diagnosen überein. Diese Ausgangslage erschwert die Evaluation jeder alternativen Methode, welche die histopathologische Diagnose von Abstoßungsreaktionen zu prognostizieren versucht, eben weil sich ihre Ergebnisse derzeit einzig an einer teils subjektiven Bewertung der TBB messen können. Jedoch können lokal erhobene histopathologische Befunde auch weit schlechter oder weit besser sein als es Arcasoy et al. nahelegen. Dies einerseits, weil ihre Studie einen erheblichen methodischen Mangel aufweist (Anwendung des Mehrheitsprinzips unter den bewertenden drei Experten anstatt Ausschluss der Proben bei mangelndem Konsens), vor allem aber weil bei Evaluation einer Vielzahl von Pathologen an einer Vielzahl von Zentren das Ergebnis statistisch eine mittlere Qualität reflektieren muss. Die einzige Möglichkeit zur Beurteilung der lokalen Qualität histopathologischer Befunde wäre die verpflichtende Organisation von Ringversuchen, wie sie für klinisch-chemische Labore seit langem üblich sind.

Aufgrund der bekannten Variabilität der Beurteilung der TBB und der großen Heterogenität der Studienpopulation aber auch einer Vergleichbarkeit mit anderen Studien wurde nicht allein auf die ROS- bzw. $O_2^{\bullet-}$ -Konzentration in der BALF als potentiellen diagnostischen Marker fokussiert, sondern zusätzlich die Zusammensetzung der Leukozytenpopulationen, der Hämosiderin-Score und weitere klinische Parameter analysiert.

Nachweis der ROS-Freisetzung von BALF-Leukozyten mittels ESR-Spektroskopie

Der Nachweis der $O_2^{\bullet-}$ -Freisetzung von Leukozyten erfolgte mittels ESR-Spektroskopie nach einer Normalisierung der Zellzahl auf 300 000 Zellen/300 μ l (1×10^6 /ml). Die Festlegung auf diese Zellzahl wurde getroffen, da bei dieser Zellkonzentration sowohl das detektierte ESR-Signal als auch die SNR höher als bei 100 000 Zellen/300 μ l war (Abs. 4.4.1). Bei Regression der gemessenen ROS- bzw. $O_2^{\bullet-}$ -Konzentrationen mit einer Zellzahl von 300 000 Zellen/300 μ l gegen die gemessenen Konzentrationen bei einer Zellzahl von 100 000 Zellen/300 μ l ergab sich ein jeweils hochsignifikanter, linearer Anstieg. Allerdings entsprach der Anstieg der Regressionsgeraden von 1,2x (bei ROS) bzw. 1,1x (bei $O_2^{\bullet-}$) nicht den Erwartungen, da bei einer dreifach erhöhten Zellkonzentration auch ein in etwa dreifach erhöhtes ESR-Signal zu messen sein sollte.

Hypoxie als Ursache dieser Diskrepanz kann aufgrund der offenen Inkubation in nahezu horizontal gestellten Reaktionsgefäßen (große Diffusionsfläche) als ausgeschlossen gelten. Substratmangel wird bei einem Glukosegehalt von 5,6 mM im verwendeten Krebs-Henseleit Puffer (KHB) und einer Inkubationszeit von 90 min als nicht wahrscheinlich angesehen, kann jedoch derzeit auch nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Die Zellkonzentration von maximal 1×10^6 /ml lag jedoch an der unteren Grenze der zur ESR-gestützten Bestimmung der ROS-Freisetzung von anderen Arbeitsgruppen eingesetzten 1×10^6 bzw. 2×10^6 Leukozyten/ml [81, 395]. Dies kann zumindest als Indiz gegen eine durch Substratmangel limitierte Aktivität gewertet werden.

Die Untersuchung eines möglichen Einflusses von Erythrozyten bzw. Erythrozytenfragmenten zeigte keinen Anstieg der $O_2^{\bullet-}$ bzw. ROS-Konzentration in den lysierten Proben im Vergleich zu den unauffälligen oder gering mit Erythrozyten kontaminierten Proben (Abs. 4.4.2). Die Fragestellung ist deshalb relevant, weil Eisenionen des Eisen-Zentrums des Hämoglobinkomplexes Sauerstoffmoleküle binden. Eine Freisetzung der Eisenionen durch Lyse der Erythrozyten könnte zu einer verstärkt ablaufenden Fenton-Reaktion [35, 396] und im Wege des *feed forward*-Prozesses (*ROS induced ROS*) zu erhöhtem $O_2^{\bullet-}$ führen [60–62]. Freie Eisenionen gehören darüber hinaus zu den Übergangsmetallionen, die relativ stabile, ungepaarte Elektronen besitzen und deshalb ESR-aktiv sind. Zudem enthält Vollblut eine Reihe weiterer ESR-aktiver Moleküle. Neben Häm-haltigen Verbindungen zählen die Fe^{3+} -Ionen im Transferrin oder die Cu^{2+} -Ionen des Coeruloplasmins dazu [397, 398]. Sogenannte *low spin*-Häm-Spezies, wozu auch Coeruloplasmin gehört, liegen mit g-Werten von ca. 1,94 bis 2,27 spektroskopisch in der Nähe der von Nitroxiden ($g \approx 2,006$) [399]. Jedenfalls wurde im Kontext einer parallelen Studie bei mit CMH inkubierten, fraktionierten Vollblutproben innerhalb der Erythrozytenfraktion ein vielfach höheres CM^{\bullet} -Signal als im Plasma gemessen (Ergebnisse hier nicht dargestellt). Da bei den hier vorliegenden ESR-Messungen in BALF-Proben keine Änderungen festgestellt wurden, kann damit sowohl ein indirekter Einfluss von freien Eisenionen als Katalysator der Oxidation von H_2O_2 zu dem hochreaktiven $\bullet OH$ als auch ein direkter Einfluss durch Übergangsmetalle auf das ESR-Signal weitgehend ausgeschlossen werden.

Ebenfalls unwahrscheinlich ist ein direkter Einfluss von ursprünglich in der BALF gelösten Zytokinen (u.a. $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, IL-8) [286, 292] sowie Antioxidantien (GSH, Asc) [400, 401] auf die ROS-Produktion während der Inkubationsperiode, weil das Zellmaterial infolge der Verarbeitung im Routinelabor als auch im ESR-Labor letztlich zweimal abzentrifugiert und resuspendiert wurde. Jedoch ist ein indirekter prägender Einfluss von Zytokinen weiterhin denkbar und führt wegen des insignifikanten Befundes in Abb. 4.8 und der dokumentierten Geschlechtsunterschiede zur Hypothese, dass es besondere Subpopulationen innerhalb der Neutrophilen- oder Makrophagenfraktion geben könnte, welche unterschiedliche Sollwerte hinsichtlich der ROS-Erzeugung bzw. der Expression von endogenen Antioxidantien anstreben.

Leukozyten als mögliche ROS-Quelle

Mittels ESR-Spektroskopie konnte bei schweren Abstoßungsreaktionen im Vergleich zu keiner bzw. einer moderaten AR ein hochsignifikanter Anstieg der ROS- und $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Freisetzung beobachtet werden (Abs. 4.4.8). Jedoch konnte zwischen dem Vorliegen einer moderaten AR und negativen TBB-Diagnosen anhand der ROS- bzw. $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Konzentrationen alleine bislang nicht unterschieden werden.

Um einen Hinweis zu erhalten, ob und welche Leukozyten bzw. Leukozytensubpopulation in der BALF hauptsächlich ROS bilden und zu oxidativen Stress im Zusammenhang mit einer schweren AR führen, könnten DHE-Färbungen zum Nachweis von intrazellulären $\text{O}_2^{\bullet-}$ durchgeführt und anschließend fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet werden.

Da ein starker Anstieg der Neutrophilen bei Patienten mit zunehmenden Schweregrad der AR beobachtet wurde und auch in der Literatur als in engem Zusammenhang mit oxidativen Stress stehend betrachtet werden [296, 402], wird der Verdacht bestärkt, dass sie die Hauptquelle der ROS-Produktion in der BALF sind. Die Korrelation zwischen dem Neutrophilenanteil und der ROS- bzw. $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Konzentration war jedoch nur moderat positiv (Abs. 4.4.10), während die Korrelation zwischen den Alveolarmakrophagen (AM) und der ROS- bzw. $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Konzentration moderat negativ war. Dies führt zu dem Gedanken, dass funktionelle Subtypen der Neutrophilen für die ROS-Produktion verantwortlich sind.

Denkbar wäre auch eine Regulation des Redox-Milieus durch eine Interaktion zwischen den Neutrophilen und ihren Mitochondrien als Teil einer Rückkopplungsschleife, deren Sollwert in Abhängigkeit eines Aktivierungszustandes vorgegeben wird. Ein Marker für aktivierte Neutrophile ist das CD14 Antigen. Es dient als Zellrezeptor für Lipopolysaccharid (LPS) und kann indirekt die Freisetzung von IL-1, IL-6, IL-8 und $\text{TNF}\alpha$ auslösen [403]. Entsprechend könnten durch eine FACS-Analyse oder wiederum per Fluoreszenzmikroskopie die Anteile der Subtypen an der Gesamt-Neutrophilenzahl bestimmt und mit dem ROS-Signal korreliert werden. CD14 ist allerdings auch ein Antigen von chronisch aktivierten Alveolar-Makrophagen [404]. Das bedeutet, dass neben CD14 noch ein für Makrophagen und Neutrophile spezifisches Antigen

bestimmt werden sollte.

Daneben könnten auch Wechselwirkungen zwischen zellulären Regulationsprozessen, die an der Aufrechterhaltung der Redox-Homöostase beteiligt sind, von Bedeutung sein. In Abhängigkeit von der ROS-Konzentration werden bekanntlich redox-sensitive Transkriptionsfaktoren wie Nrf2 und NF- κ B aktiviert und sowohl antioxidative als auch prooxidative Targetgene transkribiert [5, 11, 405]. Die Aktivierung beider Transkriptionsfaktoren erfolgt bereits kurze Zeit nach Stimulierung durch ROS, da sie bereits funktionsbereit im Zytoplasma vorliegen. Zur Aktivierung muss lediglich die Bindung mit dem Inhibitor gelöst bzw. verhindert werden. Der Aktivierungszustand der Leukozyten kann mittels anti-I κ B- α AK im Western-Blot nachgewiesen werden. Bei Aktivierung von NF- κ B sollte dessen Inhibitor I κ B weitestgehend degradiert vorliegen und somit kaum nachweisbar sein. Ito et al. konnten zeigen, dass I κ B schon nach wenigen Minuten nicht mehr nachweisbar war, jedoch nach 30 min von neuem erschien, was auf einen autoregulatorischen Rückkopplungsmechanismus schließen ließ [406]. Entsprechend könnte mit Nrf2 und dessen Inhibitor Keap1 verfahren werden. Allerdings ist derzeit kein ausreichend spezifischer, monoklonaler Nrf2 AK verfügbar. Ein Versuch zur Bestimmung der Expression und Aktivität endogener Antioxidantien wie SOD und Cat in Abhängigkeit von der Zellkonzentration und der Expositionszeit sollte zeigen, ob eine quantitativ nahezu perfekte Anpassung der Leukozyten an oxidativen Stress innerhalb der hier gewählten Inkubationszeit von insgesamt 120 min erfolgen kann.

Eine direkte Bestimmung der antioxidativen Enzyme sowie von synthetisierten Antioxidantien wie GSH könnte außer in den aufbereiteten Proben auch direkt in der BALF vorgenommen werden, wobei allerdings der variable Anteil an zurückgewonnener BALF den Verdünnungsfaktor der ELF bestimmt und damit jeder Messwert entsprechend verzerrt wird. Aus diesem Grund haben Baz et al. zwecks Bestimmung der GSH-Konzentration zusätzlich die Harnstoffkonzentration im Plasma und in der BALF gemessen und über deren Konzentrationsverhältnis das Verdünnungsverhältnis von ELF zu BALF berechnet [401]. Rennard et al. hatten zuvor herausgefunden, dass die Harnstoffkonzentration im Plasma und der ELF identisch ist und das Volumen der in der zurückgewonnenen Flüssigkeit enthaltenen ELF bei Anwendung einer auch zeitlich standardisierten BAL-Prozedur unter Laborbedingungen bei $(1,0 \pm 0,1)$ ml ELF je 100 ml BALF lag [407]. Nach Cross et al. werden Asc und GSH in der ELF gegenüber der Plasmakonzentration um einen Faktor 2,5 bzw. 67 angereichert. Bekannt ist auch, dass Raucher ungewöhnlich hohe Konzentrationen an Harnsäure, GSH und Asc in der BALF aufweisen, was bei dieser Gruppe zu einer spirometrisch verringerten Sensitivität gegenüber O₃ beiträgt [400]. Somit bestehen Anhaltspunkte, dass die Bestimmung von Antioxidantien in der BALF im Kontext von ROS-Messungen eine weitere diagnostische Ebene eröffnen könnte, die vielleicht dazu führt, dass zukünftig auch eine moderate AR vom nicht-Bestehen einer AR abgrenzbar wird.

Falls sich im weiteren Verlauf der Studie bestätigen sollte, dass eine AR mit einer erhöh-

ten $O_2^{\bullet-}$ bzw. ROS-Konzentration in engem Zusammenhang steht, so wäre im Rahmen einer Folgeuntersuchung eine therapeutische Anwendung von Antioxidantien denkbar. Nach intravenöser Verabreichung von SOD bei lungentransplantierten Ratten beobachteten Shiraishi et al. eine signifikante Verbesserung des histologischen Abstoßungsgrads [408]. Klinische Therapiestudien zur Anwendung von SOD bei Ltx-Patienten sind jedoch nicht bekannt. Vos et al. untersuchten, ob aufgrund der bekannten immunmodulatorischen Funktion von Vitamin D ein Effekt auf ein positives *Outcome* von Ltx-Patienten nachweisbar ist. In ihrer kürzlich veröffentlichten Studie konnten sie jedoch keinen signifikanten Unterschied zur Plazebobehandlung feststellen [409]. Andere Studien zeigten aber, dass eine Vitamin D-Behandlung zur Verbesserung der Lungenfunktion bei Patienten mit obstruktiven Lungenerkrankungen führte [410]. Allerdings sind bei Lungentransplantaten herztoter Spender im Tierversuch Nitroxide wie *4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidinoxyl* (Tempol) und MCI-186 erfolgreich zur Milderung von Ischämie/Reperfusionsschäden angewandt worden [411, 412].

Erstellung von Referenzbereichen für Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile und Lymphozyten bei lungentransplantierten Patienten

Am Infektionslabor des UKGM erfolgt die Beurteilung des BALF-Zellprofils bislang anhand der für gesunde Nichtraucher gültigen Grenzwerte (Tab. 2.2). Es gibt derzeit noch keine vergleichbaren Werte für stabil lungentransplantierte Patienten, d.h. für Patienten, bei denen weder eine Abstoßung noch eine Infektion diagnostiziert wurde. Aufgrund der in den ROC-Diagrammen in Abb. 4.12 sich abzeichnenden geschlechtsspezifischen Unterschiede und deren Untermauerung in Abs. 4.4.14 wurden auf Basis der erfassten Daten Referenzbereiche für den Anteil der Makrophagen, Neutrophilen, Eosinophilen und Lymphozyten für lungentransplantierte Patienten separat für Männern und Frauen erstellt (Tab. 4.9), auch um eine Vergleichbarkeit zu anderen Studien herzustellen (u. a. Vos et al. [296, 300]). Anhand der Mediane lässt sich nachvollziehen, dass sich bei Frauen jeweils ein deutlicher Unterschied zwischen keiner bzw. einer moderaten Abstoßung und einer schweren Abstoßung bei Neutrophilen, Makrophagen und Eosinophilen abbildet. Bei den Lymphozyten zeichnet sich kein Trend ab. Bei beiden Geschlechtern zeigt sich mit ansteigendem Abstoßungsgrad ein sukzessiver Anstieg der Neutrophilen bzw. Abfall der Makrophagen. Anders als bei weiblichen Patienten werden Eosinophile bei männlichen Patienten nur selten nachgewiesen. Entsprechend liegt der Median dort jeweils nahe Null, was nochmals unterstreicht, dass Eosinophile als Marker einer AR nur bei Frauen und auch dort nur hinsichtlich einer schweren AR tauglich sind. Bei Lymphozyten ist bei Männern ein geringer Aufwärtstrend zu beobachten. Die hier anhand der Studiendaten berechneten Quantile könnten als Anstoß für die Berechnung von UKGM-internen Referenzbereichen für das BALF-Zellprofil bei Ltx-Patienten dienen und sich dort auf eine weit größere Basis stützen.

Analyse der BALF-Charakteristika in Abhängigkeit vom Schweregrad der AR

Eine der im Kontext der Etablierung von im Vergleich zur TBB weniger invasiven Biomarkern¹ für die Diagnose einer AR interessantesten aktuellen Studien wurde von Greenland et al. publiziert [294]. Die US-amerikanische Arbeitsgruppe entwickelte anhand von BALF-Zellprofilen ein *Scoring*-System, wodurch die Diagnose einer AR verbessert und die Abgrenzung zu einer Infektion ermöglicht werden soll. Auf Basis von ≈ 3000 Fällen identifizierten die Autoren vier Hochrisikofaktoren für eine Abstoßung. Dazu zählen Makrophagen $< 75\%$, Eosinophile $> 0\%$, NK-Zellen $< 5\%$ und CD25⁺-T-Zellen $> 8\%$, wobei die Lymphozytenzahl allerdings nur bei ca. 25% der Patienten hoch genug für eine Differenzierung war. Damit ist die klinische Relevanz bei zwei der genannten vier Prädiktoren von vorneherein sehr eingeschränkt. Neben dem durch eine Vielzahl von Prädiktoren bedingtem Rauschen ist dies möglicherweise der Grund dafür, dass sich aus der Greenland-Studie trotz einer zehnfach höheren Fallzahl eine AUC von nur 0.6 für die Validierungskohorte ergab.

Das Ergebnis, dass Makrophagen in der BALF negativ mit dem histopathologischen Grad einer Transplantatabstoßung korrelieren, stimmt gut mit verschiedenen anderen Studien überein [294, 296, 414]. Der mit zunehmenden Abstoßungsgrad verringerte Anteil der AM könnte zunächst mit einer Verdrängung durch eine zunehmende Anzahl an Neutrophilen begründet werden. Es ist aber auch denkbar, dass in das Alveolarlumen auswandernde AM dazu tendieren, bei Vorliegen einer Entzündung im Lungengewebe zu verweilen, da sie dort u. a. in inflammatorische Prozesse, Wundheilung oder Matrixreorganisation involviert sind. Demnach wäre ein geringerer Makrophagenanteil in der BALF auf eine Verschiebung der Gewebespezifität zurückzuführen. So konnten Schmidt et al. unter experimentellen Bedingungen während allogenen Lungentransplantat-Abstoßungen bei Ratten einen Anstieg von AM im Lungenparenchym beobachten [415]. Darüber hinaus unterschieden sie immunohistochemisch zwei verschiedene Aktivierungszustände der AM. Während in gesunden Rattenlungen nahezu ausschließlich CD163⁻ AM vorgefunden wurden, exprimierten AM allogener Transplantate ab dem zweiten postoperativen Tag zunehmend das Antigen CD163, welches als natürlicher „Immunsensor“ und damit ein Marker für inflammatorische AM ist. Ab dem fünften Tag nach Transplantation war dieser Phänotyp stark ausgeprägt [415].

Eine weitere Funktion von AM besteht im Abbau von Erythrozyten, die bei zunehmender Kapillarpermeabilität in das Alveolarlumen ausgetreten. Das mit den Erythrozyten aufgenommene Hämoglobin wird dort in Ferritin und Hämosiderin umgewandelt [416]. Große Mengen von hämosiderinbeladenen AM in der BALF werden als Hinweis auf eine persistierende Blutungs-

¹Bereits eine bronchoskopische Untersuchung ist eine invasive Prozedur, die für den Patienten teils erhebliche Gefahren wie z. B. eine nosokomiale Infektion, eine Blutung oder gar eine Bronchusperforation mit sich bringen kann. Mit der Sedierung des Patienten und einer zusätzlich vorgenommenen BAL sind weitere Risiken verbunden [413]

quelle angesehen, u. a. im Kontext einer Vaskulitis [417]. Durch Abfangen freier Eisenionen und Bindung als Hämosiderin schützen AM das Lungengewebe vor Eisen-katalysiertem oxidativen Eintrag [418, 419]. Somit könnte ein hoher Hämosiderin-Score auch mit Eisen-generierten oxidativen Stress einhergehen und mit einer AR assoziiert sein [418, 419]. Anhand der hier erfassten Daten ergab sich stattdessen ein Abfall bei schweren Abstoßungen (Abb. 4.5 und 4.6). Da ein hoher Hämosiderin-Score als Hinweis auf chronische Entzündungen oder Schädigungen der alveolokapillären Strukturen angesehen wird [419], dürften hohe Werte eher eine chronische Transplantatabstoßung als eine AR anzeigen, was letztlich die Frage nach einer phasenweisen Abfolge aufwirft, nachdem Makrophagen eine Halbwertszeit von einigen Tagen haben. Die Assoziation abnehmender Hämosiderin-Scores mit zunehmenden Schweregrad einer AR führt so zur Hypothese, dass einer schweren AR eine bezüglich Abstoßung eher ruhige Phase vorangegangen sein müsste; eine schwere AR also unvermittelt einsetzt.

Der Anteil der Neutrophilen in der BALF zeigte bei weiblichen Patienten einen hochsignifikanten Anstieg bei Vorliegen einer schweren Abstoßung gegenüber einer moderaten AR bzw. bei nicht-Vorliegen einer AR (Abs. 4.4.9 und 4.4.14). Wie bereits erwähnt, wird ein starker Anstieg der Neutrophilen nicht nur mit einer durch oxidativen Stress ausgelösten oder verstärkten Transplantatabstoßung, sondern auch mit einer Infektion der Lunge in Verbindung gebracht. Eine Neutrophilie $\geq 20\%$ während einer Abstoßungsreaktion ist häufig [286], aber nicht zwingend mit einer Infektion assoziiert [420]. Es gilt darüber hinaus als wahrscheinlich, dass auch klinisch stabile Ltx-Patienten (ohne diagnostizierte Abstoßung oder Infektion) eine geringe abstoßungsbedingte Entzündung der Atemwege aufweisen und die Neutrophilie mit der Entwicklung eines BOS bzw. CLAD in Beziehung steht [286, 404, 421, 422]. Auch bei den in dieser Studie eingeschlossenen Patienten mit einer schweren AR ist eine neutrophile Reaktion zu beobachten. Da am UKGM bei klinischem Verdacht auf eine Infektion weder bronchoskopiert noch biopsiert wird, sollten die zugrundeliegenden zytologischen Daten jedoch nur wenige Infektionsfälle umfassen. Aus diesem Grund und wegen der bekannt geringen Verlässlichkeit von Infektionsdiagnosen unter immunsuppressiver Therapie wurde in dieser Studie bislang keine Unterscheidung zwischen einer AR ohne Vorliegen einer Infektion, einer Infektion ohne Bestehen einer AR und einer AR mit gleichzeitig bestehender Infektion durchgeführt.

Eosinophile waren nur selten in der BALF zu finden. Konnten sie dennoch nachgewiesen werden, was in dieser Studie bei $\approx 10\%$ der Fälle zutraf, bestand ebenfalls der Verdacht auf eine AR (Abs. 4.4.9). Dass eine Assoziation zwischen einem Anstieg der Eosinophilen in der BALF und einer AR besteht, konnte in anderen klinischen Studien ebenfalls gezeigt werden [294–296]. Ein Grund dafür, dass diese Population mit einer AR assoziiert ist, könnte mit der Produktion des zytotoxischen *eosinophil cationic protein* in Verbindung stehen. Durch dieses können das Bindegewebe der Lunge sowie epitheliale und mikrovaskuläre Strukturen geschädigt werden [423, 424]. Entsprechend sollte untersucht werden, ob dieses Protein bei Auftreten von

Eosinophilen tatsächlich in der BALF von Ltx-Patienten nachweisbar ist [425].

In der vorliegenden Studie waren Lymphozyten kein Indikator für eine AR. Es deutete sich lediglich ein schwacher Anstieg mit zunehmender Abstoßung an, der sich auch nur in der A-Klassifikation abbildete (Abb. 4.6). Das Ergebnis steht damit im Gegensatz zu verschiedenen anderen klinischen Studien, die demonstrierten, dass die Anzahl der Lymphozyten mit der Schwere einer AR assoziiert sei [294, 401, 414, 426]. Tikkanen et al. zeigten, dass eine AR innerhalb des ersten Monats nach der Transplantation mit einer Lymphozytose ($\geq 15\%$), später mit einem deutlichen Anstieg der Neutrophilen assoziiert ist [295]. Das BALF-Zellprofil wäre demnach während einer AR in der frühen postoperativen Phase von dem einer AR in einer späteren Phase deutlich verschieden. In der vorliegenden Studie wurde ein möglicher Zeitpunkt-abhängiger Einfluss nicht untersucht. Deswegen kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieser einen Ausschlag auf die Korrelation zwischen der Lymphozytenzahl und einer AR gäbe.

Bei der Differenzierung der Lymphozyten in Subpopulationen zeigte sich jedoch ein tendenzieller Anstieg der B-Zellen und der zytotoxischen T-Zellen ($CD8^+$) sowie ein Abfall der NK-Zellen und der T-Helferzellen ($CD4^+$). Bei $CD4^+$ - und $CD8^+$ -Zellen war der Zusammenhang mit der Schwere einer Abstoßung hauptsächlich bei der B-Klassifikation ausgeprägt. Bei Bewertung einer AR allein nach ISHLT-A, auf welche sich die meisten Studien ausschließlich stützen, wäre dies nicht deutlich geworden. Damit könnte eine lymphozytäre Bronchiolitis ein unabhängiger Risikofaktor für eine AR sein.

Wegen der zelltypspezifischen Assoziation entweder mit einer parenchymalen oder einer bronchialen, mononukleären Entzündung sollten für eine Bewertung des BALF-Zellprofils hinsichtlich einer AR grundsätzlich die Klassifizierung sowohl nach ISHLT-A (1996-2006) als auch ISHLT-B (1996) herangezogen werden. Abgesehen von Vos et al. [296] sind bislang keine Studien bekannt, die beide Klassifikationen einbeziehen, um einen Zusammenhang zwischen dem Zellprofil und einer AR zu demonstrieren. In der vorliegenden Studie sind die Fallzahlen je Untergruppe ($A_0:B_0\dots B_4$ oder $B_0:A_0\dots A_3$, Tab. 4.5) für eine sinnvolle statistische Analyse rein nach ISHLT-A bzw. rein nach ISHLT-B noch zu gering. Die etwa doppelt so hohe Fallzahl hinter der Veröffentlichung von Vos et al. brachte es mit sich, dass auch in den sonst nur spärlich besetzten Gruppen mit höheren Abstoßungsgraden statistisch verwertbare Fallzahlen auftraten (z.B. $n=6$ für $A_0:B_3$ oder $n=13$ für $B_0:A_3$), weshalb sie zeigen konnten, dass eine Neutrophilie in der BALF mit einem ansteigenden B-Grad assoziiert ist, während ein ansteigender A-Grad sowohl mit einer Neutrophilie als auch einer Lymphozytose einhergeht.

In der Klinik und in klinischen Studien wird eine Diagnose oft auch anhand des $CD4^+/CD8^+$ -Quotienten getroffen. Jedoch treten Lymphozyten nur in ca. 25 % der Fälle in einer für die Differenzierung von Subtypen ausreichenden Zahl auf, was die praktische Relevanz darauf gestützter Diagnosen entsprechend reduziert. Dennoch berichten sowohl Tiroke als auch Gregson et al., dass eine Reduktion des Quotienten mit einer AR assoziiert sei [413, 427]. Dagegen

fürte in den von Greenland et al. veröffentlichten Ergebnissen der als gegenläufig beschriebene Trend von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zell-Anteilen bei Bildung des Quotienten zur Auslöschung der innerhalb der Subpopulationen beobachteten statistischen Unterschiede innerhalb der ISHLT-A Klassifikation [294], was auch anhand der hier vorliegenden Daten nachvollzogen werden kann. In Bezug auf die bronchiale, mononukleäre Entzündung war der bei der CD4⁺-Subpopulation sich abzeichnende Trend beim CD4⁺/CD8⁺-Quotienten nur noch schwach erkennbar (Abb. 4.6). Besonders einprägsam lässt sich die Auslöschung der vornehmlich im Anteil der CD4⁺-T-Zellen enthaltenen Information beim Vergleich der Wahrscheinlichkeitsdichten der BALF-Parameter in Abb. B.1 im Anhang nachvollziehen. Auch daran zeigt sich, dass die Verwendung des CD4⁺/CD8⁺-Quotienten zwecks Diagnose einer AR fragwürdig ist. Somit könnte die ärztliche Neigung zur Bildung von Quotienten fehlerbehafteter Messwerte eine Erklärung dafür abgeben, warum die in der Literatur mit Bezug auf die Diagnose einer AR berichteten Ergebnisse teils widersprüchlich sind [294, 414, 428]. Die schlüssigste Erklärung dieser Widersprüche liegt aber in der ebenfalls von Tiroke et al. beschriebenen Komplikation, dass der Anteil an CD4⁺-T-Zellen mit zunehmendem zeitlichen Abstand zur Transplantation sinkt und somit auch der CD4⁺/CD8⁺-Quotient zeitlich veränderlich ist [413]. Hinsichtlich der beobachteten Trends der T-Zellanteile (ohne Unterscheidung in CD4⁺ und CD8⁺) und der NK-Zellanteile gehen die Ergebnisse mit aktuellen Veröffentlichungen konform [294, 427]. Besonders eine niedrige Anzahl an NK-Zellen wurde kürzlich als vielversprechender Marker einer AR identifiziert [294].

Grad der Atemwegsobstruktion als potentieller Marker einer AR

Der Grad der Behinderung des Atemflusses durch die Verengung der Atemwege als Maß der Lungenfunktion wird routinemäßig durch die Bestimmung der FEV₁ ermittelt. Berastegui et al. charakterisierten eine chronische Abstoßungsreaktion durch eine obstruktive und persistent verminderte Lungenfunktion [286]. Vanaudenaerde et al. konnten eine Verringerung der FEV₁ bei Patienten mit einer akuten und chronischen Abstoßungsreaktion, nicht aber bei einer Infektion feststellen [292]. Dieser Sachverhalt konnte in der vorliegenden Studie hinsichtlich einer schweren AR bestätigt werden. Daneben ermöglicht auch die im Rahmen einer BAL zurückgewonnene Flüssigkeitsmenge einen Rückschluss auf das Vorliegen einer Atemwegsobstruktion. Löfdahl et al. beschrieben, dass bei COPD-Patienten der Anteil der zurückgewonnenen BALF negativ mit dem Schweregrad des Emphysems korreliert [429]. Vanaudenaerde et al. zeigten erstmals einen Zusammenhang zwischen einer Abstoßungsreaktion, einem verminderten Volumen zurückgewonnener BALF und einer neutrophilen Entzündung der Lunge [292]. Eine hochsignifikant negative Korrelation zwischen dem Anteil der Neutrophilen und dem zurückgewonnenen Anteil an Lavage-Flüssigkeit zeigt sich auch in den hier zugrunde liegenden Daten ($\rho = -0.287$, $p < 0.001$). Mehr Neutrophile bedeuten also ein durchschnittlich geringeres zurückgewonnenes Volumen.

Ein positiver Zusammenhang besteht zwischen der FEV₁ und dem zurückgewonnenen Anteil an BALF; ein Abfall des Volumens um 10 % (15 ml) entspricht hier einer Reduktion der FEV₁ um 3,4 %. Dieses Ergebnis ist sehr gut mit demjenigen von Vanaudenaerde et al. vereinbar, welche bei Verringerung des BALF-Volumens um 10 % einen Abfall der FEV₁ von 4,4 % ermittelten. Für einen realen Zusammenhang zwischen der Ausprägung einer AR und dem Abfall der BALF-Volumina spricht auch, dass diese Reduktion in den hier zugrundeliegenden Daten mit einer ansteigenden B-Gradierung einherging. Ein sehr indirekter Zusammenhang könnte natürlich darin bestehen, dass bei subjektiv schwerkrank erscheinenden Patienten intuitiv besonders rücksichtsvoll vorgegangen wird. Fachärztlicherseits wird als Grund für die Minderung der zurückgewonnenen Flüssigkeitsmenge ein Bronchiolenkollaps unter Aspiration angenommen. Jedoch erscheint diese Erklärung nicht zwingend, weil in diesem Fall ein verringertes Bronchialvolumen zumindest während der Expirationsphase zum Aufsteigen der Flüssigkeitssäule hin zum im Subsegmentbronchus liegenden Bronchoskop führen müsste. Deshalb ist auch die Möglichkeit zu erwägen, dass bei Vorliegen einer AR mehr Spülflüssigkeit in das geschädigte Lungengewebe diffundiert und deshalb nicht mehr abgesaugt werden kann. Ein Vorher-Nachher Vergleich auf Basis einer hochaufgelösten, auf MRT oder CT gestützten Volumenmessung könnte diese Vermutung beweisen oder widerlegen. Praktisch relevant könnte die Beantwortung dieser Frage in pharmakologischer Hinsicht sein. Jedenfalls wird dem Volumen an zurückgewonnener Flüssigkeit bislang wenig Beachtung zu Teil. Obwohl dieser Messwert durch subjektive Faktoren, interindividuelle Unterschiede und die Praxis einer je nach Untersucher auf 5-10 ml gerundeten Werte stark verrauscht ist, lässt sich anhand der ROC-Diagramme in Abb. 4.11 erkennen, dass das aspirierte BALF-Volumen ein stärkerer Prädiktor als die FEV₁ ist.

Diagnostische Aussagekraft potentieller Prädiktoren

Die O₂^{•-}-Konzentration stellt im Vergleich zu den anderen in die Auswertung einbezogenen klinischen Parametern den stärksten Prädiktor für eine schwere AR dar (Abb. 4.11). Besser erwies sich nur noch eine Kombination mehrerer Parameter (O₂^{•-}, Makrophagen, Eosinophile, zurückgewonnene BALF, Glg. 4.2). Allerdings ist es auch anhand der Kombination dieser Marker bislang nicht gelungen, eine moderate AR vom nicht-Vorliegen einer AR zu unterscheiden.

Geschlechtsabhängige Unterschiede

Weiterhin wird die Interpretation der Ergebnisse dadurch erschwert, dass besonders die O₂^{•-}- und die „Gesamt-ROS“-Konzentration vom Geschlecht des Patienten abhängen. Während sich in Abb. 4.12 mit einer AUC von >0,9 bei männlichen Patienten beide zuvor genannten Messwerte als klare Indikatoren für eine schwere AR herausstellten, war bei weiblichen Patienten O₂^{•-} zwar ein noch brauchbarer, das Gesamt-ROS jedoch kein Prädiktor. Auch bei den Makrophagen, Neutrophilen und Eosinophilen bestand eine teils starke Divergenz. Bei allen drei Leukozytenpo-

pulationen war die AUC bei Frauen etwas höher als bei Männern. Letzteres passt sehr gut zu den in Tab. 4.4.14 dargestellten Ergebnissen, wonach der Anteil an Neutrophilen, Makrophagen und Eosinophilen fast nur bei Frauen signifikante Unterschiede zwischen den AR-Graden aufweisen. Es steht aber im Widerspruch zur weit geringeren ROS-Produktion von aus der BALF weiblicher Patienten gewonnenen Leukozyten. Auffällig ist auch das etwas geringere Risiko weiblicher Patienten, eine AR zu erleiden (Tab. 4.7).

Möglicherweise sind Frauen unter dem Einfluss weiblicher Geschlechtshormone weniger anfällig gegenüber oxidativen Stress. Es ist bekannt, dass Östrogen durch Aktivierung des MAP-Kinase- (*mitogen-activated protein kinase*) und des NF- κ B-Signalweges zu einer Aufregulation endogener Antioxidantien führen und somit vor Entzündungen und Gewebeschädigung schützen kann [430, 431]. Umgekehrt sind Androgene zumindest im Tiermodell mit einem Abfall der Lungenfunktion bei Bleomycin-induzierter pulmonalen Fibrose assoziiert [432]. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass nach LPS-Stimulation männliche gegenüber weiblichen Mäusen eine Überempfindlichkeit der Atemwege, eine höhere Gesamtzahl der Leukozyten, einen erhöhten Anteil an Neutrophilen und einen Anstieg von TNF α in der BALF aufwiesen [433]. Gonadektomie minimierte die beobachteten Geschlechtsunterschiede, welche zuvor auf einen besseren Schutz weiblicher Mäuse gegenüber oxidativen Stress und Infektion des Respirationstraktes schließen ließen [434]. Jedoch kann ein schützender Effekt gegen oxidativen Stress durch Östrogene nur Frauen vor dem Eintreten der Menopause betreffen, deren Eintritt im Datensatz aber nicht enthalten ist. Gemäß Lebensalter befinden sich nur ein Viertel bis ein Drittel der Patientinnen vor der Menopause, weshalb dieser Aspekt einer statistischen Klärung nicht direkt zugänglich ist und auch eine Stratifizierung nach Lebensalter als derzeit nicht sinnvoll erscheint.

Ansatz für ein Vorhersagemodell auf Basis eines Entscheidungsbaums

Eine zentrale Bedeutung der O₂^{•-}-Konzentration für die Diagnose einer schweren AR wird auch durch die Positionierung als Wurzelknoten im derzeit allein zu Zwecken der Anschaulichkeit durch den C5.0-Algorithmus nach Quinlan [244, 435] aus den Daten erzeugten Entscheidungsbaums dargestellt (Abb. 4.14). Aber schon in der nächsten Verzweigung stellen sich überraschenderweise ebenfalls Makrophagen, nicht jedoch Geschlecht oder Neutrophile als starker Prädiktor einer schweren AR dar. Das Ergebnis ist auch deshalb unerwartet, weil vor allem Neutrophile als diejenige Leukozytenfraktion der BALF beschrieben werden, die eng mit einer Transplantatabstoßung assoziiert sei [292, 296, 402, 421]. Andererseits bestätigt diese Wahl wiederum Greenland et al. [294] und die Heuristik in Glg. 4.2, bei der die Einbeziehung von Makrophagen anstelle von Neutrophilen bessere Ergebnisse hinsichtlich der AUC erbrachten. Überraschend ist auch, dass die prozedural bedingt weit streuenden Werte des Anteils an zurückgewonnener BALF in diesem Modell schon bei der dritten Verzweigung als Prädiktor einer schweren AR herangezogen werden.

Es darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass sich ein auf einen Entscheidungsbaum durch rekursive Unterteilung des Datensatzes gründendes Modell einen sehr hohen Datenbedarf hat, weshalb Werte für die Sensitivität und Spezifität und damit auch die Verlässlichkeit dieses Modells derzeit nicht sinnvoll berechnet werden können. Das Problem liegt darin, dass bei Unterteilung in einen Trainings- und Testdatensatz entweder zu wenig repräsentative Trainings- oder zu wenig Testdaten vorliegen und die Berechnung je nach Zufallsauswahl dann entweder abbricht oder die resultierenden Modelle versagen. In dieser Beziehung sind z. B. *gradient boosting* (gbm) - Modelle sehr viel günstiger, aber auch etwas weniger anschaulich.

Stärken und Grenzen

Die vorliegende klinische Studie basiert mit derzeit 78 beteiligten Patienten und mehr als 300 untersuchten BALFs auf einer im Vergleich zu vielen auf diesem Gebiet publizierten Studien hohen Fallzahl, die es erlaubt relevante Prädiktoren einer AR zu identifizieren.

Erstmals wurde eine AR-abhängige ROS- und $O_2^{\bullet-}$ -Produktion durch Leukozyten in der BALF als potentieller Biomarker zur Diagnose einer AR bestimmt. Neu ist auch der Nachweis der reaktiven Spezies mittels ESR-Spektroskopie nach einem speziell für diese Anwendung entwickelten Protokoll. Besonders für die $O_2^{\bullet-}$ -Konzentration wurde eine hohe Vorhersagekraft ermittelt und somit oxidativer Stress als kritischer Einflussfaktor im Verlauf einer schweren AR identifiziert. Ein Vorteil der ROS-Messungen besteht darin, dass die Ergebnisse bereits wenige Stunden nach Durchführung der bronchoalveolären Lavage verfügbar sind. Damit wäre diese Methode deutlich weniger zeit- und arbeitsintensiv als eine histopathologische Diagnose. Da das bioptische Material zunächst langsam in Paraffin eingebettet werden muss, kann erst nach Tagen anhand einer Vielzahl von mikroskopischen Schnitten eine Beurteilung durch einen erfahrenen Pathologen erfolgen.

Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Studie nicht auf einen potenziellen Marker fokussiert, sondern BALF-Charakteristika wie das Zellprofil, der Hämosiderin-Score, der Anteil der zurückgewonnenen BALF und die FEV₁ einbezogen. Ein Grund dafür ist, dass ein komplexer Prozess wie eine Organabstoßung eher nicht anhand eines Parameters beschrieben bzw. beurteilt werden kann, sondern Wechselbeziehungen verschiedener Zelltypen und zellulärer Mechanismen bestehen. Außerdem ist diese Studie eine der Wenigen, die nicht nur die histopathologischen Diagnosen des parenchymalen Gewebes (ISHLT-A Klassifikation), sondern auch der bronchialen, mononukleären Entzündung (ISHLT-B Klassifikation) in die Bewertung einer AR einbezieht, nachdem der mit zunehmenden Schweregrad einer AR einhergehende Trend für CD4⁺-, CD8⁺-, NK-Zellen aber auch der Anteil der zurückgewonnenen BALF besonders oder ausschließlich im bronchialen Gewebe ausgeprägt ist. Außerdem konnte erstmals ein geschlechtsspezifischer Zusammenhang bei der ROS/ $O_2^{\bullet-}$ -Freisetzung von Leukozyten und dem BALF-Zellprofil hinsichtlich einer schweren AR dargestellt werden. Daneben wurden auf Grundlage der vorliegenden

Daten Referenzbereiche für Ltx-Patienten, bei denen weder eine AR noch Infektion vorliegt und Patienten mit einer moderaten oder schweren AR erstellt und nach dem Geschlecht aufgeschlüsselt. Bislang sind an keinem der Transplantationszentren vergleichbare Referenzbereiche bekannt. Die Daten zeigen, dass dem Geschlecht des Patienten hinsichtlich der Diagnose und der Pathomechanismen eine wichtige Bedeutung zukommen könnte.

Trotz der neuen Erkenntnisse unterliegt diese Arbeit einigen teils verbesserungsfähigen Beschränkungen: Die Studie beschränkt sich auf ein Studienzentrum mit Patienten von großer Heterogenität. Obwohl das UKGM mit 15 - 20 Lungentransplantationen pro Jahr zu den mittelgroßen Zentren in Deutschland zählt, sind die Fallzahlen besonders der schweren Abstoßung auch im Hinblick auf die Vielzahl möglicher Einflussfaktoren gering. Neben geschlechtsspezifischen Unterschieden könnte bei ausreichender Datenlage z. B. nach Alter, Ltx-Indikation und Zeitpunkt nach der Transplantation (frühe/ späte postoperative Phase) unterschieden werden.

Ein zentrales Problem besteht auch darin, dass die TBB als einziger Standard zur Etablierung neuer diagnostischer Parameter und Methoden bei schwankender Qualität der Biopsien und einer mangels Ringversuchen unbekanntem Qualität der histopathologischen Klassifizierung mit großen Unsicherheiten behaftet ist. Widersprüchliche Einordnungen lassen sich letztlich nur durch eine longitudinale Beobachtung einzelner Patienten klären, etwa wenn auf eine zunächst negative histopathologische Diagnose und einem gleichzeitig positiven Testergebnis eine klare AR folgt. Auch eine individuell abweichende immunsuppressive Therapie könnte einigen Einfluss haben, insbesondere auf das BALF-Zellprofil. Eine lungengesunde, nicht immunsupprimierte Kontrollgruppe, die in Bezug auf physiologische ROS-Werte hochinteressant wäre, fehlt. Bislang nicht vorgenommen wurde die klinisch schwierige Differenzierung zwischen dem isolierten Bestehen einer AR, einer Infektion bzw. einer AR bei gleichzeitig ablaufender Infektion. Interaktionen zellulärer Prozesse, die Adaptierung an oxidativen Stress durch Expression von endogenen Antioxidantien oder der Aktivierungsstatus von Leukozytensubpopulationen wurde bisher nicht untersucht. Mit Bezug auf die völlig unzureichende Abgrenzung einer moderaten AR vom nicht-Vorliegen einer AR und den asymptotischen Verlauf der Gesamt-ROS-Konzentration bleibt fraglich, ob die Zellkonzentration für die ROS-Bestimmung optimal gewählt ist. Der Verdünnungsfaktor der ELF durch die BALF wird bisher nicht bestimmt. Dies sollte zwar kaum Auswirkung auf die Anteile der Subpopulationen der Leukozyten haben, bringt aber eine wenig genaue Gesamtzellzahl mit sich, die ansonsten sehr wohl Information tragen könnte. Auch beeinträchtigt der fehlende Verdünnungsfaktor z. B. die nachträgliche Bestimmung von Zytokinen aus tiefgefroren eingelagerten Proben. Obwohl mit maximal 60 min relativ wenig Zeit zwischen der Abnahme der BALF, dem Transport in das Infektionslabor und der Vorbereitung der ESR-Proben vergeht, erfolgt der Transport bislang ungekühlt, was sowohl die Qualität der ROS-Messungen als auch eine nachträgliche Zytokinbestimmung beeinträchtigen könnte.

Fazit

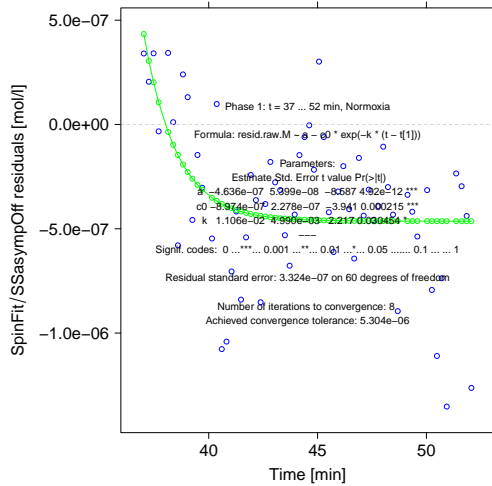
- Die ESR-Spektroskopie ist eine sensitive Methode zum Nachweis von ROS/RNS in *in vitro* Modellen sowie der BAL-Flüssigkeit von lungentransplantierten Patienten.
- Zur Untersuchung der Beziehung zwischen Hypoxie, ROS und HPV wurden hochaufgelöste Zeitreihen mittels ESR-gestützten ILU-Experimenten durchgeführt. Um den physiologischen ROS-Anteil am ESR-Signal zu bestimmen, stellen sich besondere Anforderungen an die Durchführung und Analyse, da das ESR-Signal durch die O₂-Konzentration im Perfusat zu stark beeinflusst wird. Neben der Einschaltung eines *Degassers* in die Probenschleife wird die direkte Messung des pO₂ und eine daran anschließende Modellierung der rein durch wechselnde O₂-Partialdrucke bedingten ESR-Transienten als notwendig angesehen.
- Die Antwort pulmonal-arterieller Zellen auf Hypoxie ist komplex. Abhängig vom Zelltyp, der Zellzahl, Intensität und Dauer der Hypoxieexposition konnte eine ansteigende oder abfallende ROS-Bildung nachgewiesen werden. Unter akuter Hypoxie reagierten MLF auf fallende O₂-Konzentrationen mit einem kontinuierlichen Absinken der O₂^{•-}-Konzentration, während die von mPASMCMC bei 1 % O₂ gegenüber 5, 10, 15 und 21 % O₂ signifikant erhöht war. Mit zunehmender Hypoxiedauer fiel die O₂^{•-}-Produktion jedoch stark ab. Unter chronischer Hypoxie war bei mPASMCMC kaum noch O₂^{•-} nachweisbar.
- Unter Normoxie (21 % O₂) konnte darüber hinaus bei mPASMCMCs eine negative Korrelation zwischen freigesetztem O₂^{•-} und der Zellpassage ($\geq P_1$) festgestellt werden. Ebenfalls negativ zueinander korreliert waren die ermittelten Intensitäten zwischen ESR- und DCFDA-Methode, was auf eine Homöostase zwischen O₂^{•-} und ONOO⁻ auf der einen und H₂O₂ auf der anderen Seite hinweist.
- Im Kontext einer klinischen Studie bei 78 lungentransplantierten Patienten wurde anhand von 238 histopathologisch sowohl nach ISHLT-A als auch ISHLT-B eingestuften Biopsien erstmals die mittels ESR gemessene O₂^{•-}-Konzentration in der BAL-Flüssigkeit als möglicher Biomarker einer akuten Transplantatabstoßung größer gleich A₂ oder B₂ etabliert. Außerdem konnte der Anteil an Neutrophilen und Makrophagen als Prädiktoren einer schweren Abstoßung identifiziert werden. Darüber hinaus ergaben sich signifikante Hinweise auf das Bestehen geschlechtsabhängiger Unterschiede.

Appendices

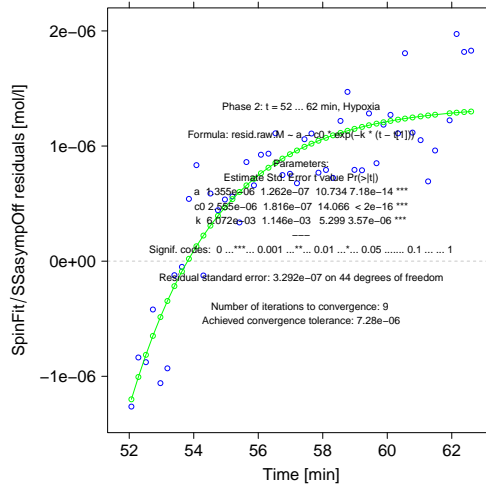
Anhang A

ILU-ESR

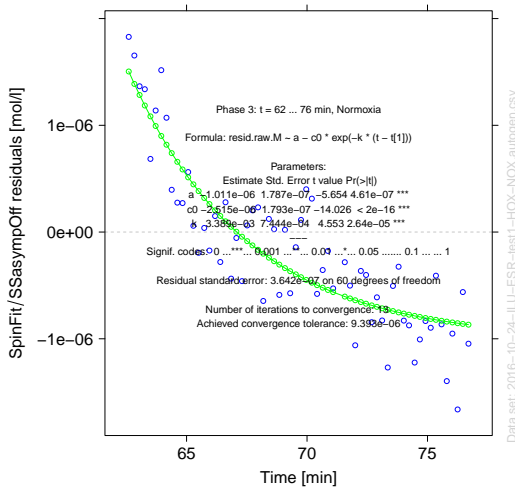
A.1 ILU *nls* Fits für das Bolus-Infusionsmodell



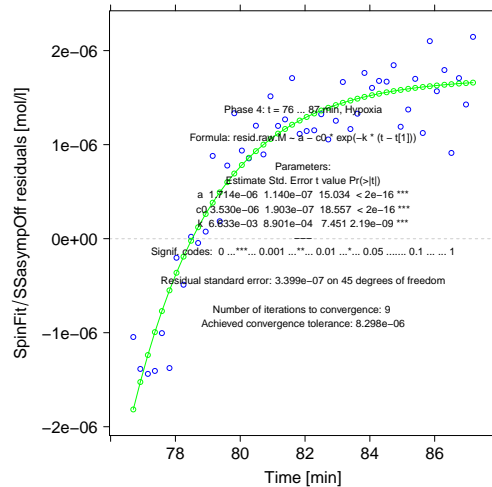
(a) Phase 1 - Normoxie



(b) Phase 2 - Hypoxie

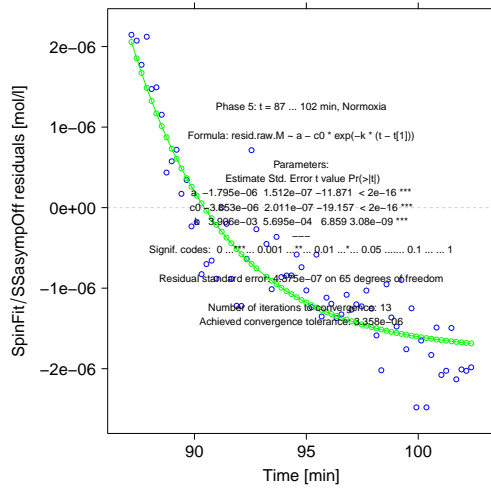


(c) Phase 3 - Normoxie

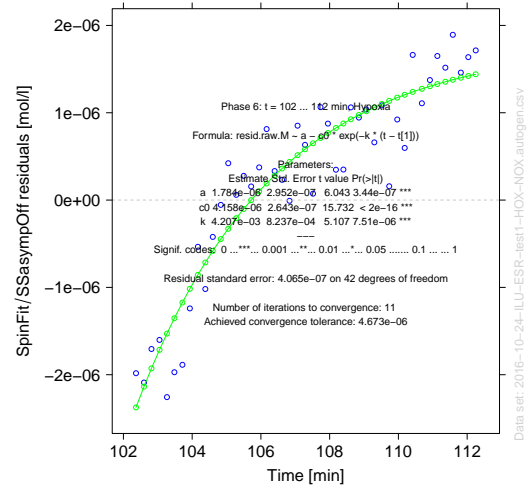


(d) Phase 4 - Hypoxie

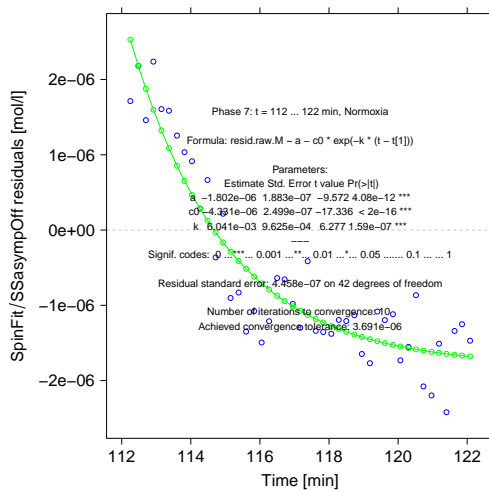
Abbildung A.1: Anpassung eines Bolus-Infusionsmodells an die SpinFit/SSasymptOff-Residuen der Phasen 1 bis 4. Diese Daten liegen hinter den Abbildungen 3.46, 3.48a und 3.48b. Abk. a: Offset zur Nullkonzentration (siehe Abs. 3.6); c0: Substanz bzw. O₂-Konzentration zu Beginn der Phase; k: Geschwindigkeitskonstante der Konzentrationsänderung.



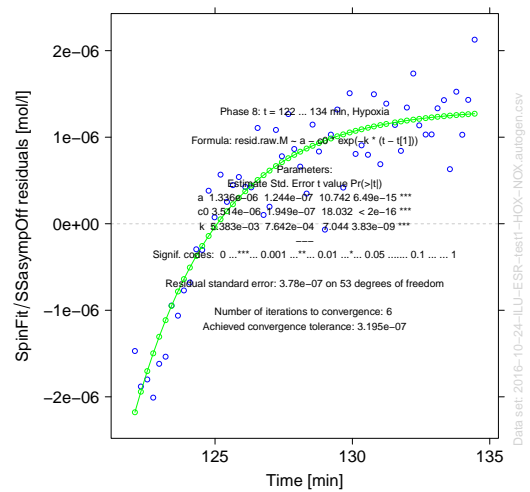
(a) Phase 5 - Normoxie



(b) Phase 6 - Hypoxie



(c) Phase 7 - Normoxie



(d) Phase 8 - Hypoxie

Abbildung A.2: Anpassung eines Bolus-Infusionsmodells an die SpinFit/SSasypOff-Residuen der Phasen 5 bis 8. Diese Daten liegen hinter den Abbildungen 3.46, 3.48a und 3.48b. Abk. a: Offset zur Nullkonzentration (siehe Abs. 3.6); c0: Substanz bzw. O₂-Konzentration zu Beginn der Phase; k: Geschwindigkeitskonstante der Konzentrationsänderung.

Anhang B

Ltx-Studie

B.1 Wahrscheinlichkeitsdichten der BALF-Parameter nach Abstoßungsgrad

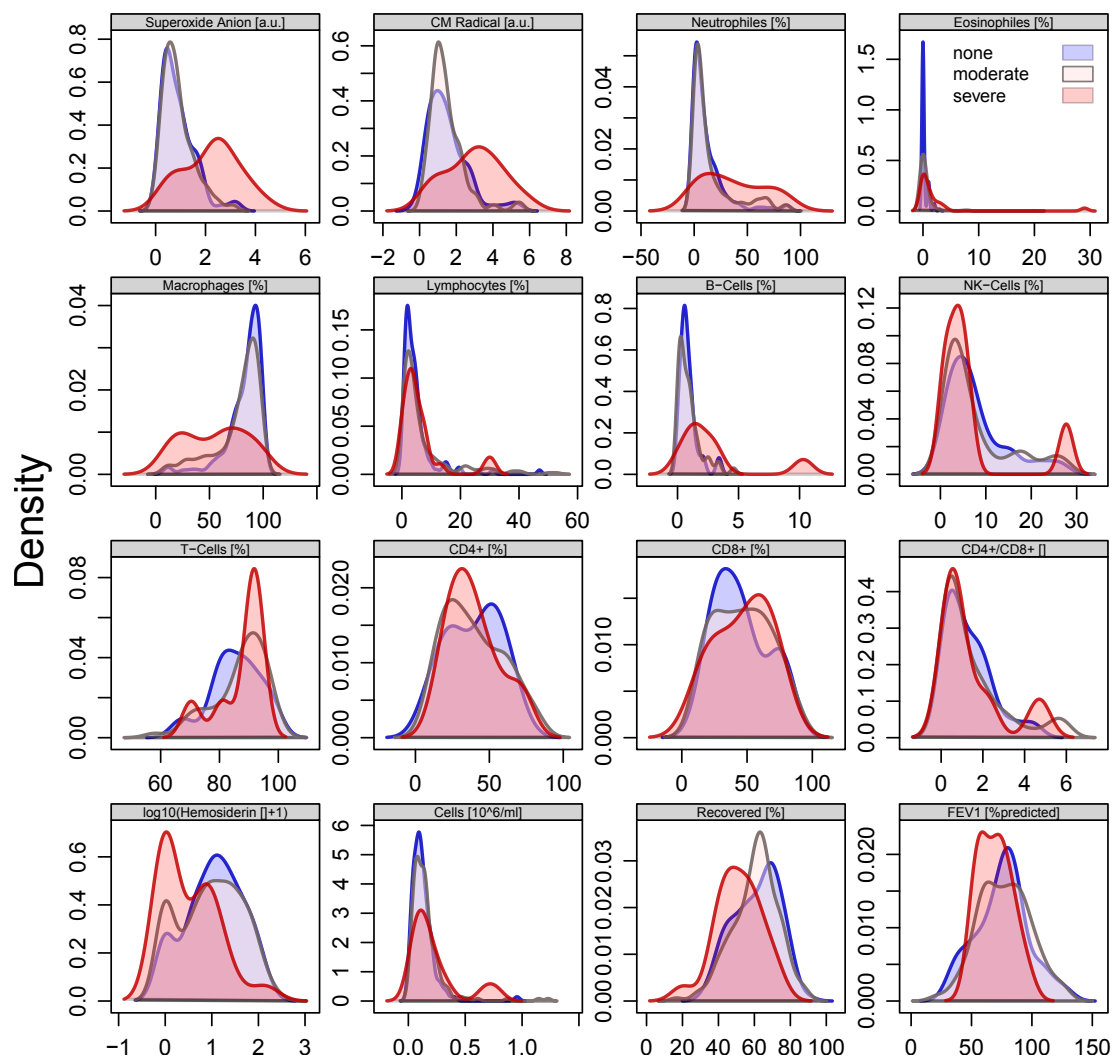


Abbildung B.1: Wahrscheinlichkeitsdichten der BALF-Parameter nach Abstoßungsgrad. CM Radical (CM[•]): ESR-Signal nach Abzug des Hintergrundsignals als Maß für die Summe aus O₂^{•-} und ONOO⁻. x-Achse: Parameter-spezifischer Wertebereich, y-Achse: Density - Wahrscheinlichkeitsdichte. **Legende:** Die Schichtung nach nicht-Bestehen einer AR (none), dem Vorliegen einer moderaten (moderate) oder einer schweren (severe) AR erfolgte gemäß Glg. 4.1.

B.2 Anpassung einer rechts-schiefen Verteilung an den Makrophagenanteil der BALF

Die zur Anpassung der *rskewed* genannten Verteilung an den Makrophagenanteil der BALF verwendbaren R-Funktionen sind in Abs. C.1 dokumentiert.

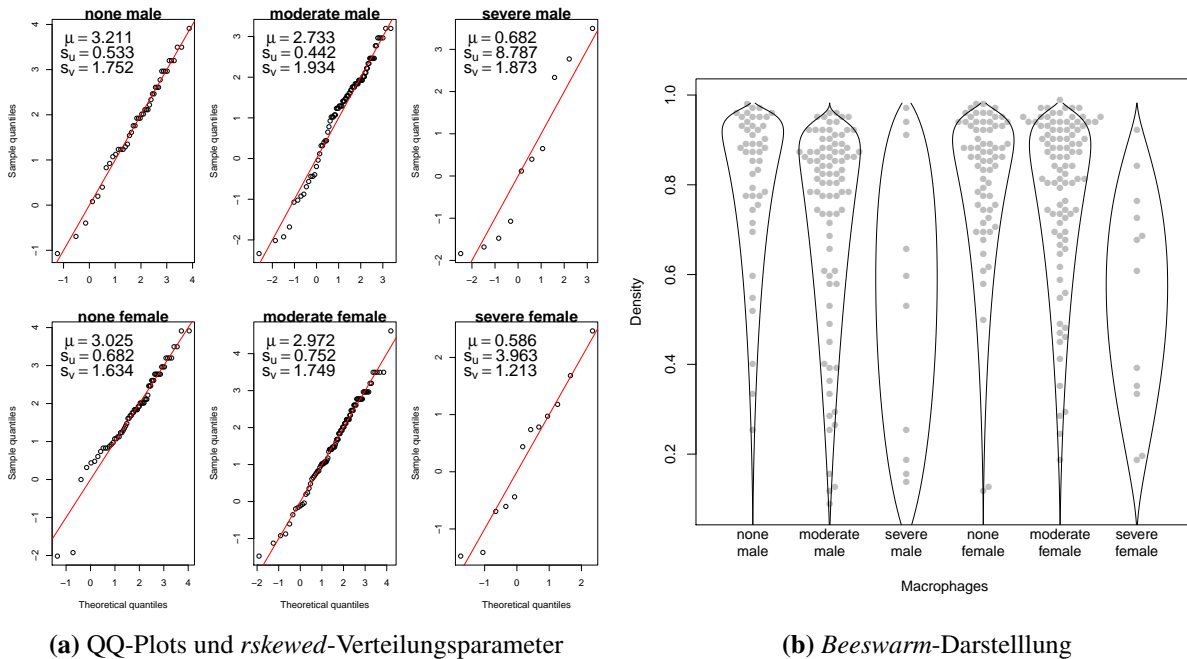


Abbildung B.2: Ergebnis der Anpassung der *rskewed*-Verteilung an den Makrophagenanteil der BALF. Die Schichtung nach nicht-Bestehen einer AR (*none*), dem Vorliegen einer moderaten (*moderate*) oder einer schweren (*severe*) AR erfolgte gemäß Glg. 4.1. (a) QQ-Diagramme und Parameter der Verteilung. *x*-Achse: Theoretische Quantile, *y*-Achse: Quantile der Datenreihe (b) Beeswarm (Bienenschwarm) - Darstellung (grau) mit Einpassung der *rskewed*-Dichtefunktion (schwarze Begrenzungen). Density: Wahrscheinlichkeitsdichte. Fallzahlen aufgeschlüsselt nach Outcome (*none*, *moderate*, *severe*) und Geschlecht (*male*, *female*) werden in Tab. 4.7 gelistet.

Anhang C

R-Funktionen

C.1 Implementierung der *rskewed*-Verteilung in R

```
# density function
drskewed <- function(x, m, su, sv, log=FALSE) {
  y <- log(2)
  - log(sv)
  + dnorm((x-m)/sv, log=TRUE)
  + pnorm((-sv/su)*(x-m)/sv, log=TRUE)
  if (log) y else exp(y)
}

# distribution function
prskewed <- function(x, m, su, sv) {
  sapply(x, function(x)
    integrate( drskewed
               , lower=-Inf, upper=x, m=m, su=su, sv=sv)$value)
}

# quantile function
qrskewed <- function(p, m, su, sv) {
  sapply(p, function(p)
    uniroot( function(x) p-prskewed(x,m,su,sv)
             , interval=m+(su+sv)*c(-3,3))$root)
}

# random deviates
rrskewed <- function(n, m, su, sv) {
  sapply(runif(n), qrskewed, m=m, su=su, sv=sv)
}
```

Anhang D

Material

Geräte

Bezeichnung	Type	Vertrieb
FACS Durchflusszytometer	BD FACS Canto	Becton Dickson, Heidelberg
Zentrifuge (Infektionslabor)	Verifuge 3.0 R	Heraeus Sepatech, Osterode
Zentrifuge	Rotanta 460R	Hettich Lab Technology, Tuttlingen
Mikrozentrifuge	Micro 200R	Hettich Lab Technology, Tuttlingen
Zytozentrifuge	Cytospin 4	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Hypoxiekammer	<i>Hypoxy Glove Box</i>	Coy Laboratory Inc., Michigan, USA
O ₂ Controller	Series 16A	Coy Laboratory Inc., Michigan, USA
CO ₂ Controller	Model AC100	Coy Laboratory Inc., Michigan, USA
Schleuse (Hypoxiekammer)	Series 999	Coy Laboratory Inc., Michigan, USA
Integra Licox CMP Tissue Oxygen Pressure Monitor	SN 2926	GMS, Mielkendorf
pH-Meter	Calimatic, Typ 766	Knick, Berlin
Mikroskop	DMIL	Leica, Wetzlar
<i>Microplate reader</i>	Tecan Infinite M200	Tecan Austria, Grödig, Österreich
ESR Spektrometer	EMXmicro X-Band	Bruker BioSpin, Rheinstetten
Resonator für EMXmicro	ER4119HS	Bruker BioSpin, Rheinstetten
Temperature & Gas Controller	BIO-III	Noxygen Science Transfer, Elzach
Peristaltikpumpe	ISM834A V2.10	Ismatec, Glattbrugg, Schweiz
Beatmungspumpe MiniVent	Typ 845	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
<i>Transducer Amplifier Module</i>		Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Instrumentenverstärker	TAM-A	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Analog-/ Digitalwandler	DT 9800	Data Translation, Bietigheim-Bissingen
Strömungsmesser für Beatmungsgase		Aalborg Instruments, Oranburg, USA
HPLC-Durchlaufentgaser	<i>Degasser</i>	Gynkotec, Germering-Unterpfaffenhofen
Druckaufnehmer (1-fach Set)	Combitrans	B. Braun, Melsungen
Systemkühlung	Frigomix U-1	B. Braun, Melsungen
Wärmeregulator	Thermomix	B. Braun, Melsungen
Wärmetauscher		Herstellung Glasbläser-Werkstatt JLU Gießen
Perfusatbehälter		Herstellung Glasbläser-Werkstatt JLU Gießen
Vergrößerungslupe		Glamox Luxo, Hildesheim
Semi-Dry-Western-Blot-System		Keutz, Reiskirchen
Spannungsgerät für Elektrophorese	EPS 600	Pharmacia Biotech AG, Dübendorf
Spannungsgerät für Western Blot	E835	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Mini-Gelelektrophoreseeinrichtung		Bio-Rad, Hercules, USA
<i>Molecular Imager</i> TM	ChemiDoc TM XRS	Bio-Rad, Hercules, USA
BioSpectrometer	D30	Eppendorf, Hamburg

Spektrophotometer NanoDrop	ND-1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Inkubator	HERAcell 150	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Wärmeschrank		Memmert, Schwabach
Wasserbad		Memmert, Schwabach
Sterilbank	<i>Cellgard Class II</i>	IBS Integra Biosciences, Fernwald
Homogenizer	PRECELLYS R24	PeqLab, Erlangen
Vortexer	MS1 Minishaker IKA	IKA, Staufen
Magnet für <i>Tubes</i>	DynaMag-Spin Magnet	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>Pipetboy</i>		Gilson Inc., Middleton, USA
Pipetten	1 ml, 200 µl, 100 µl, 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße (<i>Tubes</i>)	0,2 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Feinwaage		Mettler Toledo, Gießen
Reinstwasseranlage	Milli Q	Millipore, Schwalbach

Software

Bezeichnung	Version	Vertrieb
BD FACS-Analyse Software	3	Becton Dickson, Heidelberg
Tecan i-control	F1.10.4.0	Tecan, Männedorf, Schweiz
Xenon Control Software	1.6.35	Bruker BioSpin, Rheinstetten
<i>PulmoDyn</i> -Software	1.0.16.9	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
NanoDrop Software	3.7.1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Leica Application Suit	4.5.0	Leica, Wetzlar
Statistiksoftware R	3.3.2	Open Source: www.r-project.org
Image Lab	4.1	Bio-Rad, Hercules, USA
Adobe Illustrator	CC 2015 / 19.0	Adobe Systems, USA

Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Spezifikation	Vertrieb
ESR Quarz-Probenhalter	Dewar	Magnettech, Berlin
AquaX-Kapillarbündel	Bündel aus 4 QuarzglasKapillaren	Bruker BioSpin, Rheinstetten
Probenhalter für Temperature & Gas Controller	# NOX-E.4-TGC-SH-F	Noxygen Science Transfer, Elzach
Kapillarhalter für Temperature & Gas Controller BIO-III	Capillary Holder # NOX-G.2-CH	Noxygen Science Transfer, Elzach
TPX-Kapillare	ID: 1,27 mm; Wandstärke 0,34 µm # NOX-A.8.1-PT	Noxygen Science Transfer, Elzach
50 µl Mikrokapillaren (Glas)	<i>Blaubrand</i> intraMARK, ID ≈ 0.7 mm	Brand, Wertheim
Objektträger mit Mattrand	#02-0013/A45	Langenbrinck, Emmendingen
Pumpenschläuche, Tygon	ID: 1,14 mm	ISMATEC, Wertheim
Pumpenschläuche, Tygon	ID: 0,89 – 2,54 mm	Kalensee, Gießen
Dreiwegehahn (ILU)	Discifix	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Katheter linker Ventrikel (ILU)	gebogenes, hohles Metallröhrchen	eigene Herstellung (A. Erb), JLU, Gießen
Katheter rechter Ventrikel (ILU)	vaskuläre Kanüle mit Korb	eigene Herstellung (A. Erb), JLU, Gießen

Trachealtubus (ILU)	aus 1,2 x 4 mm Einmalkanüle BD Microbalance 3, Heidelberg	eigene Herstellung (A. Erb), JLU, Gießen
PTFE-Schläuche	Polytetrafluorethylen-Schläuche	Postnova Analytics, Landsberg
PVDF-Membran	Polyvenylidendifluorid-Membran	Pall Cooperation, Dreieich
Äußere Glasplatten (Western Blot)		Bio-Rad, Hercules, USA
Innere Glasplatten (Western Blot)		Bio-Rad, Hercules, USA
Gel- und Dummy-Platte		Bio-Rad, Hercules, USA
Zellschaber		Sarstedt, Nümbrecht
35er Zellkulturschale	35 x 10 mm, 8 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
60er Zellkulturschale	60 x 15 mm, 21 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
100er Petrischale	100 x 20 mm, 58 cm ²	BD Falcon, Heidelberg
T25 Zellkulturflaschen	Wachstumsfläche 25 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
T75 Zellkulturflaschen	Wachstumsfläche 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
96-Well Platte, weiß	für Proteinbestimmung	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
96-Well Platte, schwarz	transparenter Boden/ für Fluoreszenzmessungen	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Schraubdeckeltubes	Einfrierröhrchen Cryo.s™	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Falcon Tube	15 ml, dunkel	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Falcon Tube	15 ml, 50 ml	BD Falcon, Heidelberg
Neubauer Zählkammer	Hämozytometer	Optik Labor, Bad Homburg
Geschliffene Deckgläschen	20 x 26 x 0,4 mm	Menzel, Braunschweig
Keramikkügelchen (Ø 1,4 mm)	Zirconium(IV)-oxid <i>Beads</i>	PeqLab, Erlangen
Pasteur-Pipetten	230 mm	VWR, Radnor, USA
Pipettenspitzen		VWR, Radnor, USA
Spritze	1 ml, 10 ml	B. Braun, Melsungen
Sterilfilter	0,22 µm, 0,45 µm	Millipore, Darmstadt
Funnel Starter-Kit	für Cytospin, #3120110	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Antikörper und Immunfluoreszenzreagenzien

Bezeichnung	Spezifikation	Vertrieb
CD3(FITC) CD8(PE) CD45PercP CD4(APC)	BD <i>Multitest</i> [®] , #342417	Becton Dickson, Heidelberg
CD3(FITC) CD16+CD56(PE) CD45(PercP) CD19(APC)	BD <i>Multitest</i> [®] , #342419	Becton Dickson, Heidelberg
CD8(FITC)	#345772	Becton Dickson, Heidelberg
CD45(PercP)	#345809	Becton Dickson, Heidelberg
CD25(PE)	#341011	Becton Dickson, Heidelberg
Anti-β-Aktin	A228	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Anti-SOD1	ab13498	Abcam, Cambridge, UK
Anti-SOD2	ab13533	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Cat	ab16731	Abcam, Cambridge, UK
Meerrettich-Peroxidase	gekoppelte W40B2	Promega, Madison, USA
Anti-Rabbit IgG (H+L)		
Meerrettich-Peroxidase	gekoppelte W40B2	Promega, Madison, USA
Anti-Mouse IgG (H+L)		

Spin probes, Spin traps und Fluoreszenzsonden

Bezeichnung	Spezifikation	Vertrieb
CMH	#NOX-2.1	Noxygen Science Transfer, Elzach
CPH	#NOX-01.1	Noxygen Science Transfer, Elzach
PPH	#NOX-01.1	Noxygen Science Transfer, Elzach
CM•	#NOX-20.1	Noxygen Science Transfer, Elzach
CP•	#NOX-08.1	Noxygen Science Transfer, Elzach
HHTIO	#53928	Sigma-Aldrich, München
BMPO	#ALX 430 141 M010	Enzo Life Science, Lörrach
DEPMPO	#ALX 430 093 M015	Enzo Life Science, Lörrach
KHB	ESR-Puffer, #NOX-07.6.1	Noxygen Science Transfer, Elzach
DHE	Dihydroethidium, #D7008	Sigma-Aldrich, München
kationisches Derivat von DHE (Mito-SOX Red)	Molecular Probes, # M36008	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DCFDA	ab113851	Abcam, Cambridge, UK

Chemikalien

Bezeichnung	Spezifikation	Vertrieb
Natriumchlorid	NaCl, #S7653	Sigma Aldrich, München
Kaliumchlorid	KCl, #P9333	Sigma-Aldrich, München
Kalziumchlorid Dihydrat	CaCl ₂ × 2H ₂ O, #C5080	Sigma-Aldrich, München
Magnesiumsulfat Heptahydrat	MgSO ₄ × 7H ₂ O, #63138	Sigma-Aldrich, München
Peroxinitrit	ONOO ⁻ , #20-107	Sigma-Aldrich, München
β-Mercaptoethanol	β-MeEtHO	Sigma-Aldrich, München
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃ (1 M 8,4 %) für ILU	Serag-Wießner, Naila
Kaliumhydrogencarbonat	KHCO ₃ , #4854.0500	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid	NH ₄ Cl, #1.011145.0000	Merck, Darmstadt
Hydrogenperoxid (30 %)	H ₂ O ₂ , #108597	Merck, Darmstadt
Aceton	CH ₃ COCH ₃ , #100014	Merck, Darmstadt
Salzsäure	HCl (37 %), #4625.1	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumlaurylsulfat	SDS (37 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	C ₂ H ₆ O	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol (Molekularbiologie)	CH ₄ O	SAV Liquid Production, Flintbach
Deionisiertes Wasser	dH ₂ O	Milliporanlage Labor, Gießen
Doppelt destilliertes Wasser	ddH ₂ O, #W4502	Sigma-Aldrich, München
Einfach destilliertes Wasser	Aqua dest.	B. Braun, Melsungen
Isotonische NaCl-Lösung (0,9 %)		B. Braun, Melsungen
SOD	#S9697	Sigma-Aldrich, München
pSOD	#S9549	Sigma-Aldrich, München
Cat	#C1345	Sigma-Aldrich, München
pCat	#C4963	Sigma-Aldrich, München
Meerrettich-Peroxidase	HRP, #77332	Sigma-Aldrich, München
p-Acetamidophenol	CH ₃ CONHC ₆ H ₄ OH #A7085	Sigma-Aldrich, München
Deferoxamin	Deferoxamine Mesylate Salz, #D9533	Sigma-Aldrich, München
DETC	Silber Diethyldithiocarbamat, #D3132	Sigma-Aldrich, München
Na-Orthovanadat	200 mM	Sigma-Aldrich, München
Titriplex III	#108418	Merck, Darmstadt

May-Grünwald Färbelösung		Merck, Darmstadt
Giemsa Färbelösung		Merck, Darmstadt
Trypanblau (0,4 %)	#T8154	Sigma-Aldrich, München
10x Trypsin		Omega Scientific, Tarzana, Kanada
Ethylendiamintetraacetat	EDTA	Sigma-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid	DMSO, #D2650	Sigma-Aldrich, München
Glukose		Sigma-Aldrich, München
Glycin	Cellpure, ≥99 %	Carl Roth, Karlsruhe
Heparin	Heparin-Natrium-5 000- <i>ratiopharm</i>	Ratiopharm, Ulm
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ketaminhydrochlorid	100 mg/mL	Bela-Pharm, Vechta
Ketamin	10 %ig	Deutschland
TEMED	Tetramethylethyldiamin	Carl Roth, Karlsruhe
TRIS-HCl	TRIS Hydrochlorid, #9090.3	Carl Roth, Karlsruhe
TRIS-BASE		Carl Roth, Karlsruhe
Xylazin	Xylazinhydrochlorid (2 %)	Ceva Tiergesundheit, Düsseldorf
Magermilchpulver		Sigma-Aldrich, München
Acrylamid	Rotiphorese Gel 30, 30 %	Serva, Heidelberg
Zelllyse-Puffer (10x)		Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
BSA	Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich, München
Ammoniumpersulfat	APS	Sigma-Aldrich, München
Phenylmethylsulfonylfluorid	PMSF, 100 mM	Sigma-Aldrich, München
Polysorbat 20	Tween 20	Sigma Aldrich, München
Protease-Inhibitor-Cocktail	<i>cOmplet</i> , EDTA frei	Sigma Aldrich, München
Bradford Protein Assay		Bio-Rad, Hercules, USA
Amersham ECL Prime	Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
Precision Plus Protein Standard		Bio-Rad, Hercules, USA
RIPA Lysis Buffer		Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Elektrolytlösung	Elektrolyt N II	Serag-Wiessner, Naila
Hydroxyethylstärke	HES, 200000/0,5	Sigma-Aldrich, München
Flüssigstickstoff		Linde, München
Argon	Prüfgas (100 %)	Linde, München
O ₂	Prüfgas (100 %)	Linde, München
CO ₂	Prüfgas (100 %)	Linde, München
Hypoxisches Gasgemisch	1,0 % O ₂ , 5,3 % CO ₂ , Rest N ₂	Linde, München
Normoxisches Gasgemisch	21,0 % O ₂ , 5,3 % CO ₂ , Rest N ₂	Linde, München

Zellen, Maus- und Rattenlinien

Bezeichnung	Spezifikation	Vertrieb
C57BL/6J (Wildtyp Mausstamm)	Zellisolierung mPASC, ILU	Charles River Laboratories, Sulzfeld
<i>Sprague-Dawley Outbred</i> Ratten	Fütterungsversuch Vitamin E	Harlan Winkelmann, Borcheln
WT MLF		AG Prof. H. von Melchner, Abteilung für Molekulare Hämatologie, Universitätsklinikum Frankfurt/Main
Nrf2-KO MLF	Nrf2-defiziente, murine Lungenfibroblasten	AG Prof. H. von Melchner, Abteilung für Molekulare Hämatologie, Universitätsklinikum Frankfurt/Main
CMT 167-Zelllinie	murine Epithelzelllinie, Lungenkarzinom	Sigma-Aldrich, München

Zellkulturmedien und Zusätze

Bezeichnung	Spezifikation	Vertrieb
Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung	DPBS, ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Pan-Biotech, Aidenbach
Dulbecco's modifiziertes <i>Eagle's</i> Medium	DMEM mit Nährstoffmix F12 und Glutamin, Medium für MLF, #41965	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA
RPMI-1640	Medium für Leukozyten, #11875-093	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Waymouth's Medium 752/1	Medium für CMT167, #11220035	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
SMC Basal Medium	Medium für PASC	PromoCell, Heidelberg
SMC <i>Growth</i> Medium 2	Medium für PASC	PromoCell, Heidelberg
SMC <i>Growth</i> Medium 2 Supplement Mix	Medium für PASC	PromoCell, Heidelberg
Medium 199	M199	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA
Fetales Kälberserum	<i>Fetal Calf Serum</i> , FCS	PAA Laboratories, Cölbe
Fetales bovines Serum	<i>Fetal Bovine Serum</i> , FBS	Sigma-Aldrich, München
Penicillin/Streptomycin	100 U/ml Pen 100 µg/ml Strep	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
Ampicilin	Ampicilin Natrium Salz, #A8351	Sigma-Aldrich, München
Doxycyclin	#D3447	Sigma-Aldrich, München
Geneticin		Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA
Normocin		Invivo-Gen, Toulouse, Frankreich

Zusammensetzung Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Substanz	Menge
HEPES Ringer Lösung (0,2 M)	KCl	8,36 g
	CaCl ₂	6,468 g
	Glukose	43,6 g
	HEPES	47,6 g
	NaCl	159,4 g
	MgCl ₂	4,066 g
	dH ₂ O, pH 7,4, 37°C	1 000 ml
Trypsin, 1X	Trypsin (10X)	12 ml
	Hepes Ringer Lösung (0,2 M)	12 ml
	0,9 % NaCl	96 ml
Zelllyse-Puffer, 1X	dH ₂ O	900 µl
	10X Zelllyse-Puffer	100 µl
	PMSF	0,1 %

Lysepuffer für Gewebe	Ripa-Puffer	1 000 µl
	Protease-Inhibitor-Cocktail	40 µl
	Na-Orthovanadat	5 µl
	PMSF	1 µl
Erythrozyten-Lyse-Puffer (10X, pH 7,4)	NH ₄ Cl	82,6 g
	KHCO ₃	10,0 g
	Titriplex III	0,42 g
	DPBS	1 000 ml
Laufpuffer (Laemmli), 10X	Tris-BASE	60,56 g
	Glycin	288 g
	SDS	288 g
	dH ₂ O	2 000 ml
Laufpuffer, 1X	Laufpuffer, 10X	100 ml
	dH ₂ O	900 ml
TAE-Puffer, 50X	Tris-BASE	121 g
	Essigsäure	28,6 g
	0,5 M EDTA-Lösung	50 ml
	dH ₂ O, pH 8,0	500 ml
TBS-Puffer, 10X, pH 7,5	Tris-BASE, 0,2 M	24,23g
	NaCl; 1,5 M	87,66g
	dH ₂ O	1 000ml
TBST, 1X, pH 7,5	TBS-Puffer, 10X	100 ml
	dH ₂ O	900 ml
	Tween 20	1 ml
Transfer Puffer	0,05 M Tris	11,6 g
	0,04 M Glycin	5,8 g
	SDS, 0,37 %ig	3,7 ml
	Methanol	400 ml
	dH ₂ O	1 596,3 ml
Stripping-Lösung	Aqua dest.	90 ml
	Glycin	0,75 g
	37 %ige HCl	1 ml
Tris-Puffer (1,5 M)	Tris-BASE	36,35 g
	dH ₂ O	200 ml

Tabelle D.9: Zusammensetzung Puffer und Lösungen

Perfusionslösung ILU

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Konzentration [mM]
NaCl	58,44	120,00
KCl	74,55	4,30
MgCl ₂	95,21	1,30
CaCl ₂	110,98	2,40
KH ₂ PO ₄	136,10	1,10
Glukose-Monohydrat	180,16	13,32

Tabelle D.10: Zusammensetzung Perfusionslösung für ILU

Die Substanzen (Tab. D.10) werden in einfach destillierten Wasser gelöst und 5 % Hydroxyethylstärke zugegeben. Um einen für den Versuch notwendigen pH-Wert von 7,2 bis 7,4 zu erhalten und zu stabilisieren, werden 97,80 ml Perfusionslösung mit 2,2 ml NaHCO₃ (1 M 8,4 %) versetzt und mit CO₂ begast.

Krebs-Henseleit Puffer (KHB)

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Konzentration [mM]
NaCl	58,44	99,00
KCl	74,55	4,69
CaCl ₂ × 2H ₂ O	147,02	2,50
MgSO ₄ × 7H ₂ O	246,48	1,20
NaHCO ₃	84,01	25,00
KH ₂ PO ₄	136,10	1,03
Glukose	180,20	5,60
HEPES	260,30	20,00
DETC	256,14	0,005
Deferoxamin	560,68	0,025

Tabelle D.11: Zusammensetzung Krebs-Henseleit Puffer

Die Substanzen (Tab. D.11) werden in ddH₂O gelöst und steril gefiltert (0,22 µm Sterilfilter, Millipore, Darmstadt). Danach werden 25 µM Deferoxamin und 5 µM DETC zugefügt. Vor jedem Gebrauch wird der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

Polyacrylamid-Gele

Substanz	5 % Sammelgel	8 % Trenngel	12 % Trenngel
Aqua dest.	5,7 ml	4,7 ml	3,4 ml
30 % Acrylamid	1,7 ml	2,7 ml	4,0 ml
Tris-Puffer (1,5 M)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
10 % SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
10 % APS	5 μ l	5 μ l	5 μ l
TEMED	1 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l

Tabelle D.12: Zusammensetzung eines 5%-igen Sammelgels sowie eines 8%-igen und 12%-igen Trenngels

Abkürzungen

$^1\text{O}_2$	Singulett- Sauerstoff
4-HNE	4-Hydroxynonenal
8-OxodG	8-Oxo-2-Deoxyguanosin
8-OxoG	8-Oxoguanin
AADO ₂	<i>alveolar to arterial oxygen difference</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
AM	Alveolarmakrophagen
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
AOX	Alternative Oxidase
APC	Allophycocyanin
AquaX	Handelsbezeichnung der Bruker BioSpin GmbH für ein monolithisches Bündel aus vier Quarzglaskapillaren
AR	<i>acute rejection</i>
ARE	<i>antioxidant response element</i>
Arg	L-Arginin
Asc	Ascorbinsäure
Asc [•]	Ascorbylradikal
ATII	alveolären Typ II-Epithelzellen
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>Area Under Curve</i>
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BALF	bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit
BES ^{3T}	Bruker Datenformat
BMPO	5-tert-butoxycarbonyl 5-methyl-1-pyrroline N-oxide
bNOS	bakterielle NO-Synthase
BOS	Bronchiolitis obliterans Syndrom
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium
Cat	Katalase
Ce	Cer
CF	<i>Cystische Fibrose</i>
cGMP	3',5'-Guanosinmonophosphat
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CI	<i>Confidence Intervall</i> (Konfidenzintervall)
CLAD	<i>chronic lung allograft dysfunction</i>
CM [•]	3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethyl-pyrrolidine-1-oxyl
CMH	<i>1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethyl-pyrrolidine</i>
CMT	<i>C57BL/1crf-a^t mouse lung carcinoma metastasis</i>
CO ₂	Kohlendioxid
CO ₃ ^{•-}	Carbonatradikal-Anion
COPD	<i>Chronic Obstructive Pulmonary Disease</i>
CP [•]	3-carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-pyrrolidin-1-oxyl
CPH	<i>1-hydroxy-3-carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-pyrrolidine</i>
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie

Cu²⁺	Zweiwertiges Kupferion
Cul3	<i>Cullin 3 protein</i>
Cu/ZnSOD	zytosolische SOD
cw	<i>continuous wave</i>
dB	Dezibel
DCF	<i>Dichlorofluorescein</i>
DCFDA	<i>2',7'-Dichlorofluorescein Diacetat</i>
DEPMPO	<i>5-diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline N-oxide</i>
DETC	<i>Diethyldithiocarbamic acid silver salt</i>
d. h.	das heißt
DHA	<i>docosahexaenoic acid</i>
DHE	<i>Dihydroethidium</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DMPO	<i>5,5-Dimethyl-1-pyrroline-N-oxide, 2,2-Dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole 1-oxide</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
DPLD	<i>Diffuse Parenchymal Lung Disease</i>
DRKS	Deutsche Register Klinischer Studien
.DSC	BES ³ T Datensatzbeschreibungsdatei
DUOX1/2	duale Oxidase 1 und 2
ECCPS	Excellence Cluster Cardio-Pulmonary System
EDRF	<i>endothelium-derived relaxing factor</i>
ELF	<i>epithelial lining fluid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EMARG	<i>electron microscope autoradiography</i>
ENDOR	<i>electron nuclear double resonance</i> (Elektron-Kern-Doppelresonanz)
eng.	englisch
eNOS	endotheliale NO-Synthase
EPA	<i>icosapentaenoic acid</i>
EPR	<i>electron paramagnetic resonance</i>
EPRI	<i>electron paramagnetic resonance imaging</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESR	<i>Electron Spin Resonance</i>
et al.	und andere (<i>et alia</i>)
ETC	<i>electron transport chain</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FADH	oxidierte Form von FAD
FADH₂	reduzierte Form von FAD
FasL	Fas-Ligand
Fcγ R	Immunoglobulin-γ-Fc-Rezeptor
Fe³⁺	Dreiwertiges Eisenion
FeSOD	pflanzliche SOD
FEV₁	<i>forced expiratory volume in one-second</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
FPF	<i>false positive fraction</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
G	Gauß (10 ⁻⁴ Tesla)
gbm	<i>gradient boosting model</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
ggf.	gegebenenfalls
GHz	Gigahertz
glm	<i>generalized linear model</i>
GPX	Glutathion-Peroxidase
GR	Glutathion-Reduktase
GSH	reduzierte Sulfhydryl-Form von Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid oder oxidierte Form von Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferasen
HepG2	<i>liver hepatocellular carcinoma cells</i>

HF	Hochfrequenz
HHTIO	<i>4-Hydrazonomethyl-1-hydroxy-2,2,5,5-tetramethyl-3-imidazoline-3-oxide</i>
HIB	Haemophilus influenzae Typ B
HIF-1α	<i>hypoxia inducible factor-1α</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HO-1	Hämoxigenase 1
HO₂•	Hydroperoxyradikal
HOCl	hypochlorige Säure
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i>
HPV	hypoxische pulmonale Vasokonstriktion
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
Id	Identifikationsnummer
ID	Innendurchmesser
IFNγ	γ -Interferon
IL	Interleukin
ILU	isolierte, ventilierte und perfundierte Mauslunge
IMS	mitochondrialer Intermembranraum
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IPAVA	<i>intrapulmonary arteriovenous anastomoses</i>
IPL	<i>isolated perfused lung</i>
ISHLT	<i>International Society for Heart and Lung Transplantation</i>
ISHLT-A	ISHLT-A (1996+2006)
ISHLT-B	ISHLT-B (1996)
ISHLT-BR	ISHLT-BR (2006)
JC-1	<i>5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine</i>
JLU	Justus-Liebig-Universität Gießen
kDa	Kilodalton
Keap1	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KHB	Krebs-Henseleit Puffer
kHz	Kilohertz
KO	<i>knock out</i>
kPa	kilo-Pascal
L•	Lipidradikal
LAS	Lungenallokations- Scores
LC-MS	Liquid chromatography–mass spectrometry
LDL	<i>Low-density Lipoprotein</i>
LMARG	<i>light microscope autoradiography</i>
L-NAME	L-N ^G -Nitroarginine methyl ester
LOO•	Lipidperoxyradikal
LOOH	Lipidperoxid
LPS	Lipopolysaccharid
Ltx	Lungentransplantation
LVP	<i>left ventricular pressure</i>
m	Meter
M	Mol/Liter
MCPROXYL	<i>3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethyl-pyrrolidine-1-oxyl</i>
MDA	Malondialdehyd
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
min	Minuten
MitoSOX	kationisches Derivat von DHE
MitoSOX Red	kationisches Derivat von DHE
MitoTEMPO-H	<i>1-hydroxy-4-[2-triphenylphosphonio-acetamido]-2,2,6,6-tetramethylpiperidine</i>
ml	Milliliter
MLF	murine Lungenfibroblasten
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
$\Delta\Psi_m$	mitochondriales Membranpotential
MnSOD	mitochondriale SOD

mPASC	<i>murine pulmonary arterial smooth muscle cells</i>
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Massenspektroskopie
ms	Millisekunden
mtDNA	mitochondriale DNA
mtROS	mitochondriales ROS
MW	Mikrowellen
mW	Milliwatt
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	reduzierte Form von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NADPH	reduzierte Form von NADP
Newton	Abgeleitete SI-Einheit der Kraft: 1 kg·m/s ²
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells</i>
NK	Natürliche Killerzellen
nls	<i>nonlinear least square</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Kernspinresonanz)
nNOS	neuronaler NO-Synthase
•NO	Stickstoffmonoxid
NO₂⁻	Nitrit
NOS	NO-Synthasen
NOX	NADPH-Oxidase
NQO1	NADPH-Quinon-Oxidoreductase-1
NQO2	NRH-Quinon-Oxidoreductase-2
Nrf2	<i>nuclear factor E2-related factor 2</i>
O₃	Ozon
o. g.	oben genannt
ONOOH	Peroxosalpetersäure
P2P	<i>Peak-to-Peak</i>
PA	Pulmonalarterien
PAP	<i>pulmonal arterial pressure</i>
p-AP	p-Acetamidophenol
Pascal	Abgeleitete SI-Einheit des Drucks: 1 Newton/m ²
PASC	<i>pulmonary arterial smooth muscle cells</i>
pCat	Katalase Polyethylenglycol
Pdgfrβ	<i>Platelet-derived Growth Factor Receptor β</i>
PE	Phycocyanin
PEEP	positiver end-expiratorischer Druck
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PercP	Peridinin-Chlorophyll
PH	pulmonale Hypertonie
pH	negativer Logarithmus der Wasserstoff-Ionenkonzentration
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
pO₂	Sauerstoffpartialdruck
POD	Peroxidase
PP•	Radikalform von PPH
PPH	<i>1-hydroxy-4-phosphono-oxy-2,2,6,6-tetramethyl-piperidine</i>
Prx	Peroxiredoxin
P	Zellpassage
pSOD	Superoxid-Dismutase Polyethylen-glycol
PTFE	Polytetrafluorethylen
PUFA	<i>polyunsaturated fatty acids</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVR	<i>pulmonary vascular resistance</i>
Q	Ubiquinon
QH•	Semiubiquinon
QH₂	Ubiquinol

\dot{Q}_{IPAVA}	Fluss in IPAVA Shunts
QQ-Plot	<i>quantile-quantile Plot</i>
Redox	Reduktion-Oxidation
RIPA	Radioimmunopräzipitationsassaypuffer (<i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>)
RNS	<i>reactive nitrogen species</i>
ROC	<i>Receiver-Operating-Characteristic</i>
roGFP	redox-sensitive Variante des GFP
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Zellkulturmedium für Leukozyten, <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDSL	<i>site-specific Spin label</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SI	<i>Système international d'unités</i>
SMC	glatte Muskelzellen
SNR	<i>Signal to Noise Ratio</i>
SOD	Superoxid-Dismutase
SOD1	zytosolische SOD, Cu/ZnSOD
SOD2	mitochondriale SOD, MnSOD
<i>SpinFit</i>	Bruker-spezifische Bezeichnung für die Anpassung eines theoretischen Modells an ein Spektrum
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
<i>SSasympOff</i>	<i>self-starting, asymptotic model with offset</i>
SSC	<i>side scatter</i>
Tb	Terbium
TBB	transbronchiale Biopsie
TBST	<i>Tris-buffered saline Tween20</i>
Tc	Technetium
TE	α -Tocopherol-Equivalente
Tempol	<i>4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidinoxyl</i>
TEMPONE-H	<i>1-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-oxo-piperidine</i>
TLR4	<i>toll-like receptor 4</i>
TNF	<i>true negative fraction</i>
TNF α	Tumor-Nekrosefaktor α
Toc	α - <i>Tocopherol</i>
Toc \bullet	Tocopheryl-Radikal
TPF	<i>true positive fraction</i>
TPL	<i>4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidinoxyl</i>
TPL $^+$	Oxoammonium-Kation von TPL
TPL-H	<i>4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-N-hydroxypiperidine</i>
TPO	<i>2,2,6,6-tetramethyl-piperidin-1-oxyl</i>
TPP $^+$	Triphenylphosphonium
TPX	Polymethylpenten
Trx	Thioredoxin
u. a.	unter anderem
UKGM	Universitätsklinikum Gießen und Marburg
μm	Mikrometer
u. U.	unter Umständen
UV	ultraviolette Strahlung
v. a.	vor allem
VDAC	<i>voltage-dependent anion channel</i>
VSMC	vaskuläre glatte Muskelzellen
WT	Wildtyp
<i>Xenon</i>	Bezeichnung des Kontrollprogramms der Bruker Arbeitstation
z. B.	zum Beispiel

Literaturverzeichnis

- [1] Griending, K et al. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20:2175–2183, 2000.
- [2] Sies, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol*, 11:613–619, 2017.
- [3] Radi, R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(12):4003–4008, 2004.
- [4] Finkel, T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol*, 194:7–15, 2011.
- [5] Niture, S, Khatri, R, and Jaiswal, A. Regulation of Nrf2 – An update. *Free Radic Biol Med*, 66, 2014.
- [6] Zhu, H et al. Antioxidants and phase 2 enzymes in macrophages: regulation by Nrf2 signaling and protection against oxidative and electrophilic stress. *Exp Biol Med (Maywood)*, 233(4):463–474, 2008.
- [7] Daijo, H et al. Cigarette smoke reversibly activates hypoxia-inducible factor 1 in a reactive oxygen species-dependent manner. *Sci Rep*, 6, 2016.
- [8] Forsythe, J et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*, 16(9):4604–4613, 1996.
- [9] Köhler, H et al. Involvement of reactive oxygen species in TNF-alpha mediated activation of the transcription factor NF-kappaB in canine dermal fibroblasts. *Vet Immunol Immunopathol*, 71(2):125–142, 1999.
- [10] Ponnappan, U. Regulation of transcription factor NFkappa B in immune senescence. *Front Biosci*, 1:D152–D168, 1998.
- [11] Gloire, G, Legrand-Poels, S, and Piette, J. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol*, 72(11):1493–1505, 2006.

- [12] Finkel, T and Holbrook, N. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408:239–247, 2000.
- [13] Finkel, T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Op Cell Biol*, 15:247–254, 2003.
- [14] Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82(1): 47–95, 2002.
- [15] Doughan, A and SI, D. Mitochondrial redox cycling of mitoquinone leads to superoxide production and cellular apoptosis. *Antioxid Redox Signal*, 9:1825–1836, 2007.
- [16] Wallace, D. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet*, 39:359–407, 2005.
- [17] Cunningham, J et al. Elevated plasma ceruloplasmin in insulin-dependent diabetes mellitus: evidence for increased oxidative stress as a variable complication. *Metabolism*, 44(8):996–999, 1995.
- [18] Mann, G et al. Nrf2/ARE regulated antioxidant gene expression in endothelial and smooth muscle cells in oxidative stress: implications for atherosclerosis and preeclampsia. *Sheng Li Xue Bao*, 59(2):117–127, 2007.
- [19] Niki, E. Do free radicals play causal role in atherosclerosis? Low density lipoprotein oxidation and vitamin E revisited. *J Clin Biochem Nutr*, 48(1):3–7, 2010.
- [20] Mitsuishi, Y et al. The Keap1-Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism. *Front Oncol*, 200, 2012.
- [21] Yan, M, Wang, X, and Zhu, X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radic Biol Med*, 62:90–101, 2013.
- [22] Clempus, R and Griending, K. Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*, 71:216–225, 2006.
- [23] Sylvester, J et al. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Physiol Rev*, 92:367–520, 2012.
- [24] Lee, I and Yang, C. Role of NADPH oxidase/ ROS in pro-inflammatory mediators-induced airway and pulmonary diseases. *Biochem Pharmacol*, 84(5):581–590, 2012.
- [25] Ghouleh, A et al. Oxidases and peroxidases in cardiovascular and lung disease: new concepts in reactive oxygen species signaling. *Free Radic Biol Med*, 51:1271–1288, 2011.
- [26] Halliwell, B and Gutteridge, J. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*, 219(1):1–14, 1984.

- [27] Halliwell, B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiol*, 141(2):312–322, 2006.
- [28] Brown, D and Griending, K. Nox proteins in signal transduction. *Free Radic Biol Med*, 47(1):1239–1253, 2009.
- [29] Kalyanaraman, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol*, 1:244–257, 2013.
- [30] Ayala, A, Munoz, M, and Argüelles, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev*, page 360438, 2014.
- [31] Tanabe, K, Ito, T, and Nishimoto, S. Radiolytic Reduction Characteristics of Artificial Oligodeoxynucleotides Possessing 2-Oxoalkyl Group or Disulfide Bonds. *J Nucleic Acids*, 2011.
- [32] Scandalios, J. Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. *Plant Physiol*, 101(1):7–12, 1993.
- [33] Turrens, J. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *J Biosci Rep*, 17(1):3–8, 1997.
- [34] Niki, E. Do antioxidants impair signaling by reactive oxygen species and lipid oxidation products? *FEBS Lett*, 586(21):3767–3770, 2012.
- [35] Liochev, S. The mechanism of ‘Fenton-like’ reactions and their importance for biological systems. A biologist’s view. *Metal Ions Biol*, 36:1–39, 1999.
- [36] Pryor, W and Squadrito, G. The chemistry of peroxynitrite: A product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol*, 268:L699–L722, 1995.
- [37] Forman, H, Maiorino, M, and Ursini, F. Signaling Functions of Reactive Oxygen Species. *Biochemistry*, 49(5):835–842, 2010.
- [38] Bienert, G et al. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J Biol Chem*, 282:1183–1192, 2007.
- [39] Wojtaszek, P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J*, 322(3):681–692, 1997.
- [40] Kehrer, J. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149(1): 43–50, 2000.

- [41] Knowles, R and Moncada, S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*, 298(2): 249–258, 1994.
- [42] Ghofrani, H et al. Nitric oxide pathway and phosphodiesterase inhibitors in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 43:68s–72s, 2004.
- [43] Ignarro, L et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 84(24):9265–9269, 1987.
- [44] Mathew, R et al. Role of cGMP mechanisms in response of rat pulmonary arteries to hypoxia. *Am J Physiol*, 263:H141–146, 1992.
- [45] Beavo, J and Brunton, L. Cyclic nucleotide research - still expanding after half a century. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3:710–718, 2002.
- [46] Davignon, J and Ganz, P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*, 109:III27–32, 2004.
- [47] Antl, M et al. IRAG mediates NO/cGMP-dependent inhibition of platelet aggregation and thrombus formation. *Blood*, 109(2):552–559, 2004.
- [48] Moncada, S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *J R Soc Med*, 92: 164–169, 1999.
- [49] Förstermann, U and Sessa, W. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*, 33(7):829–837, 2012.
- [50] Szabo, C et al. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 6(8):661–680, 2007.
- [51] Romero, N, Denicola, A, and Radi, R. Red blood cells in the metabolism of nitric oxide-derived peroxynitrite. *IUBMB Life*, 58(10):572–580, 2006.
- [52] Forman, H, Ursini, F, and Maiorino, M. An overview of mechanisms of redox signaling. *J Mol Cell Cardiol*, pages 2–9, 2014.
- [53] Kuzkaya, N et al. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, 278: 22546–22554, 2005.
- [54] Pall, M. Nitric oxide synthase partial uncoupling as a key switching mechanism for the NO/ONOO- cycle. *Med Hypotheses*, 69:821–825, 2007.

- [55] Pall, M. The NO-ONOO-Cycle as the Central Cause of Heart Failure. *Int J Mol Sci*, 14: 22274–22330, 2013.
- [56] Ushio-Fukai, M. Compartmentalization of redox signaling through NADPH oxidase-derived ROS. *Antioxid Redox Signal*, 11(6):1289–1299, 2009.
- [57] Sies, H et al. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *J Biol Chem*, 272:27812–27817, 1997.
- [58] Romero, N and Radi, R. Hemoglobin and red blood cells as tools for studying peroxynitrite biochemistry. *Methods Enzymol*, 396:229–245, 2005.
- [59] Griendling, K, Sorescu, D, and Ushio-Fukai, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*, 86:494–501, 2000.
- [60] Dikalov, S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med*, 51:1289–1301, 2011.
- [61] Brandes, R. Triggering mitochondrial radical release: a new function for NADPH oxidases. *Hypertension*, 45(5):847–848, 2005.
- [62] Schulz, E et al. Mitochondrial redox signaling: Interaction of mitochondrial reactive oxygen species with other sources of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 20(2): 308–324, 2012.
- [63] Han, D et al. Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol Chem*, 278(8):5557–5563, 2003.
- [64] Sies, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*, 4(C): 180–183, 2015.
- [65] Fridovich, I. Mitochondria: are they the seat of senescence? *Aging Cell*, 3:13–16, 2004.
- [66] Krölller-Schön, S et al. Molecular mechanisms of the crosstalk between mitochondria and NADPH oxidase through reactive oxygen species—studies in white blood cells and in animal models. *Antioxid Redox Signal*, 20(2):247–266, 2014.
- [67] Dikalov, S et al. Mitochondrial reactive oxygen species and calcium uptake regulate activation of phagocytic NADPH oxidase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 302: R1134–R1142, 2012.
- [68] Zinkevich, N and Gutterman, D. ROS-induced ROS release in vascular biology: redox-redox signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301:H647–H653, 2011.

- [69] Frey, R, Ushio-Fukai, M, and Malik, A. NADPH oxidase-dependent signaling in endothelial cells: role in physiology and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal*, 11(4):791–810, 2009.
- [70] Bedard, K and Krause, K.-H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev*, 87:245–313, 2007.
- [71] Streeter, J et al. Opportunity nox: the future of NADPH oxidases as therapeutic targets in cardiovascular disease. *Cardiovasc Ther*, 31(3):125–137, 2013.
- [72] Dikalov, S et al. Distinct Roles of Nox1 and Nox4 in Basal and Angiotensin II-Stimulated Superoxide and Hydrogen Peroxide Production. *Free Radic Biol Med*, 45:1340–1351, 2008.
- [73] Drummond, G et al. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*, 10(6):453–471, 2011.
- [74] Luxen, S et al. Heterodimerization controls localization of Duox-DuoxA NADPH oxidases in airway cells. *J Cell Sci*, 122:1238–1247, 2009.
- [75] Kato, M et al. The ROS-generating oxidase Nox1 is required for epithelial restitution following colitis. *Exp Anim*, 65(3):197–205, 2016.
- [76] Kim, M et al. Dual oxidase 2 in lung epithelia is essential for hyperoxia-induced acute lung injury in mice. *Antioxid Redox Signal*, 21(13):1803–1818, 2014.
- [77] Touyz, R et al. NOX isoforms and reactive oxygen species in vascular health. *Mol Interv*, 11(1):27–35, 2011.
- [78] Görlach, A et al. A gp91phox Containing NADPH Oxidase Selectively Expressed in Endothelial Cells Is a Major Source of Oxygen Radical Generation in the Arterial Wall. *Circ Res*, 87:26–32, 2000.
- [79] Quinn, M, Ammons, M, and De Leo, F. The expanding role of NADPH oxidases in health and disease: no longer just agents of death and destruction. *Clin Sci (Lond)*, 111:1–20, 2006.
- [80] Nauseef, W. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev*, 219:88–102, 2007.
- [81] Wyche, K et al. C242T *CYBA* Polymorphism of the NADPH Oxidase Is Associated With Reduced Respiratory Burst in Human Neutrophils. *Hypertension*, 43:1246–1251, 2004.

- [82] Banfi, B et al. NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J Biol Chem*, 276:46065–46072, 2004.
- [83] Cooney, S, Zhao, Y, and KR, B. Characterization of the expression and inflammatory activity of NADPH oxidase after spinal cord injury. *Free Radic Res*, 48:929–939, 2014.
- [84] Zhang, X et al. Toll-like receptor 4 deficiency causes pulmonary emphysema. *J Clin Invest*, 116(11):3050–3059, 2006.
- [85] Hirschhäuser, C et al. NOX4 in Mitochondria: Yeast Two-Hybrid-Based Interaction with Complex I Without Relevance for Basal Reactive Oxygen Species? *Antioxid Redox Signal*, 23(14):1106–1112, 2011.
- [86] Ahmad, M et al. Roles for Nox4 in the contractile response of bovine pulmonary arteries to hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 298:H1879–H1888, 2010.
- [87] Nisimoto, Y et al. Nox4: A Hydrogen Peroxide-Generating Oxygen Sensor. *Biochemistry*, 53(31):5111–5120, 2014.
- [88] Diebold, I et al. The NADPH Oxidase Subunit NOX4 Is a New Target Gene of the Hypoxia-inducible Factor-1. *Mol Biol Cell*, 21(12):2087–2096, 2010.
- [89] Pendyala, S et al. Nrf2 regulates hyperoxia-induced Nox4 expression in human lung endothelium: identification of functional antioxidant response elements on the Nox4 promoter. *Free Radic Biol Med*, 50(12):1749–1759, 2011.
- [90] Lu, X et al. PPAR γ regulates hypoxia-induced Nox4 expression in human pulmonary artery smooth muscle cells through NF- κ B. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 299:L559–L566, 2010.
- [91] Ismail, S et al. NOX4 mediates hypoxia-induced proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells: the role of autocrine production of transforming growth factor-beta1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 296:L489–499, 2009.
- [92] Deliri, H and McNamara, C. Nox 4 regulation of vascular smooth muscle cell differentiation marker gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27:12–14, 2007.
- [93] Aguirre, J and Lambeth, J. Nox enzymes from fungus to fly to fish and what they tell us about Nox function in mammals. *Free Radic Biol Med*, 49(9):1342–1353, 2010.
- [94] Cadenas, E and Davies, K. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*, 29:222–230, 2000.

- [95] Dröse, S and Brandt, U. The mechanism of mitochondrial superoxide production by the cytochrome bc₁ complex. *J Biol Chem*, 283(31):21649–21654, 2008.
- [96] Smith, R et al. Mitochondrial pharmacology. *Trends Pharmacol Sci*, 33:341–352, 2012.
- [97] Ide, T et al. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res*, 85(4):357–363, 1999.
- [98] Turrens, J. Mitochondrial formation of reactive oxygen. *J Physiol*, 552:335–344, 2003.
- [99] Ward, J. Oxygen sensors in context. *Biochim Biophys Acta*, 1777:1–14, 2008.
- [100] Quinlan, C et al. Mitochondrial Complex II Can Generate Reactive Oxygen Species at High Rates in Both the Forward and Reverse Reactions. *JBC*, 32:27255–27264, 2012.
- [101] Choi, W et al. Mitochondrial complex I inhibition is not required for dopaminergic neuron death induced by rotenone, MPP+, or paraquat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(39):15136–15141, 2008.
- [102] Cadenas, E. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH–ubiquinone reductase and ubiquinol–cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Biophys*, 180:248–257, 1977.
- [103] Forman, H and Kennedy, J. Superoxide production and electron transport in mitochondrial oxidation of dihydroorotic acid. *J Biol Chem*, 250:4322–4326, 1975.
- [104] Waypa, G and Schumacker, P. Role for mitochondrial reactive oxygen species in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Novartis Found Symp*, 272:176–192, 2006.
- [105] Ginnan, R et al. Regulation of smooth muscle by inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase in vascular proliferative diseases. *Free Radic Biol Med*, 44(7):1221–1245, 2008.
- [106] Keswani, S et al. Nitric oxide prevents axonal degeneration by inducing HIF-1-dependent expression of erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108:4986–4990, 2011.
- [107] Ortiz, P and Garvin, J. Cardiovascular and renal control in NOS-deficient mouse models. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 284(3):R628–638, 2003.
- [108] Kone, B and Baylis, C. Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 272:F561–F578, 1997.
- [109] Gusarov, I and Nudler, E. NO-mediated cytoprotection: Instant adaptation to oxidative stress in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*, 102(39):13855–13860, 2005.

- [110] Sies, H. *Oxidative stress: introductory remarks*. Academic Press, London, 1985.
- [111] Ursini, F, Maiorino, M, and HJ, F. Redox homeostasis: The Golden Mean of healthy living. *Redox Biol*, 8:205–215, 2016.
- [112] Pickering, A et al. Oxidative stress adaptation with acute, chronic, and repeated stress. *Free Radic Biol Med*, 55:109–118, 2013.
- [113] Kumar, A et al. Quantifying the magnitude of the oxygen artefact inherent in culturing airway cells under atmospheric oxygen versus physiological levels. *FEBS Lett*, 590(2): 258–269, 2016.
- [114] James, P and Dizdaroglu, M. Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells. *Nucleic Acids Res*, 24(8):1389–1394, 1996.
- [115] Halliwell, B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr*, 16:33–50, 1996.
- [116] Fraga, C et al. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(12):4533–4537, 1990.
- [117] Evans, M, Dizdaroglu, M, and Cooke, M. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res*, 567(1):1–61, 2004.
- [118] Marnett, L. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21(3):361–370, 2000.
- [119] Giulivi, C and Cadenas, E. The role of mitochondrial glutathione in DNA base oxidation. *Biochim Biophys Acta*, 1399(3):265–274, 1998.
- [120] Wallace, D. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science*, 256(5057):628–632, 1992.
- [121] Trounce, I, Byrne, E, and Marzuki, S. Decline in skeletal muscle mitochondrial respiratory chain function: possible factor in ageing. *Lancet*, 1(8639):637–639, 1989.
- [122] Berlett, B and Stadtman, E. Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *Biol Chem*, 272:20313–20316, 1997.
- [123] Halliwell, B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*, 35:1147–1150, 2007.
- [124] Nimse, S and Pal, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv*, 5:27986–28006, 2015.
- [125] Esterbauer, H and Schaur, RJ and Zollner, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*, 11(13), 1991.

- [126] Sies, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*, 91(3C): 31S–38S, 1991.
- [127] Ames, B et al. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78, 1981.
- [128] Aoyama, K et al. Caffeine and uric acid mediate glutathione synthesis for neuroprotection. *Neuroscience*, page 206–215, 2011.
- [129] May, O. Nrf2 antioxidant stress response: Managing the dark side, 2015. URL <https://www.caymanchem.com/article/2168>. Abgerufen am 20. August 2015.
- [130] Itoh, K et al. Emerging functional cross-talk between the Keap1-Nrf2 system and mitochondria. *J Clin Biochem Nutr*, 56(2):91–97, 2015.
- [131] Forman, H, Davies, K, and Ursini, F. How do nutritional antioxidants really work: nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo. *Free Radic Biol Med*, 66:24–35, 2014.
- [132] Vriend, J and Reiter, R. The Keap1-Nrf2-antioxidant response element pathway: a review of its regulation by melatonin and the proteasome. *Mol Cell Endocrinol*, 401:213–220, 2015.
- [133] Zhang, M et al. Emerging Roles of Nrf2 and Phase II Antioxidant Enzymes in Neuroprotection. *Prog Neurobiol*, 100:30–47, 2013.
- [134] Kliebenstein, D et al. Superoxide dismutase in Arabidopsis: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiol*, 118(2):637–650, 1998.
- [135] Che, M et al. Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer. *Drug Discov Today*, S1359-6446(15):378–385, 2015.
- [136] Stallings, W et al. Manganese and iron superoxide dismutase are structural homologs. *J Biol Chem*, 259:10695–10699, 1984.
- [137] Gray, B and AJ, C. Kinetics of superoxide scavenging by dismutase enzymes and manganese mimics determined by electron spin resonance. *Biochem J*, 281:795–802, 1992. ISSN 0264-6021.
- [138] Forman, H and Fridovich, I. On the Stability of Bovine Superoxide Dismutase. *J Biol Chem*, 248(8):2645–2649, 1973.
- [139] Scandalios, J. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res*, 38(7):995–1014, 2005.

- [140] Di Lisa, F et al. Mitochondria and vascular pathology. *Pharmacol Rep*, 61(1):123–130, 2009.
- [141] Quijano, C et al. Reaction of peroxynitrite with Mn-superoxide dismutase: Role of the metal center in decomposition kinetics and nitration. *J Biol Chem*, 276:11631–11638, 2001.
- [142] Nicholls, P. The reaction between aminotriazole and catalase. *Biochim Biophys Acta*, 59(2):414–420, 1962.
- [143] Rahman, I, Kode, A, and Biswas, S. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc*, 1(6): 3159–3165, 2006.
- [144] Wu, G et al. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*, 134(3): 489–492, 2004.
- [145] Watanabe, N et al. Quinones and glutathione metabolism. *Methods Enzymol*, 378:319–40, 2004.
- [146] Winterbourn, C and Metodiewa, D. The reaction of superoxide with reduced glutathione. *Arch Biochem Biophys*, 314:284–290, 1994.
- [147] Carlsen, M et al. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutr J*, 9(3), 2010.
- [148] Zhu, W et al. Curcumin and vitamin E protect against adverse effects of benzoapyrene in lung epithelial cell. *PLoS One*, 9(3), 2014.
- [149] Traber, M and Stevens, J. Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radic Biol Med*, 51:1000–1013, 2011.
- [150] European Food Safety Authority. *Tolerable Upper Intake Levels for Vitamins and Minerals*. European Food Safety Authority, Scientific Committee on Food, Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, Parma, Italy, 2006. ISBN 92-9199-014-0.
- [151] Peter, M et al. Patent: Side effect reduction; retinoic acid metabolism blocking agent, 2015. URL www.google.com/patents/US6265425. Abgerufen am 3. März 2015.
- [152] Brigelius-Flohé, R and Traber, M. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB Journal*, 13(10):1145–1155, 1999.
- [153] Niki, E. Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: in vitro and in vivo evidence. *Free Radic Biol Med*, 66:3–12, 2014.

- [154] Spasojević, I. Free radicals and antioxidants at a glance using EPR spectroscopy. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 48(3):114–142, 2011.
- [155] Bowry, V et al. Prevention of tocopherol-mediated peroxidation in ubiquinol-10-free human low density lipoprotein. *J Biol Chem*, 270(11):5756–5763, 1995.
- [156] Halliwell, B. The antioxidant paradox: less paradoxical now? *Br J Clin Pharmacol*, 75: 637–644, 2013.
- [157] Halliwell, B. The antioxidant paradox. *Lancet*, 355(9210):1179–1180, 2000.
- [158] Wilson, J. The physiological role of dehydroascorbic acid. *FEBS Letters*, 527:5–9, 2002.
- [159] Roginsky, V and Stegmann, H. Ascorbyl radical as natural indicator of oxidative stress: quantitative regularities. *Free Rad Biol Med*, 17(2):93–103, 1994. doi: [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)90107-4](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)90107-4).
- [160] Trommer, H. Die EPR-Spektroskopie. Von der physikalischen Nischen-Technologie zur vielfältigen Anwendung in der pharmazeutischen Forschung. *Apotheken Magazin*, 10, 2013.
- [161] Karrer, M. *Ascorbylradikale und oxidativer Stress unter oraler, bolusartiger Alkoholbelastung beim Menschen mit und ohne sauerstoffangereichertem Wasser*. PhD thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München, Medizinische Fakultät, 2011. URL https://edoc.ub.uni-muenchen.de/13586/1/Karrer_Michael.pdf.
- [162] Wilson, J. Mechanism of action of vitamin C in sepsis: ascorbate modulates redox signaling in endothelium. *Biofactors*, 35(1):5–13, 2009.
- [163] Aust, S, Morehouse, L, and CE, T. Role of metals in oxygen radical reactions. *J Free Radic Biol Med*, 1(1):3–25, 1985.
- [164] Trommer, H et al. Role of ascorbic acid in stratum corneum lipid models exposed to UV irradiation. *Pharm Res*, 19(7):982–990, 2002.
- [165] Gnaiger, E. Oxygen conformance of cellular respiration. A perspective of mitochondrial physiology. *Adv Exp Med Biol*, 543:39–55, 2003.
- [166] Biro, G. *From the Atmosphere to the Mitochondrion: The Oxygen Cascade*. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2013.
- [167] West, J. High-Altitude Medicine. *Am J Respir Crit Care Med*, 186:1229–1237, 2012.

- [168] Decramer, W and Miravittles, M. Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*, 379 (9823):1341–1351, 2012.
- [169] Hoffmann, M et al. Sleep apnea and hypertension. *Minerva Med*, 95:281–290, 2004.
- [170] Weir, E et al. Acute oxygen-sensing mechanisms. *N Engl J Med*, 353:2042–2055, 2005.
- [171] von Euler, U and Liljestrand, G. Observations on the pulmonary arterial blood pressure of the cat. *Acta Physiol Scan*, 12(3):301–320, 1946.
- [172] Weißmann, N et al. Hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs. *Respir Physiol*, 100:159–169, 1995.
- [173] Wilkins, M et al. Pathophysiology and treatment of high-altitude pulmonary vascular disease. *Circulation*, 131(6):582–590, 2015.
- [174] Skovgaard, N et al. Hypoxic pulmonary vasoconstriction in reptiles: a comparative study of four species with different lung structures and pulmonary blood pressures. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 289(5):R1280–1288, 2005.
- [175] Olson, K, Russell, M, and Forster, M. Hypoxic vasoconstriction of cyclostome systemic vessels: the antecedent of hypoxic pulmonary vasoconstriction? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 280:R198–206, 2001.
- [176] Faraci, F, Kilgore, D, and Fedde, M. Attenuated pulmonary pressor response to hypoxia in bar-headed geese. *Am J Physiol*, 247:R402–403, 1984.
- [177] Burton, R, Besch, E, and Smith, A. Effect of chronic hypoxia on the pulmonary arterial blood pressure of the chicken. *Am J Physiol*, 214(6):1438–1442, 1968.
- [178] Ward, J and McMurtry, I. Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction and their roles in pulmonary hypertension: new findings for an old problem. *Curr Opin Pharmacol*, 9(3):287–296, 2009.
- [179] Weißmann, N et al. NO and reactive oxygen species are involved in biphasic hypoxic vasoconstriction of isolated rabbit lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 280: L638–L645, 2001.
- [180] Rabinovitch, M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest*, 118:2372–2379, 2008.
- [181] Stenmark, K, Fagan, K, and Frid, M. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circ Res*, 99(7):675–691, 2006.

- [182] Peacock, A. Primary pulmonary hypertension. *Thorax*, 54(12):1107–1118, 1999.
- [183] Welsh, D et al. Hypoxia enhances cellular proliferation and inositol 1,4, 5-triphosphate generation in fibroblasts from bovine pulmonary artery but not from mesenteric artery. *Am J Respir Crit Care Med*, 158:1757–1762, 1998.
- [184] Tucci, M et al. Distinct effect of hypoxia on endothelial cell proliferation and cycling. *Am J Physiol*, 272:C1700–C1708, 1997.
- [185] Dempsey, E, McMurtry, I, and O'Brien, R. Protein kinase C activation allows pulmonary artery smooth muscle cells to proliferate to hypoxia. *Am J Physiol*, 260:L136–L145, 1991.
- [186] Wilkins, M. Pulmonary hypertension: the science behind the disease spectrum. *Eur Respir Rev*, 21(123):19–26, 2012.
- [187] Madden, J et al. Effects of hypoxia and other vasoactive agents on pulmonary and cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 263:384–393, 1992.
- [188] Murray, T et al. Hypoxic contraction of cultured pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 3:457–465, 1990.
- [189] Sommer, N et al. Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms. *Eur Respir J*, 32(6):1639–1651, 2008.
- [190] Weir, E et al. Mechanisms of oxygen sensing: a key to therapy of pulmonary hypertension and patent ductus arteriosus. *Br J Pharmacol*, 155:300–307, 2008.
- [191] Sommer, N et al. Oxygen sensing and signal transduction in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Eur Respir J*, 47(1):288–303, 2016.
- [192] Marshall, C et al. Pulmonary artery NADPH-oxidase is activated in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 15(5):633–644, 1996.
- [193] Weißmann, N et al. Impact of mitochondria and NADPH oxidases on acute and sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 34:505–513, 2006.
- [194] Weir, E and Archer, S. The mechanism of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: the tale of two channels. *FASEB J*, 9:183–189, 1995.
- [195] Sommer, N et al. Mitochondrial cytochrome redox states and respiration in acute pulmonary oxygen sensing. *Eur Respir J*, 36:1056–1066, 2010.
- [196] Waypa, G et al. Model for Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction Involving Mitochondrial Oxygen Sensing. *Circ Res*, 88:1259–1269, 2001.

- [197] Waypa, G et al. Hypoxia triggers subcellular compartmental redox signaling in vascular smooth muscle cells. *Circ Resl*, 106:526–535, 2010.
- [198] Archer, S et al. Mitochondrial metabolism, redox signaling, and fusion: a mitochondria-ROS-HIF-1 α -Kv1.5 O₂-sensing pathway at the intersection of pulmonary hypertension and cancer. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294:H570–578, 2008.
- [199] Bakr, A et al. Effects of dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 overexpression on the response of the pulmonary vasculature to hypoxia. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 49:491–500, 2013.
- [200] Aaronson, P, Robertson, T, and JP, W. Endothelium-derived mediators and hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Respir Physiol Neurobiol*, 132:107–120, 2002.
- [201] Budhiraja, R, Tuder, R, and Hassoun, P. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation*, 109(2):159–165, 2004.
- [202] Malczyk, M. *Die Rolle von TRPC-Kanälen in der chronisch Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie in der Maus*. PhD thesis, Justus-Liebig-Universität Gießen, 2017. URL http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2017/13192/pdf/MalczykMonika_2017_05_18.pdf.
- [203] Itoh, K et al. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun*, 236(2):3313–3222, 1997.
- [204] Zalvide, J, Stubdal, H, and DeCaprio, J. The J domain of simian virus 40 large T antigen is required to functionally inactivate RB family proteins. *Mol Cell Biol*, 18(3):1408–1415, 1998.
- [205] Tomasovic, A et al. Sestrin 2 regulates PDGF receptor beta (PDGFR β) expression by modulating proteasomal and Nrf2 transcription factor functions. *J Biol Chem*, 290(15):9738–9752, 2015.
- [206] Tomasovic, A et al. Ltbp4 regulates Pdgfr β expression via TGF β -dependent modulation of Nrf2 transcription factor function. *Matrix Biol*, 59:109–120, 2017.
- [207] Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 2:248–254, 1976.
- [208] Laboratories, B.-R. Quick Start Bradford Assay Instruction Manual. URL <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4110065A.pdf>. abgerufen am 20. Januar 2016.

- [209] International Society for Heart and Lung Transplantation. ISHLT Guidelines for the Care of Cardiac Transplant Candidates—2006 (Guidelines). *J Heart Lung Transplant*, 25(9): 1001–1056, 2006.
- [210] Gaspert, A et al. Spezielle Probleme nach Lungentransplantation: eine Gratwanderung zwischen Infektion und Abstossungsreaktion. *Schweiz Med Wochenschr*, 130:944–951, 2000.
- [211] Reynolds, H. Bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis*, 135(1):250–263, 1987.
- [212] Salzburg, U. Grundlagen der Durchflusszytometrie. URL www.uni-salzburg.at/fileadmin/oracle_file_imports/2081233.PDF. Abgerufen am 20. August 2017.
- [213] Engel, P et al. CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology. *J Immunol*, 195(10):4555–4563, 2015.
- [214] Kalyanaraman, B et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic Biol Med*, 52(1):1–6, 2012.
- [215] Winterbourn, C. The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells. *Biochim Biophys Acta*, 1840(2):730–738, 2014.
- [216] Wardman, P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: Progress, pitfalls, and prospects. *Free Radic Biol Med*, 43(7):995–1022, 2007.
- [217] Zielonka, J, Micael, H, and Kalyanaraman, B. HPLC study of oxidation products of hydroethidine in chemical and biological systems: Ramifications in superoxide measurements. *Free Radic Biol Med*, 46(3):329–338, 2009.
- [218] Wojtala, A et al. Methods to monitor ROS production by fluorescence microscopy and fluorometry. *Methods Enzymol*, 542:243–262, 2014.
- [219] Robinson, K et al. Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. *PNAS*, 103(41):15038–15043, 2006.
- [220] Bartosz, G. Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species. *Clin Chim Acta*, 368(1-2):53–76, 2006. doi: 10.1016/j.cca.2005.12.039.
- [221] Mitchell, D et al. Use of rapid-scan EPR to improve detection sensitivity for spin-trapped radicals. *Biophys J*, 105(2):338–342, 2013.

- [222] Dikalov, S et al. Quantification of superoxide radicals and peroxynitrite in vascular cells using oxidation of sterically hindered hydroxylamines and electron spin resonance. *Nitric Oxide*, 1(5):423–431, 1997.
- [223] Dikalov, S et al. Detection of superoxide radicals and peroxynitrite by 1-hydroxy-4-phosphonooxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine: quantification of extracellular superoxide radicals formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 248:211–215, 1998.
- [224] Dikalov, S, Griendling, K, and Harrison, D. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension*, 49(4):717–727, 2007.
- [225] Dikalov, S and Harrison, D. Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal*, 20(2):372–382, 2014.
- [226] Büttner, G and Mason, R. *Spin-Trapping Methods for Detecting Superoxide and Hydroxyl Free Radicals In Vitro and In Vivo*, volume 1. World Scientific, New Jersey, London, Singapore, Hong Kong, 2003. ISBN 981-02-4636-6. URL <http://www.healthcare.uiowa.edu/corefacilities/esr/publications/buettnerpubs/pdf/CROSA--I-ch02-pp27-2003.pdf>.
- [227] Pak, O et al. Impact of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ on hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Eur Respir J*, page pii: 1701024, 2018.
- [228] Schäfer, R. *Hypoxie-induzierte Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in isoliert perfundierten und ventilierten Mauslungen*. PhD thesis, Justus-Liebig-Universität Gießen, 2007.
- [229] Rudolf, M and Kuhlisch, W. *Biostatistik: Eine Einführung für Biowissenschaftler*. Pearson Education Deutschland GmbH, 1. auflage edition, 2008. ISBN 978-3-8273-7269-7. www.pearson-studium.de.
- [230] Olbricht, G. STAT 512 — Applied Regression Analysis Spring 2011. Lecture Notes, 2011, Purdue University. URL http://www.stat.purdue.edu/~ghobbs/STAT_512/Lecture_Notes/ANOVA/Topic_19.pdf.
- [231] Bates, D et al. lme4: Linear mixed-effects models using eigen and s4. *Journal of Statistical Software*, 2014. URL <http://arxiv.org/abs/1406.5823>.
- [232] Hothorn, T, Bretz, F, and Westfall, P. Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical Journal*, 50(3):346–363, 2008.
- [233] Venables, W and Ripley, B. *Modern Applied Statistics with S*. Springer Verlag New York, fourth edition, 2002. ISBN 0-387-95457-0.

- [234] Box, G and Cox, D. An Analysis of Transformations. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol*, 26(2):211–252, 1964. URL <http://www.jstor.org/stable/2984418>.
- [235] Pinheiro, J and Bates, D. *Mixed-effects models in S and S-PLUS*. Statistics and Computing. Springer Verlag, New York, 2000.
- [236] Lüllmann, H et al. *Pharmakologie und Toxikologie: Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen*. Thieme Verlag, 18 edition, 2016. ISBN 978-3-1336-8518-4.
- [237] Sakar, S. Stochastic Frontier Analysis. Workshop, 2004. URL <http://www.igidr.ac.in/conf/finwrk/workshop2.pdf>. Abgerufen am 14. Dezember 2017.
- [238] Coelli, T and Henningsen, A. *frontier: Stochastic Frontier Analysis*, 2017. URL <https://CRAN.R-project.org/package=frontier>. R package version 1.1-2.
- [239] Bååth, R. *bayesboot: An Implementation of Rubin's (1981) Bayesian Bootstrap*, 2016. URL <https://CRAN.R-project.org/package=bayesboot>. R package version 0.2.1.
- [240] R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2011.
- [241] Tuszynski, J. *caTools: Tools: moving window statistics, GIF, Base64, ROC AUC, etc.*, 2014. URL <https://CRAN.R-project.org/package=caTools>. R package version 1.17.1.
- [242] Hajian-Tilaki, K. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. *Caspian J Intern Med*, 4(2):627–635, 2013.
- [243] Ärztliches Zentrum für Qualität in der Medizin. Sensitivität/Spezifität. URL <http://www.leitlinien.de/glossar/sensitivitaet-spezifitaet>. Abgerufen am 10. Juni 2017.
- [244] Kuhn, M et al. *C50: C5.0 Decision Trees and Rule-Based Models*, 2015. URL <https://CRAN.R-project.org/package=C50>. R package version 0.1.0-24.
- [245] Michaelis, L and Schubert, M. The Theory of Reversible Two-step Oxidation Involving Free Radicals. *Chem Rev*, 22(3):437–470, 1938.
- [246] Takahama, U and Hirota, S. Reduction of nitrous Acid to nitric oxide by coffee melanoidins and enhancement of the reduction by thiocyanate: possibility of its occurrence in the stomach. *J Agric Food Chem*, 12(56):4736–4744, 2008.

- [247] Bekedam, E et al. Electron spin resonance (ESR) studies on the formation of roasting-induced antioxidative structures in coffee brews at different degrees of roast. *J Agric Food Chem*, 56:4597–4604, 2008.
- [248] Hawkins, C and Davies, M. Detection and characterisation of radicals in biological materials using EPR methodology. *Biochim Biophys Acta*, 1840(2):708–721, 2014.
- [249] Dikalov, S et al. EPR detection of cellular and mitochondrial superoxide using cyclic hydroxylamines. *Free Radic Res*, 45(4):417–430, 2011.
- [250] Berg, K et al. A high precision method for quantitative measurements of reactive oxygen species in frozen biopsies. *PLoS One*, 9(3):e90964, 2014.
- [251] Abragam, A and Bleaney, B. *Electron Paramagnetic Resonance of Transition Ions, Chapter 1: Introduction*. Clarendon Press, Oxford, UK, 1970.
- [252] Berliner, L. *Spin labeling: theory and applications*. Academic Press, New York, 1976.
- [253] Jeschke, G. *ESR Spectroscopy in Membrane Biophysics, Kapitel 2: Instrumentation and experimental setup*. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2007. ISBN 978-0-387-25066-3.
- [254] Klare, J. Site-directed spin labeling EPR spectroscopy in protein research. *Biol Chem*, 394(10):1281–1300, 2013.
- [255] Müller, J et al. *Schnellmethoden zur Beurteilung von Lebensmitteln und ihren Rohstoffen*. Hrsg. Baltes W, and Kroh L, 2005. ISBN 3899471202.
- [256] F-Praktikum Paramagnetische Elektronenresonanz (EPR) an Lösungen freier Radikale. 2007. URL http://www.uni-muenster.de/imperia/md/content/physikalische_chemie/skript_es.pdf. Version 07.09.2006.
- [257] Jeschke, G. Kurze Einführung in die elektronenparamagnetische Resonanzspektroskopie. Vorlesungsskript, 2008. URL www.epr.ethz.ch/education/epr2007.pdf.
- [258] Marakova, K et al. Combination of Neural Networks and DFT Calculations for the Comprehensive Analysis of FDMPO Radical Adducts from Fast Isotropic Electron Spin Resonance Spectra. *J Chem Phys*, 116:443–451, 2011.
- [259] Weil, J and Bolton, J. *Electron Paramagnetic Resonance: Elementary Theory and Practical Applications*. Wiley, 2nd edition, 2007. ISBN 978-0-470-08497-7.
- [260] Jeschke, G. *Einführung in die ESR-Spektroskopie*. ETH Zürich, 1998. URL www.epr.ethz.ch/education/epr_skript_mainz_1998.pdf.

- [261] Grinberg, O and Berliner, L. *Very High Frequency (VHF) ESR/EPR*, volume 22. Springer Science+Business Media New York, 2013. ISBN 978-1-4419-3442-0.
- [262] Weber, R. *Xenon User's Guide*. Bruker BioSpin Corporation, Billerica, MA USA, 2011. Manual Version 1.3.
- [263] Desmet, C et al. Application of Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Oximetry to Monitor Oxygen in Wounds in Diabetic Models. *PLoS One*, 10:e0144914, 2015.
- [264] Höfer, P and Carl, P. Verfahren zur Bestimmung der absoluten Anzahl von Elektronenspins in einer ausgedehnten Probe, 2009, Bruker BioSpin GmbH. URL www.freepatentsonline.com/DE102007044939.html. Patent #DE102007044939.
- [265] Spiess, A. *propagate: Propagation of Uncertainty*, 2014. URL <https://CRAN.R-project.org/package=propagate>. R package version 1.0-4.
- [266] Nesmelov, Y and Thomas, D. Multibore sample cell increases EPR sensitivity for aqueous samples. *Journal of Magnetic Resonance*, 178:318–324, 2005.
- [267] Ahmad, R and Kuppusamy, P. Theory, Instrumentation, and Applications of EPR Oximetry. *Chemical reviews*, 110(5):3212–3236, 2010. doi: 0.1021/cr900396q.
- [268] Subczynski, W and H.M., S. EPR Oximetry in Biological and Model Samples. In Eaton, S, Eaton, G, and Berliner, L, editors, *Biomedical EPR, Part A: Free Radicals, Metals, Medicine, and Physiology*. *Biological Magnetic Resonance*, volume 23, pages 229–280. Springer, Boston, MA, 2005. ISBN 978-0-306-48506-0. doi: 10.1007/0-387-26741-7_10.
- [269] Zweier, J et al. Development of a Highly Sensitive Probe for Measuring Oxygen in Biological Tissues. *J Magn Reson B*, 105(1):52 – 57, 1994.
- [270] Povic, M. Electron Spin Resonance Oxygen Broadening. *The Journal of Physical Chemistry*, 79(11):1106–1109, 1975.
- [271] Matsuo, T et al. Highly sensitive hepatitis B surface antigen detection by measuring stable nitroxide radical formation with ESR spectroscopy. *Free Radic Biol Med*, 25(8):929–935, 1998.
- [272] Abbas, K et al. Detection of superoxide production in stimulated and unstimulated living cells using new cyclic nitrene spin traps. *Free Radic Biol Med*, 71:281–290, 2014.
- [273] Eder, K et al. An excess dietary vitamin E concentration does not influence Nrf2 signaling in the liver of rats fed either soybean oil or salmon oil. *J Nutr Metab*, 14, 2017.

- [274] Siebers, M. Untersuchungen zur potentiellen Hemmung stressresponsiver Signalwege durch hohe Vitamin E-Gaben bei Ratten. Master's thesis, Justus-Liebig-Universität Gießen, Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie, 2015.
- [275] European Food Safety Authority. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *Curr Opin Plant Biol*, 8(3):1461, 2010.
- [276] Gutteridge, J, Quinlan, G, and Yamamoto, Y. Are Fatty Acid Patterns Characteristic of Essential Fatty Acid Deficiency Indicative of Oxidative Stress? *Free Radic Res*, 28(2): 109–114, 1998.
- [277] Yamamoto, Y. Plasma marker of tissue oxidative damage and edaravone as a scavenger drug against peroxy radicals and peroxynitrite. *J Clin Biochem Nutr*, 60:49–54, 2016.
- [278] Reeves, P, Nielsen, F, and Fahey, G. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*, 123(11):1939–1951, 1993.
- [279] Weißmann, N et al. Basic features of hypoxic pulmonary vasoconstriction in mice. *Respir Physiol Neurobiol*, 2:191–200, 2004.
- [280] Hertz, M et al. Scientific Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: introduction to the 2011 annual reports. *J Heart Lung Transplant*, 30: 1071–1077, 2011.
- [281] Martinu, T, Chen, D, and Palmer, S. Acute rejection and humoral sensitization in lung transplant recipients. *Proc Am Thorac Soc*, 6(1):54–65, 2009.
- [282] Yusef, R et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-second Official Adult Lung and Heart-Lung Transplantation Report–2015; Focus Theme: Early Graft Failure. *J Heart Lung Transplant*, 34:1264–1277, 2015.
- [283] Hachem, R et al. The significance of a single episode of minimal acute rejection after lung transplantation. *Transplantation*, 80(10):1406–1413, 2006.
- [284] Girgis, R et al. Risk factors for the development of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*, 15(12):1200–1208, 1996.
- [285] Verleden, GM and others. A new classification system for chronic lung allograft dysfunction. *J Heart Lung Transplant*, 33(2):127–133, 2014.
- [286] Berastegui, C et al. BALF cytokines in different phenotypes of chronic lung allograft dysfunction in lung transplant patients. *Clin Transplant*, 2017.

- [287] Husain, A and Garrity, E. Lung Transplantation: The State of the Airways. *Arch Pathol Lab Med*, 140:241–244, 2016.
- [288] Herber, S et al. Acute or chronic transplant rejection - high resolution CT of the chest in lung transplant recipients. *Fortschr Röntgenstr*, 173(9):822–829, 2001.
- [289] Stewart, S et al. Revision of the 1996 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of lung rejection. *J Heart Lung Transplant*, 26:1229–1242, 2007.
- [290] Yousem, S et al. Revision of the 1990 working formulation for the classification of pulmonary allograft rejection: Lung Rejection Study Group. *J Heart Lung Transplant*, 15: 1–15, 1996.
- [291] Scheibe, S and Mayer, K. Ethikantrag: Detektion von reaktiven Sauerstoffspezies mittels Elektronen-Spin-Resonanz Spektroskopie in der bronchoalveolären Lavage Flüssigkeit von lungentransplantierten Patienten. 2014.
- [292] Vanaudenaerde, B et al. Broncho-alveolar lavage fluid recovery correlates with airway neutrophilia in lung transplant patients. *Respir Med*, 102(3):339–347, 2007.
- [293] Robin, X et al. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics*, 12:77, 2011.
- [294] Greenland, J et al. Bronchoalveolar lavage cell immunophenotyping facilitates diagnosis of lung allograft rejection. *Am J Transplant*, 14:831–840, 2014.
- [295] Tikkanen, J et al. Cytological monitoring of peripheral blood, bronchoalveolar lavage fluid, and transbronchial biopsy specimens during acute rejection and cytomegalovirus infection in lung and heart–lung allograft recipients. *Clin Transplant*, 15:77–88, 2001.
- [296] Vos, R et al. Bronchoalveolar lavage neutrophilia in acute lung allograft rejection and lymphocytic bronchiolitis. *J Heart Lung Transplant*, 29(11):1259–1269, 2010.
- [297] Ogle, D. *FSA: Fisheries Stock Analysis*, 2017. R package version 0.8.16.
- [298] Poncet, P. *modeest: Mode Estimation*, 2012. URL <https://CRAN.R-project.org/package=modeest>. R package version 2.1.
- [299] Arcasoy, S et al. Pathologic interpretation of transbronchial biopsy for acute rejection of lung allograft is highly variable. *Am J Transplant*, 11:320–328, 2011.
- [300] Vos, R et al. Exhaled carbon monoxide as a noninvasive marker of airway neutrophilia after lung transplantation. *Transplantation*, 87(10):1579–1583, 2009.

- [301] Bartosz, G. Reactive oxygen species: Destroyers or messengers? *Biochem Pharmacol*, 77 (8):1303–1315, 2009. doi: 10.1016/j.bcp.2008.11.009.
- [302] Veronese, F et al. Polyethylene glycol-superoxide dismutase, a conjugate in search of exploitation. *Adv Drug Deliv Rev*, 54(4):587–606, 2002.
- [303] Tamura, Y et al. Superoxide dismutase conjugated to polyethylene glycol provides sustained protection against myocardial ischemia/reperfusion injury in canine heart. *Circ Res*, 63(5):944–959, 1988.
- [304] Liu, T et al. Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase and catalase reduce ischemic brain injury. *Am J Physiol*, 256(2):H589–93, 1989.
- [305] Zhang, R et al. Kinetics of superoxide-induced exchange among nitroxide antioxidants and their oxidized and reduced forms. *Free Radic Biol Med*, 26:1245–1252, 1999.
- [306] Chen, K et al. Effects of Oxygen on the Metabolism of Nitroxide Spin Labels in Cells. *Biochemistry*, 28:2496–2501, 1989.
- [307] Sterk, H, Kopp, H, and Esterbauer, H. Messungen der Spin-Gitter-Relaxationszeit T1 an Nucleosiden. *Z Naturforsch*, 34c:503–507, 1979.
- [308] Glockner, J, Chan, H, and Swartz, H. In vivo oximetry using a nitroxide-liposome system. *Magn Reson Med*, 20(1):123–133, 1991.
- [309] Smirnov, A, Clarkson, R, and Belford, R. EPR Linewidth (T2) Method to Measure Oxygen Permeability of Phospholipid Bilayers and Its Use to Study the Effect of Low Ethanol Concentrations. *J Magn Reson B*, 111(2):149–157, 1996.
- [310] Lu, T and Finkel, T. Free Radicals and Senescence. *Exp Cell Res*, 314:1918–1922, 2008.
- [311] Lee, A et al. Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J Biol Chem*, 274(12):7936–7940, 1999.
- [312] Dromparis, P, Dutendra, G, and Michelakis, E. The role of mitochondria in pulmonary vascular remodeling. *J Mol Med*, 88:1003–1010, 2011.
- [313] Murphy, M. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*, 417(1):1–13, 2009.
- [314] Pak, O et al. Mitochondrial hyperpolarization in pulmonary vascular remodeling. Mitochondrial uncoupling protein deficiency as disease model. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 49(3):358–367, 2013.

- [315] Schörner, S. *Veränderungen mitochondrialer Atmungskettenfunktionen in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen unter chronischer Hypoxie: respirometrische und Remissions-Spektrophotometrische Untersuchungen*. PhD thesis, Justus-Liebig-Universität Gießen, 2014. URL <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2014/10987>.
- [316] Dikalova, A et al. Nox1 overexpression potentiates angiotensin II-induced hypertension and vascular smooth muscle hypertrophy in transgenic mice. *Circulation*, 112(17):2668–2676, 2005.
- [317] Murphy, M and Smith, R. Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47:629–656, 2007.
- [318] Smith, R and Murphy, M. Animal and human studies with the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ. *Ann N Y Acad Sci*, 1201:96–103, 2010.
- [319] Leinisch, F. *Untersuchungen am Entkopplerprotein UCP-2 Detektion reaktiver Sauerstoffspezies in biologischen Systemen mit konventionellen und fluoreszierenden nitronbasierten spin traps*. PhD thesis, Technischen Universität Kaiserslautern, 2009. URL <https://kluedo.ub.uni-kl.de/frontdoor/index/index/docId/2130>.
- [320] Matsuura, T et al. Retinol Transport in Cultured Stellate Cells of Rat Liver: Studies by Light and Electron Microscope Autoradiography. *Experimental Cell Research*, 206(1): 111–118, 1993. ISSN 0014-4827.
- [321] Csillag, A et al. GABAergic structures in the chick telencephalon: GABA immunocytochemistry combined with light and electron microscope autoradiography, and Golgi impregnation. *Brain Research*, 437(2):283–297, 1987. ISSN 0006-8993.
- [322] Katsumoto, T et al. A new device for electron microscope autoradiography of whole cultured cells. *Experientia*, 36(6):689–689, 6 1980. ISSN 1420-9071.
- [323] Yang, Q et al. Toxic effects of heavy metal terbium ion on the composition and functions of cell membrane in horseradish roots. *Ecotoxicol Environ Saf*, 111:48–58, 2015.
- [324] Wang, L et al. Abnormal pinocytosis and valence-variable behaviors of cerium suggested a cellular mechanism for plant yield reduction induced by environmental cerium. *Environ Pollut*, 230(Supplement C):902–910, 2017. ISSN 0269-7491.
- [325] Miura, Y et al. A novel lipophilic spin probe for the measurement of radiation damage in mouse brain using in vivo electron spin resonance (ESR). *FEBS Letters*, 419(1):99–102, 1997. doi: 10.1016/S0014-5793(97)01443-9.

- [326] Dikalov, S, Vitek, M, and Mason, R. Noninvasive diagnostic tool for inflammation-induced oxidative stress using electron spin resonance spectroscopy and an extracellular cyclic hydroxylamine. *Arch Biochem Biophys*, 402(2):218–226, 2002.
- [327] Pryor, W and Stone, K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Ann NY Acad Sci*, 686:12–27, 1993.
- [328] Pacher, P, Beckman, J, and Liaudet, L. Nitric oxide and peroxyxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*, 87:315–424, 2007.
- [329] Sikora, A et al. Reaction between Peroxyxynitrite and Boronates: EPR Spin-Trapping, HPLC Analyses, and Quantum Mechanical Study of the Free Radical Pathway. *Chem Res Toxicol*, 24:687–697, 2011.
- [330] Zielonka, J et al. High-throughput assays for superoxide and hydrogen peroxide: design of a screening workflow to identify inhibitors of NADPH oxidases. *J Biol Chem*, 289(23): 16176–16189, 2014.
- [331] Zielonka, J et al. Mitigation of NADPH Oxidase 2 Activity as a Strategy to Inhibit Peroxyxynitrite Formation. *J Biol Chem*, 291(13):7029–7044, 2016.
- [332] Marinho, H. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biol*, 23:535–562, 2014.
- [333] Dikalov, S, Vitek, M, and Mason, R. Cupric-amyloid beta peptide complex stimulates oxidation of ascorbate and generation of hydroxyl radical. *Free Radic Biol Med*, 36: 340–347, 2004.
- [334] Back, P, Braeckman, B, and Matthijssens, F. ROS in aging *Caenorhabditis elegans*: damage or signaling? *Oxid Med Cell Longev*, 2012.
- [335] Aoyama, M et al. A novel ESR method analyzing peroxidase activities for enzyme immunoassay using the combination of p-acetamidophenol and hydroxylamine. *Anal Sci*, 14:1107–1113, 1998.
- [336] Da Violante, G et al. Evaluation of the Cytotoxicity Effect of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 Colon Tumor Cell Cultures. *Biol Pharm Bull*, 12:1600–1603, 2002.
- [337] Zhao, H et al. Synthesis and biochemical applications of a solid cyclic nitron spin trap: a relatively superior trap for detecting superoxide anions and glutathionyl radicals. *Free Radic Biol Med*, 31(5):599–606, 2001.
- [338] Ouari, O et al. Recent developments and applications of the coupled EPR/Spin trapping technique (EPR/ST). *Electron Paramag Reson*, 22:1–40, 2011.

- [339] Khan, N et al. Spin traps: in vitro toxicity and stability of radical adducts. *Free Radic Biol Med*, 34(11):1473–1481, 2003.
- [340] Zhao, H et al. Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102:5727–5732, 2005.
- [341] Dikalov, S and Fink, B. ESR techniques for the detection of nitric oxide in vivo and in tissues. *Methods Enzymol*, 369:597–610, 2005.
- [342] Sorescu, D et al. Electron spin resonance characterization of the NAD(P)H oxidase in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med*, 30(6):603–612, 2001.
- [343] Sommer, N et al. Mitochondrial Complex IV Subunit 4 Isoform 2 Is Essential for Acute Pulmonary Oxygen Sensing. *Circ Res*, 121(4):424–438, 2017.
- [344] Ward, J, Snetkov, V, and Aaronson, P. Calcium, mitochondria and oxygen sensing in the pulmonary circulation. *Cell Calcium*, 36:209–220, 2004.
- [345] Waypa, G and Schumacker, P. Oxygen sensing in hypoxic pulmonary vasoconstriction: using new tools to answer an age-old question. *Exp Physiol*, 93:133–128, 2008.
- [346] Moudgil, R, Michelakis, E, and Archer, S. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Appl Physiol*, 1:390–403, 2005.
- [347] Waypa, G et al. Superoxide generated at mitochondrial complex III triggers acute responses to hypoxia in the pulmonary circulation. *Am J Respir Crit Care Med*, 187(4):414–432, 2013.
- [348] Hales, C. The Site and Mechanism of Oxygen Sensing for the Pulmonary Vessels. *Chest*, 88(4):235S–240S, 1985.
- [349] Marshall, C and Marshall, B. Site and sensitivity for stimulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Appl Physiol*, 55(3):711–716, 1983.
- [350] Marshall, B and Marshall, C. A model for hypoxic constriction of the pulmonary circulation. *J Appl Physiol*, 64:68–77, 1988.
- [351] Aaronson, P et al. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: mechanisms and controversies. *J Physiol*, 570:53–58, 2006.
- [352] Ivanovic, Z. Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. *Journal of Cellular Physiology*, 219(2):271–275, 2009. ISSN 1097-4652.

- [353] Campian, J et al. Oxygen tolerance and coupling of mitochondrial electron transport. *J Biol Chem*, 279(45):46580–46587, 2004.
- [354] Chapple, S et al. Bach1 differentially regulates distinct Nrf2-dependent genes in human venous and coronary artery endothelial cells adapted to physiological oxygen levels. *Free Radic Biol Med*, 92:152–162, 2016.
- [355] Evans, A et al. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: mechanisms of oxygen-sensing. *Curr Opin Anaesthesiol*, 24(1):13–20, 2011.
- [356] Messier, E et al. Trolox contributes to Nrf2-mediated protection of human and murine primary alveolar type II cells from injury by cigarette smoke. *Cell Death Dis*, 4:e573, 2013.
- [357] Pierrou, S et al. Expression of genes involved in oxidative stress responses in airway epithelial cells of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 175:577–586R, 2007.
- [358] Comandini, A et al. Markers of anti-oxidant response in tobacco smoke exposed subjects: a data-mining review. *Pulm Pharmacol Ther*, 23:482–492, 2010.
- [359] Malhotra, D et al. Decline in NRF2-regulated antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease lungs due to loss of its positive regulator. *Am J Respir Crit Care Med*, 178(6):592–604, 2008.
- [360] Heidler, J et al. Sestrin-2, a repressor of PDGFR β signalling, promotes cigarette-smoke-induced pulmonary emphysema in mice and is upregulated in individuals with COPD. *Dis Model Mech*, 6:1378–1387, 2013.
- [361] Waypa, G and Schumacker, P. Hypoxia-induced changes in pulmonary and systemic vascular resistance: where is the O₂ sensor? *Respir Physiol Neurobiol*, 174:201–211, 2011.
- [362] Schumacker, P. Lung cell hypoxia: role of mitochondrial reactive oxygen species signaling in triggering responses. *Proc Am Thorac Soc*, 8:477–484, 2011.
- [363] Herget, J and Chovanec, M. Isolated perfused murine lung: A well characterized preparation for studying lung vascular function. *Drug Discov Today*, 7(3-4), 2010.
- [364] Niemeier, W. The Isolated Perfused Lung. *Environmental Health Perspectives*, 56:35–41, 1984.

- [365] Hyodo, F et al. Probing the Intracellular Redox Status of Tumors with Magnetic Resonance Imaging and Redox-Sensitive Contrast Agents. *Cancer Res*, 66:9921–9928, 2006. URL <http://cancerres.aacrjournals.org/content/66/20/9921>.
- [366] Davis, R et al. Magnetic resonance imaging of organic contrast agents in mice: capturing the whole-body redox landscape. *Free Radical Biology & Medicine*, 50:459–468, 2011.
- [367] Emoto, M et al. Non-invasive imaging of the levels and effects of glutathione on the redox status of mouse brain using electron paramagnetic resonance imaging. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 485(4):802 – 806, 2017. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.02.134>.
- [368] Lee, M et al. Assessment of Oxidative Stress in the Spontaneously Hypertensive Rat Brain Using Electron Spin Resonance (ESR) Imaging and in Vivo L-Band ESR. *Hypertens Res*, 27(7):485–491, 2004.
- [369] Jernigan, N et al. Contribution of reactive oxygen species to the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *PLoS One*, 12(6), 2017. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5493402/>.
- [370] Patel, K et al. Acute antihypertensive action of nitroxides in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 290(1):R37–R43, 2006.
- [371] Hahn, S et al. Hemodynamic effect of the nitroxide superoxide dismutase mimics. *Free Radic Biol Med*, 27(5/6):529–535, 1999.
- [372] Fink, B et al. Detection of superoxides with new cyclic hydroxylamine in plasma, cells, isolated heart. *Free Radic Biol Med*, 2005. URL www.noxygen.de/pages-productinfo/category-1_7/product-79/chemicals-cmh-noxygen-cmh-50mg.html. In revision.
- [373] Kinoshita, Y et al. In vivo evaluation of novel nitroxyl radicals with reduction stability. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(11):1703 – 1709, 2010. doi: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.08.027>.
- [374] Tremblay, J et al. Hypoxia, not pulmonary vascular pressure, induces blood flow through intrapulmonary arteriovenous anastomoses. *The Journal of Physiology*, 593(3):727–737, 2015. doi: [10.1113/jphysiol.2014.282962](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.282962).
- [375] Prinzmetal, M et al. Arterio-venous anastomoses in liver, spleen and lungs. *Am J Physiol*, 152:48–52, 1948.

- [376] Lovering, A et al. Intrapulmonary arteriovenous anastomoses in humans - response to exercise and the environment. *The Journal of Physiology*, 593(3):507–520, 2015. doi: 10.1113/jphysiol.2014.275495.
- [377] Conhaim, R et al. Arterio-venous anastomoses in isolated, perfused rat lungs. *Physiol Rep*, 4(21):1–9, 2016. ISSN 2051-817X. doi: 10.14814/phy2.13023.
- [378] Bates, M et al. Beta Adrenergic Regulation of Intrapulmonary Arteriovenous Anastomoses in Intact Rat and Isolated Rat Lungs. *Front. Physiol.*, 8(218):1–8, 2017. doi: 10.3389/fphys.2017.00218.
- [379] Lovering, A et al. Direct demonstration of 25- and 50- μ m arteriovenous pathways in healthy human and baboon lungs. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 292(4):H1777–H1781, 2007. doi: 10.1152/ajpheart.01024.2006.
- [380] Bates, M et al. Hypoxia and Exercise Increase the Transpulmonary Passage of ^{99m}Tc -Labeled Albumin Particles in Humans. *PLOS*, 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0101146.
- [381] Tabuchi, A et al. Precapillary Oxygenation Contributes Relevantly to Gas Exchange in the Intact Lung. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 188(4):474–481, 2013. doi: 10.1164/rccm.201212-2177OC.
- [382] Javouhey-Donzel, A et al. Rat vitamin E status and heart lipid peroxidation: effect of dietary alpha-linolenic acid and marine n-3 fatty acids. *Lipids*, 28:651–655, 1993.
- [383] Cho, S and Choi, Y. Lipid peroxidation and antioxidant status is affected by different vitamin E levels when feeding fish oil. *Lipids*, 29:47–52, 1994.
- [384] Kwak, S et al. Efficacy of omega-3 fatty acid supplements (eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid) in the secondary prevention of cardiovascular disease: a meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *Arch Intern Med*, 172(9):686–694, 2012.
- [385] Tang, W et al. Role of Nrf2 in chronic liver disease. *World J Gastroenterol*, 20:13079–13087, 2014.
- [386] Flader, D et al. Effects of megadoses of dietary vitamin E on the antioxidant status of rats fed lard or salmon oil. *Int J Vitam Nutr Res*, 73(4):275–283, 2003.
- [387] Comhair, S et al. Rapid loss of superoxide dismutase activity during antigen-induced asthmatic during antigen-induced asthmatic response. *Lancet*, 355:624, 2000.
- [388] Heffner, J and Repine, J. Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am Rev Respir Dis*, 140:531–554, 1989.

- [389] Surai, P and Sparks, N. Tissue-specific fatty acid and alpha-tocopherol profiles in male chickens depending on dietary tuna oil and vitamin E provision. *Poult Sci*, 79(8):1132–1142, 2000.
- [390] Ristow, M et al. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *PNAS*, 106(21):8665–8670, 2009.
- [391] Finley, J et al. Antioxidants in foods: state of the science important to the food industry. *J Cell Biol*, 59(13):6837–6846, 2011.
- [392] Roberts, C, Vaziri, N, and Barnard, R. Effect of diet and exercise intervention on blood pressure, insulin, oxidative stress, and nitric oxide availability. *Circulation*, 106: 2530–2532, 2002.
- [393] Halliwell, B and Whiteman, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*, 142(2):231–255, 2004.
- [394] Hopkins, P et al. Prospective analysis of 1,235 transbronchial lung biopsies in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*, 21:1062–1067, 2002.
- [395] Lundqvist, H et al. Evaluation of electron spin resonance for studies of superoxide anion production by human neutrophils interacting with *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Biochem Biophys Methods*, 70:1059–1065, 2008.
- [396] Ryan, T and Aust, S. The role of iron in oxygen-mediated toxicities. *Crit Rev Toxicol*, 22 (2):119–141, 1992.
- [397] Kubiak, T et al. EPR Study of Paramagnetic Centers in Human Blood. *Curr Topics Biophys*, 36:7–13, 2013.
- [398] Hirota, Y et al. Implication of ESR signals from ceruloplasmin (Cu^{2+}) and transferrin (Fe^{3+}) in pleural effusion of lung diseases. *Pathophysiology*, 7(1):41–45, 2000.
- [399] Fujita, Y et al. Estimation of the age of human bloodstains by electron paramagnetic resonance spectroscopy: long-term controlled experiment on the effects of environmental factors. *Forensic Sci Int*, 152:39–43, 2005.
- [400] Cross, C et al. Oxidants, antioxidants, and respiratory tract lining fluids. *Environ Health Perspect*, 102:185–191, 1994.
- [401] Baz, M et al. Glutathione depletion in epithelial lining fluid of lung allograft patients. *Am J Respir Crit Care Med*, 153(2):742–746, 1996.

- [402] Elssner, A and Vogelmeier. The role of neutrophils in the pathogenesis of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *Transpl Infect Dis*, 3:168–176, 2001.
- [403] Wright, S et al. CD14 serves as the cellular receptor for complexes of lipopolysaccharide with lipopolysaccharide binding protein. *Science*, 249:1431–1433, 1990.
- [404] Ward, C et al. Increased soluble CD14 in bronchoalveolar lavage fluid of stable lung transplant recipients. *Eur Respir J*, 19:472–478, 2002.
- [405] Morgan, M and Liu, Z. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Res*, 21:103–115, 2011.
- [406] Ito, C, Kazantsev, A, and Baldwin, A. Three NF-kappa B sites in the I kappa B-alpha promoter are required for induction of gene expression by TNF alpha. *Nucleic Acids Res*, 22(18):3787–3792, 1994.
- [407] Rennard, S et al. Estimation of the apparent volume of epithelial lining fluid recovered by bronchoalveolar lavage using urea as marker of dilution. *J. Appl. Physiol.*, 60:532–538, 1986.
- [408] Shiraishi, T et al. Free Radical-Mediated Tissue Injury in Acute Lung Allograft Rejection and the Effect of Superoxide Dismutase. *Ann Thorac Surg*, 64:821–825, 1997.
- [409] Vos, R et al. High-dose vitamin D after lung transplantation: A randomized trial. *J Heart Lung Transplant*, 36(8):897–905, 2017.
- [410] Solidoro, P, Bellocchia, M, and Facchini, F. The immunobiological and clinical role of Vitamin D in obstructive lung diseases. *Minerva Medica*, 3107(3):12–19, 2016.
- [411] Hodyc, D et al. Pre-arrest Administration of the Cell-permeable Free Radical Scavenger Tempol Reduces Warm Ischemic Damage of Lung Function in Non-Heart-beating Donors. *J Heart Lung Transplant*, 27(8):890–897, 2008. doi: <https://doi.org/10.1016/j.healun.2008.05.019>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1053249808004245>.
- [412] Akao, T et al. Effect of the Free Radical Scavenger MCI-186 on Pulmonary Ischemia-Reperfusion Injury in Dogs. *J Heart Lung Transplant*, 25(8):965–971, 2006. doi: <https://doi.org/10.1016/j.healun.2006.03.004>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1053249806002208>.
- [413] Tiroke, A, Bewig, B, and Haverich, A. Bronchoalveolar lavage in lung transplantation. State of the art. *Clin Transplant*, 13(2):131–157, 1999.

- [414] Clelland, C et al. Bronchoalveolar lavage and transbronchial lung biopsy during acute rejection and infection in heart-lung transplant patients. Studies of cell counts, lymphocyte phenotypes, and expression of HLA-DR and interleukin-2 receptor. *Am Rev Respir Dis*, 143:1386–1392, 1993.
- [415] Schmidt, A et al. Macrophages in experimental rat lung isografts and allografts: infiltration and proliferation in situ. *J Leukoc Biol*, 81:186–194, 2007.
- [416] Corhay, J et al. Iron content in human alveolar macrophages. *Eur Respir J*, 5:804–809, 1992.
- [417] Sherman, J et al. Time course of hemosiderin production and clearance by human pulmonary macrophages. *Chest*, 86:409–411, 1984.
- [418] Reid, D, Snell, G, and Ward, C. Iron overload and nitric oxide-derived oxidative stress following lung transplantation. *J Heart Lung*, 20:840–849, 2001.
- [419] Baz, M et al. Iron accumulation in lung allografts after transplantation. *Chest*, 112(2): 435–439, 1997.
- [420] Vanaudenaerde, B et al. The role of interleukin-17 during acute rejection after lung transplantation. *Eur Respir J*, 27(4):779–787, 2006.
- [421] Di Giovine, B et al. Bronchoalveolar lavage neutrophilia is associated with obliterative bronchiolitis after lung transplantation: role of IL-8. *J Immunol*, 157:4194–4202, 1996.
- [422] Zheng, L et al. The dynamics and associations of airway neutrophilia post lung transplantation. *Free Radic Biol Med*, 6(3):599–608, 2006.
- [423] Riise, G et al. Activation of eosinophils and fibroblasts assessed by eosinophil cationic protein and hyaluronan in BAL. Association with acute rejection in lung transplant recipients. *Chest*, 110(1):89–96, 1996.
- [424] Venge, P et al. Epithelial injury by human eosinophils. *Am Rev Respir Dis*, 138:s54–57, 1988.
- [425] Peterson, C et al. A new method for the quantification of neutrophil and eosinophil cationic proteins in feces: establishment of normal levels and clinical application in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*, 97(7):1755–1762, 2002.
- [426] De Hoyos, A et al. Prospective assessment of a standardized pathologic grading system for acute rejection in lung transplantation. *Lancet*, 103:1813–1818, 1993.

- [427] Gregson, A et al. Bronchoalveolar immunologic profile of acute human lung transplant allograft rejection. *Transplantation*, 85:1056–1059, 2008.
- [428] Shenoy, K et al. Low CD4/CD8 ratio in bronchus-associated lymphoid tissue is associated with lung allograft rejection. *J Transplant*, 2012.
- [429] Löfdahl, J et al. Bronchoalveolar lavage in COPD: fluid recovery correlates with the degree of emphysema. *Eur Respir J*, 25:275–281, 2005.
- [430] Vina, J et al. Role of mitochondrial oxidative stress to explain the different longevity between genders: protective effect of estrogens. *Free Radic Res*, 40:1359–1365, 2006.
- [431] Mishra, V, Di Angelo, S, and Silveyra, P. Sex-specific IL-6-associated signaling activation in ozone-induced lung inflammation. *Biol Sex Differ*, 7, 2016.
- [432] Voltz, J et al. Male sex hormones exacerbate lung function impairment after bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 39:45–52, 2008.
- [433] Card, J et al. Gender differences in murine airway responsiveness and lipopolysaccharide-induced inflammation. *Immunol*, 177(1):621–630, 2006.
- [434] Durrani, F et al. Gonadal hormones and oxidative stress interaction differentially affects survival of male and female mice after lung *Klebsiella pneumoniae* infection. *Exp Lung Res*, 38:165–172, 2012.
- [435] Quinlan, J. *C4.5: Programs for Machine Learning*, volume 16. Morgan Kaufmann Publishers, fourth edition, 1993.

Publikationen

Wissenschaftliche Artikel

1. Pak*, O, Scheibe*, S, Esfandiary, A, Gierhardt, M, Sydykov, A, Logan, A, Fysikopoulos, A, Veit, F, Hecker, M, Kroschel, F, Quanz, K, Erb, A, Schäfer, K, Fassbinder, M, Alebrahimdehkordi, N, Ghofrani, H, Schermuly, R, Brandes, R, Seeger, W, Murphy, M, Weissmann, N and Sommer, N. Impact of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ on hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Eur Respir J*, pii: 1701024, 2018
2. Seimetz*, M, Bednorz*, M, Parajuli, N, Pichl, A, Kojonazarov, B, Kostin, S, Wilhelm, J, Pak, O, Scheibe, S, Fysikopoulos, A, Klepetko, W, Jaksch, P, Schermuly, RT, Ghofrani, HA, Karnati, S, Baumgart-Vogt, E, Seeger, W, Schröder, K. Brandes RP and Weissmann, N. Deletion of the Non-phagocytic NADPH Oxidase Subunit NOXO1 Protects from Development of Smoke-induced Emphysema and Pulmonary Hypertension. Manuskript eingereicht. 2018
3. Sommer*, N, Hüttemann*, M, Pak, O, Scheibe, S, Knöpp, F, Sinkler, C, Malczyk, M, Gierhardt, M, Esfandiary, A, Kraut, S, Jonas, F, Veith, C, Aras, S, Sydykov, A, Alebrahimdehkordi, N, Giehl, K, Hecker, M, Brandes, R, Seeger, W and Weissmann, N. Mitochondrial Complex IV Subunit 4 Isoform 2 Is Essential for Acute Pulmonary Oxygen Sensing. *Circ Res*, 121:424–438, 2017
4. Eder*, K, Siebers, M, Most, E, Scheibe, S, Weissmann, N and Gessner, D. An excess dietary vitamin E concentration does not influence Nrf2 signaling in the liver of rats fed either soybean oil or salmon oil. *J Nutr Metab*, 14:71, 2017
5. Tomasovic*, A, Kurrle*, N, Wempe, F, De-Zolt, S, Scheibe, S, Koli, K, Serchinger, M, Schnütgen, F, Sürün, D, Sterner-Kock, A, Weissmann, N and von Melchner H. Ltbp4 regulates Pdgfr β expression via TGF β -dependent modulation of Nrf2 transcription factor function. *Matrix Biol*, 59:109–120, 2017
6. Tomasovic*, A, Kurrle*, N, Sürün, D, Heidler, J, Husnjak, K, Poser, I, Schnütgen, F, Scheibe, S, Seimetz, M, Jaksch, P, Hyman, A, Weissmann, N and von Melchner H. Sestrin 2 regulates PDGFR β expression by modulating proteasomal and Nrf2 transcription factor functions. *J Biol Chem*, 290:9738–9752, 2015
7. Heidler*, J, Fysikopoulos*, A, Wempe*, F, Seimetz, M, Bangsow, T, Tomasovic, A, Veit, F, Scheibe, S, Pichl, A, Weisel, F, Lloyd, K, Jaksch, P, Klepetko, W, Weissmann, N and

von Melchner H. Sestrin-2, a repressor of PDGFR β signalling, promotes cigarette-smoke-induced pulmonary emphysema in mice and is upregulated in individuals with COPD. *Dis Model Mech*, 6:1378–1387, 2013

Konferenzbeiträge (Auswahl)

1. Scheibe*, S, Pak, O, Esfandiary, A, Sydykov, A, Murphy, MP, Seeger, W, Weissmann, N and Sommer, N: The role of mitochondrial reactive oxygen species in the response of the pulmonary vasculature to hypoxia and right heart remodeling. Posterpräsentation. *19th Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International (SFRR-I)*. 2018. Lissabon, Portugal
2. Scheibe*, S, Pak, O, Murphy, MP, Ghofrani, HA, Seeger, W, Grimminger, F, Schermuly, RT, Weissmann, N and Sommer, N: The role of mitochondrial reactive oxygen species in the response of the pulmonary vasculature to hypoxia and right heart remodeling. Posterpräsentation. *Oxygen Club California World Congress (OCC) and Society for Free Radical Research Europe (SFRR-E) Conference: Metabolic Stress and Redox Regulation*. 2017. Berlin, Deutschland
3. Scheibe*, S, Pak, O, Murphy, MP, Ghofrani, HA, Seeger, W, Grimminger, F, Schermuly, RT, Weissmann, N and Sommer, N: The role of mitochondrial reactive oxygen species in the response of the pulmonary vasculature to hypoxia and right heart remodeling. Posterpräsentation. *ECCPS-Symposium: New Perspectives in Cardio-Pulmonary Research*. 2017. Bad Nauheim, Deutschland
4. Scheibe, S: The role of mitochondrial reactive oxygen species in the response of the pulmonary vasculature to hypoxia and right heart remodeling. Vortrag. *Gordon Research Conference (GRC): Oxidative Stress & Disease*. 2017. Lucca, Italien
5. Scheibe*, S, Pak, O, Murphy, MP, Ghofrani, HA, Seeger, W, Grimminger, F, Schermuly, RT, Weissmann, N and Sommer, N: The role of mitochondrial reactive oxygen species in the response of the pulmonary vasculature to hypoxia and right heart remodeling. Posterpräsentation. *96th Annual of the Meeting Deutsche Physiologische Gesellschaft (DPG)*. 2017. Greifswald, Deutschland
6. Scheibe*, S, Pak, O, Murphy, MP, Ghofrani, HA, Seeger, W, Grimminger, F, Schermuly, RT, Weissmann, N and Sommer, N: Mitochondria-targeted antioxidant MitoQ intercepts superoxide radical formation under acute hypoxia. Posterpräsentation. *Annual Meeting of the Society for Free Radical Research Europe (SFRR-E): Cell and Developmental Biology*. 2016. Budapest, Ungarn

7. Scheibe*, S, Pak, O, Murphy, MP, Ghofrani, HA, Seeger, W, Grimminger, F, Schermuly, RT, Weissmann, N and Sommer, N: Evaluation of the oxidative stress in murine pulmonary arterial smooth muscle cells and lung tissue by electron paramagnetic resonance spectroscopy. Posterpräsentation. *Oxygen Club California World Congress (OCC): Oxidants and Antioxidants in Biology*. 2015. Valencia, Spanien
8. Scheibe, S: Oxygen sensing and redox-signaling in pulmonary systems. Vortrag. *International Autumn School: Biology Feat Engeneering*. 2014. Marburg, Deutschland
9. Scheibe*, S, Veit, F, Ghofrani, HA, Seeger, W, Grimminger, F, Schermuly, RT and Weissmann, N: EPR for Quantitative Determination of Reactive Oxygen Species in the Pulmonary System. Posterpräsentation. *PVRI/ECCPS Joint Conference*. 2014. Bad Nauheim, Deutschland
10. Scheibe*, S, Veit, F, Sommer, N, Ghofrani, HA, Seeger, W, Grimminger, F, Schermuly, RT and Weissmann, N: Detection of reactive oxygen species in the pulmonary system using electron spin resonance. Posterpräsentation. *6th Annual GGL Conference*. 2013. Gießen, Deutschland
11. Scheibe, S: Validation of cyclic hydroxylamines for quantitative measurement of reactive oxygen species in pulmonary systems by EPR. Vortrag. *International Summer School: Women in Optics*. 2013. Sfax, Tunesien
12. Scheibe, S: A sensitive method for quantitative measurement of reactive oxygen species in pulmonary systems. Vortrag. *Scimento Netzwerktreffen*. 2013. Frankfurt/Main, Deutschland
13. Scheibe*, S, Veit, F, Ghofrani, HA, Seeger, W, Grimminger, F, Schermuly, RT and Weissmann, N: A sensitive method for quantitative measurement of reactive oxygen species in pulmonary systems. Posterpräsentation. *5th Annual GGL Conference*. 2012. Gießen, Deutschland

Danksagung

Allen voran danke ich Prof. Dr. Norbert Weißmann für die Möglichkeit, die Dissertation in seiner Arbeitsgruppe am „Excellence Cluster Cardio-Pulmonary System“ durchzuführen.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Thomas Wilke vom Institut für Tierökologie und Spezielle Zoologie des Interdisziplinären Forschungszentrums der Justus-Liebig-Universität Gießen für die Betreuung im Fachbereich Biologie.

Ebenso möchte ich Dr. Natascha Sommer für ihre Unterstützung in der Endphase der Dissertation, die in zahlreichen Diskussionen vermittelten Anregungen sowie die Korrektur meiner Promotionsarbeit danken.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Konstantin Mayer, Prof. Dr. Jürgen Lohmeyer, Prof. Dr. Stefan Gattenlöhner, Dr. Stefan Kuhnert und Maike Barowski für die hervorragende Kooperation während der Durchführung der klinischen Studie „Detektion von reaktiven Sauerstoffspezies mittels Elektronen-Spin-Resonanz Spektroskopie in der bronchoalveolären Lavage Flüssigkeit von lungentransplantierten Patienten“. Herzlicher Dank gilt ebenso der hämatologisch-technischen Assistentin Elena Roth des Infektionslabors von Prof. Dr. Jürgen Lohmeyer für die zytologische Analyse sowie Julia Bespalowa für ihre Unterstützung bei den fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen von Patienten-BALs.

Außerdem bedanke ich mich bei Dr. Jochen Wilhelm, der mir mit seiner steten Diskussionsbereitschaft sowie seinen konstruktiven Hilfestellungen in statistischen Fragen und der Entwicklung von Lösungsansätzen zur Seite stand.

Alexandra Erb danke ich für die gemeinsame Realisierung des Pilotversuchs der ILU-ESR. Außerdem danke ich Dr. Monika Brosien für die Koordination der Zellkultur und Optimierung des Protokolls für die Zellisolierung von mPASC. Überdies möchte ich mich besonders bei jenen Mitarbeitern bedanken, die mich in der Anfangszeit meiner Dissertation beraten oder unterstützt haben.

Darüber hinaus danke ich den technischen Assistenten Ingrid Breitenborn-Müller, Carmen Homberger, Elisabeth Kappes, Andrea Mohr, Karin Quanz und Nils Schupp für ihre Unterstützung bei der Durchführung diverser Experimente.

Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. Klaus Eder und Dr. Denise Geßner des Instituts für Tierernährung und Ernährungsphysiologie für die Zusammenarbeit hinsichtlich der Fragestellung des Effekts von Vitamin E als Nahrungsergänzung auf das endogene, antioxidative System sowie für das zur Verfügung stellen der Wildtyp und Nrf2-KO Fibroblasten durch unseren Kooperationspartner Prof. Dr. Harald von Melchner der Abteilung für Molekulare Hämatologie des

Universitätsklinikums Frankfurt/Main danken.

Mein besonderer Dank gilt Hugo Mildenerger für seine Motivation, Stärkung und Geduld, aber auch die vielen wissenschaftlichen Diskussionen und kreativen Ideen. Außerdem danke ich ihm für die Unterstützung sowohl bei der Modellierung komplexer Datensätze als auch der Umsetzung technisch schwieriger Versuchsansätze.

Bei Henrik Hass bedanke ich mich für die Übersetzung der Zusammenfassung der Dissertation ins Englische.

Ich danke auf das Herzlichste meinen Eltern für die umfassende Unterstützung während der gesamten Promotionsphase.

Eigenständigkeitserklärung

„Ich, Susan Scheibe, erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten“.

Datum:

Unterschrift: