

**Detektion von reaktiven Sauerstoffspezies an isoliert  
perfundiert und ventilierten Kaninchenlungen mittels  
Elektronenspinresonanz-Spektroskopie**

**Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**vorgelegt von Vedat Tiyerili  
aus Duisburg**

**Giessen 2009**

**Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin  
(Medizinische Klinik II) des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Leiter: Prof. Dr. med. Werner Seeger**

- 1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Norbert Weißmann**
- 2. Gutachter: Prof. Dr. med. Alexander Langheinrich**

**Tag der Disputation: 10. Februar 2009**

**Meinen Eltern gewidmet**

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, 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 oder nicht 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.“

Duisburg, den 01.08.2008

Vedat Tiyerili

# Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-Benzosulfonyl-Fluorid-Hydrochlorid
ARDS	Adult Respiratory Distress Syndrome
AU	Arbitrary Units/willkürliche Einheiten
Ca	Kalzium
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CPH	1-Hydroxy-3-Carboxy-2,2,5,5-Tetramethylpyrrolidine
CP <sup>•</sup>	3-Carboxy-Proxyl Radikal
DETC	Diethyldithiocarbamate
DFO	Deferoxamin
DMPO	5,5-Dimethyl-1-Pyrrolin-N-Oxid
DEPMPO	5-Diethoxyphosphoryl-5-Methyl-1-Pyrrolin-N-Oxid
DPI	Diphenyleneidonium
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ESR	Elektronenspinresonanz
ΔPAP	Pulmonalarterielle Druckdifferenz
μM	Mikromolar
HOCl	hypochlorige Säure
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HPV	hypoxische pulmonale Vasokonstriktion
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
KHK	koronare Herzerkrankung
kg	Kilogramm

LVP	linksvenöser Druck
min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilber
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Experimente
N	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NADPH	reduziertes Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NO <sup>•</sup>	Stickstoffoxidradikal
ONOO <sup>•-</sup>	Peroxynitritradikal
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Superoxid-Radikal
OH <sup>•-</sup>	Hydroxylradikal
P	Druck
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentrationen
PAP	Pulmonalarterieller Druck
PEEP	Positiver endexpiratorischer Druck
PMA	Phorbol-12-Myristate-13-Azetat
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
SOD	Superoxiddismutase
U	Einheit
VP	Ventilationsdruck

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>3</b>
1.1. Rolle von Sauerstoffradikalen in biologischen Systemen.....	3
1.2. Pathophysiologie der reaktiven Sauerstoffspezies.....	4
1.3. Regulation und medizinische Relevanz der HPV.....	7
1.4. Die Elektronenspinresonanzspektroskopie (ESR) .....	12
1.5. Die Spintrapping-Technik.....	13
1.6. Arbeitshypothesen.....	14
1.7. Zielsetzung der vorliegenden Doktorarbeit.....	16
<b>2. Material.....</b>	<b>18</b>
2.1. Agenzien und Pharmaka.....	18
2.2. Geräte und Hilfsmittel.....	19
<b>3. Methoden.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1. Das Modell der isolierten Kaninchenlunge.....</b>	<b>20</b>
3.1.1. Einführung.....	20
3.1.2. Aufbau des Arbeitsplatzes.....	21
3.1.3. Präparation der isolierten Lunge.....	25
3.1.4. Integration der Lunge in das Messsystem.....	26
3.1.5. Vorbereitung und Reinigung des Perfusionssystems.....	28
<b>3.2. Die Methode der Elektronenspinresonanzspektroskopie (ESR).....</b>	<b>30</b>
3.2.1. Apparative Grundlagen.....	30
3.2.2. Messung von reaktiven Sauerstoffspezies durch ESR.....	34
3.2.3. Eigenschaften der Spinprobe CPH.....	38
3.2.4. Durchführung der ESR-Messungen.....	40

<b>3.3. Statistik.....</b>	<b>41</b>
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>42</b>
4.1. ESR Signalintensität unter Baselinebedingungen und in Gegenwart von FeCl <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	42
4.2. Hypoxieabhängigkeit der Superoxidfreisetzung und der vasokonstriktiven Antwort.....	43
4.3. PMA-induzierte Superoxidfreisetzung unter normoxischer Ventilation.....	45
4.4. PMA-induzierter Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes.....	49
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>50</b>
5.1. Methodische Aspekte.....	50
5.2. Superoxidfreisetzung und Sauerstoffabhängigkeit.....	53
5.3. Superoxidfreisetzung und die Rolle von NADPH-Oxidasen.....	54
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>58</b>
<b>7. Summary.....</b>	<b>60</b>
<b>8. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>62</b>
<b>9. Publikationsverzeichnis.....</b>	<b>74</b>
<b>10. Danksagung.....</b>	<b>75</b>
<b>11. Lebenslauf.....</b>	<b>76</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Rolle von Sauerstoffradikalen in biologischen Systemen

Radikale sind Atome, Moleküle oder Substanzen, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen in ihrer äußersten Hülle aufweisen. Radikale, die sich von Sauerstoff ableiten lassen, bezeichnet man auch als reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Reaktive Sauerstoffspezies spielen eine wichtige Rolle in biologischen Systemen. Ihnen wird bei oxidativem Stress und einer Reihe von Krankheiten eine wichtige Rolle zugeschrieben. Koronare Herzkrankheit (KHK), akutes Atemnotsyndrom (ARDS), Schlafapnoe, Sepsis, Atherosklerose, Myokardinfarkt, Schlaganfall und Krebserkrankungen sind Beispiele für Erkrankungen, bei denen durch ROS übermittelter oxidativer Streß auftritt [1-6].

Weiterhin spielen ROS eine wichtige Rolle in physiologischen Prozessen. Zum Beispiel entstehen bei der Signaltransduktion verschiedener Regulationsvorgänge ROS. Sie fungieren als „second messenger“, stellen chemotaktische Faktoren bei entzündlichen Prozessen dar und dienen der Abwehr von Bakterien durch phagozytierende Zellen [7-8].

Ferner spielen ROS eine zentrale Rolle bei Ischämie/Reperfusionsschäden. Klinisch relevante Erkrankungen sind in diesem Zusammenhang Lungenembolien und das ARDS. Auch bei der Lungentransplantation wird ROS eine zentrale Bedeutung für das Auftreten von Ischämie/Reperfusionsschäden beigemessen. Auch in anderen Organen spielen ROS im Rahmen des Ischämie/Reperfusionsschadens ebenfalls eine Rolle. Radikalbildung und Radikalentgiftung halten im ausbalancierten Stoffwechsel das Gleichgewicht. Durch vermehrte Bildung von ROS und/oder verringerte antioxidative Kapazität kommt es zum Überwiegen der ROS und dadurch letztlich zum oxidativem Stress. In zahlreichen vorherigen Studien wurde die Bedeutung von oxidativem Stress und die Rolle von ROS an der isolierten Lunge intensiv untersucht [9-17].

## 1.2. Pathophysiologie der reaktiven Sauerstoffspezies

Zu den ROS werden radikalische Sauerstoffabkömmlinge (Hydroxylradikal ( $\text{OH}^{\cdot-}$ ), Superoxidanionradikal ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), Stickstoffoxidradikal ( $\text{NO}^{\cdot}$ )), sowie nicht-radikalische Sauerstoffabkömmlinge (Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^{\cdot-}$ ), hypochlorige Säure ( $\text{HOCl}$ )) gezählt. Superoxidanionen entstehen durch univalente Reduktion von molekularem Sauerstoff. Die Reduktion von Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ) zum  $\text{O}_2^{\cdot-}$  ist die grundlegende Reaktion für die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies [1,2,18,19].

Auf Grund ihrer geringen Halbwertszeit und ihrer Polarität sind ROS nicht in der Lage, intrazellulär größere Strecken zurückzulegen bzw. Membranen zu durchdringen. In wässriger Lösung, besonderes bei saurem pH-Wert, dismutieren die Superoxidanionen spontan zu Wasserstoffperoxid und liefern damit einen Ausgangsstoff für die OH-Generierung durch die Fenton-Reaktion. Diese Reaktion kann durch das Enzym Superoxiddismutase (SOD) beschleunigt werden. SOD katalysiert die Dismutation von Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid. Diese Reaktion läuft sehr schnell ab, so dass in den Zellen gebildete Superoxidanionen gleich am Ort des Entstehens abgefangen werden können. SOD kommt in verschiedenen Formen vor. Es handelt sich um verschiedene Metallenzyme mit unterschiedlichen katalytischen Zentren. Neben der mitochondrialen Mangan-SOD macht die Kupfer-Zink-SOD den Hauptanteil bei Säugetieren aus. SOD kommt in stoffwechselaktiven Organen wie Herz, Lunge und Leber mit einer hohen Konzentration vor. SOD liegt hauptsächlich intrazellulär und zytoplasmatisch und ist nicht membranpermeabel [20-22].

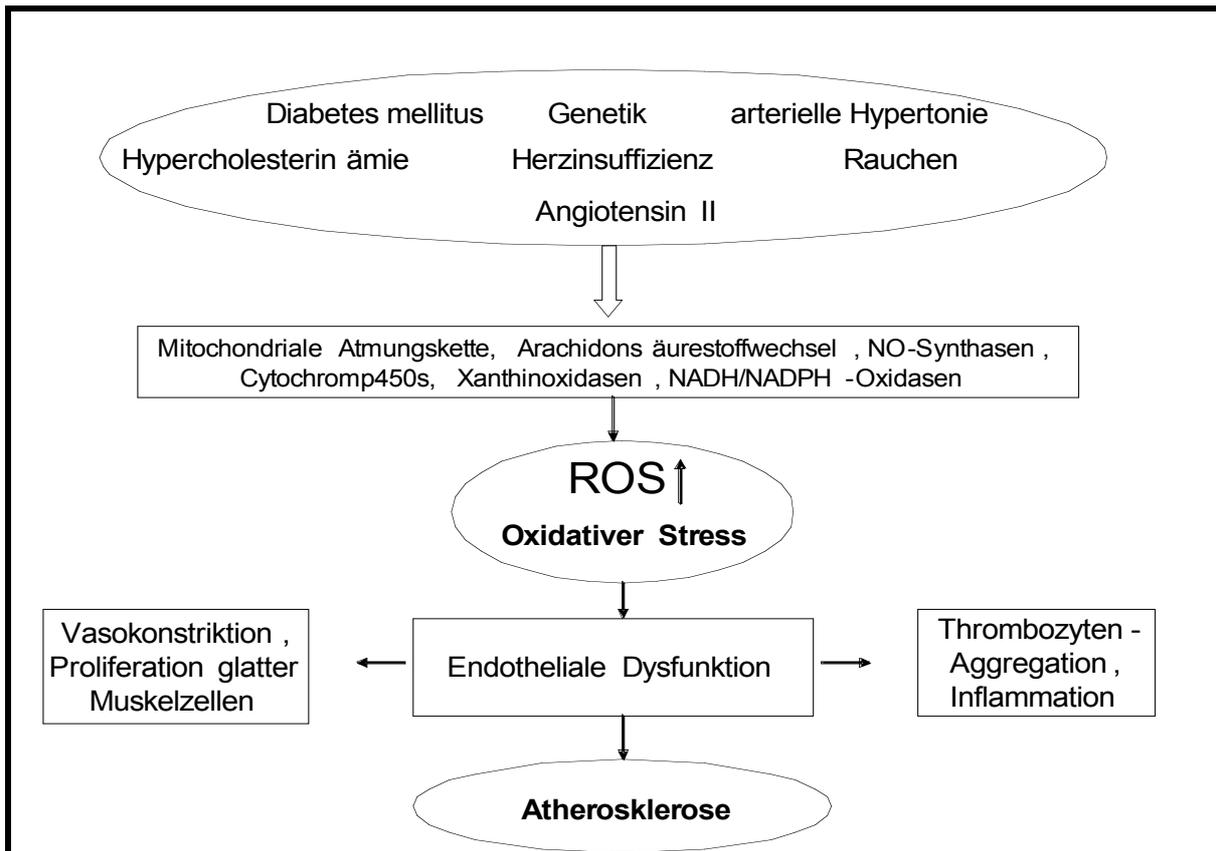
Wasserstoffperoxid ist ein starkes Zellgift, dessen Toxizität hauptsächlich durch physiologische Reduktionsmittel (Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ), Kupfer ( $\text{Cu}^+$ )) katalysierte Fenton-Reaktion und die damit verbundene Bildung von reaktiven Hydroxylradikalen zurückzuführen ist.  $\text{OH}^{\cdot-}$  zählt zu den aggressivsten Sauerstoffradikalen. Durch sein stark positives Redoxpotential ist es eines der stärksten Oxidationsmittel in wässrigen Lösungen [23-27].

Zu den Aufgaben des intakten Endothels zählen u.a. die Regulation des Gefäßwandtonuses durch Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO), Prostacyclin und Endothelin. NO spielt eine wichtige antiatherogene Rolle (Vasodilatation, Hemmung von Thrombozyten, Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen und

Leukozytenadhäsion). Unter physiologischen Bedingungen besteht ein Gleichgewicht zwischen vaskulär gebildete  $\text{NO}$  und  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . In der vasomotorischen Regulation kommt dem  $\text{NO}$  eine Bedeutung zu. Drei Isoenzyme, die kalziumabhängigen eNOS und nNOS, sowie die induzierbare, kalziumunabhängige iNOS, synthetisieren  $\text{NO}$  aus L-Arginin. Durch Stimulation der Guanylatzyklase entfaltet  $\text{NO}$  seine dilatierende Wirkung an der glatten Gefäßmuskelzelle. Eine verminderte bzw. fehlende  $\text{NO}$ -Aktivität spielt wahrscheinlich eine bedeutsame Rolle in der Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion. Dies prädisponiert z.B. die Entwicklung einer Atherosklerose. Eine verminderte Expression von der in Endothelzellen vorkommenden  $\text{NO}$ -Synthase kann hierfür verantwortlich sein. Bei Erkrankungen wie arterieller Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus und Nikotinabusus führen ROS zur Inaktivierung von  $\text{NO}^{\cdot}$  in der Gefäßwand [1-2,28-31].

In der Reaktion der Radikale  $\text{O}_2^{\cdot-}$  und  $\text{NO}^{\cdot}$  entsteht das Peroxynitritradikal ( $\text{ONOO}^{\cdot-}$ ). Dabei wird das  $\text{NO}^{\cdot}$  inaktiviert. Peroxynitratradikale haben die Fähigkeit zur verschiedenen Reaktionen wie z.B. Oxidation, Nitrosylierung, Nitrierung und Hydroxylierung. Bei pathophysiologisch erhöhter ROS-Bildung wird die Verfügbarkeit von  $\text{NO}$  durch Peroxynitritbildung herabgesetzt. Als Apoptoseinduktor scheint das Peroxynitritradikal an der Pathogenese von verschiedenen Erkrankungen wie z.B. Asthma bronchiale, Herzinsuffizienz oder Atherosklerose beteiligt zu sein [27,32-40].

Abbildung 1.1 zeigt schematisch die Entwicklung einer durch oxidativen Stress induzierten endothelialen Dysfunktion in Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen.



**Abb. 1.1.:** Risikofaktoren für oxidativen Stress und pathophysiologische Auswirkungen [1]

Jedoch gibt es auch Hinweise das ROS als Signalmoleküle in physiologischen Prozessen wie z.B. Zellproliferation und Zelldifferenzierung eine Rolle spielen. So wird gegenwärtig eine mögliche Bedeutung der ROS an der Signalübermittlung von Hypoxie-Zuständen diskutiert. Im pulmonalen System wird vermutet, dass die ROS unter Hypoxie zu einer Ventilations-Perfusions-Anpassung und dadurch zur Entstehung einer hypoxie-induzierten Vasokonstriktion führt. Ob ROS während alveolärer Hypoxie vermindert oder paradoxerweise vermehrt freigesetzt werden und von welcher Quelle sich die ROS ableiten lassen wird derzeit kontrovers diskutiert. Tatsache ist, dass hinreichende Beweise sowohl für eine Abnahme als auch für eine Zunahme von ROS in der Lunge während einer alveolären Hypoxie existieren [1,6,41-45].

ROS können durch zahlreiche Systeme generiert werden. Im Rahmen der hypoxisch pulmonalen Vasokonstriktion (HPV) kommen sowohl die Mitochondrien als auch NADPH-Oxidasen als mögliche Quelle für die ROS-Generierung in Frage. NADPH-Oxidasen übertragen in einem zweistufigen Reaktionsprozess Elektronen von NADPH auf  $O_2$ , was zur Bildung von Superoxidanionen führt [42-43,45-50].

### 1.3. Regulation und medizinische Relevanz der HPV

Die Bedeutung der HPV für den Gasaustausch wurde erstmalig durch von Euler und Liljestrand an der Katze beschrieben. Aus diesem Grunde wird seither die Bezeichnung von Euler-Liljestrand-Mechanismus und HPV synonym verwendet. Die HPV konnte bei allen bis heute daraufhin untersuchten Säugetieren, einschließlich des Menschen nachgewiesen werden. Es handelt sich um einen ubiquitär in der Lunge vorhandenen Mechanismus. Seine Bedeutung liegt darin, den pulmonalen Gasaustausch zu optimieren [41-42,51-57].

Physiologischerweise findet man in der Lunge neben gut belüfteten auch weniger gut belüftete Areale. Innerhalb dieser Bereiche ist die Oxygenierung des Blutes nicht optimal gewährleistet. Es kommt zu einem Shuntfluß, d.h. Blut fließt durch den pulmonalen Kreislauf ohne dabei ausreichend mit Sauerstoff angereichert zu werden. Um trotzdem eine optimale Oxygenierung des Blutes zu gewährleisten greift an dieser Stelle die HPV ein. Die HPV passt die pulmonale Perfusion der Ventilation an. So werden z.B. alveolär minderventillierte hypoxische Lungenareale weitgehend von der Blutperfusion ausgeschlossen.

Werden nun Bereiche in der Lunge schlecht oder nicht ventiliert, kommt es zu einer starken Verminderung der Sauerstoffpartialdruckdifferenz zwischen Alveolen und gemischtvenösem Blut, so dass diese Areale aufgrund mangelnden Sauerstoffdiffusionsgefälles gar nicht mehr, oder nur noch partiell zur Oxygenierung beitragen. Blut aus diesen Bezirken verlässt die Lunge mit unzureichender Sauerstoffbeladung. Das Vorliegen schlecht ventilerter oder von der Ventilation ausgeschlossener Lungenareale ist als normale physiologische Gegebenheit anzusehen. Die HPV führt zur Erhöhung des vaskulären Widerstandes in präkapillaren, muskularisierten Arteriolen, die innerhalb der hypoxischen Lungenazini lokalisiert sind. Der erhöhte Widerstand führt zu einer Umverteilung des Blutes und zu einer erhöhten Perfusion in besser ventilierten Lungenabschnitten. Bei physiologisch temporär hypoventilierten und atelektatischen Lungenabschnitten gewährleistet die HPV als ein essentieller Mechanismus eine optimale Oxygenierung des Blutes und minimales Shuntvolumen. Auch bei einer Atelektasebildung, bei der die Grenze vom physiologischen zum pathologischen überschritten wird, kann die HPV eine ausreichende Oxygenierung des Blutes gewährleisten. Insgesamt führt die HPV zur einer Verbesserung der Gasaustauschleistung der Lunge [41,51,58-60].

Die HPV wird derzeit in drei Phasen unterteilt:

Die erste, akute Phase dauert einige Sekunden. Hierbei kommt es zur hypoxischen Vasokonstriktion und zur Optimierung des pulmonalen Gasaustausches durch Anpassung der pulmonalen Perfusion an die Ventilation.

Bei Anhalten der Hypoxie, bzw. bei chronischer alveolärer Hypoxie beginnt die zweite, subakute Phase der HPV. Diese Phase dauert Minuten bis Stunden. Hierbei kann es zur einer weiteren Zunahme der Vasokonstriktion kommen.

Dies führt zur dritten Phase. Durch die Daueraktivierung des Gefäßwandtonuses kommt es zu Umbauprozessen. Das kann z.B. bei der hypoxiebedingten pulmonalen Hypertonie beobachtet werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als „Remodeling“.

Es gibt mehrfach Hinweise das ROS für die Regulation der 3 Phasen eine entscheidende Rolle spielen [41,61-66].

Bis heute ist nicht abschließend geklärt, welche Zellen für die genannten als Sauerstoffsensoren fungieren. Zudem ist unklar welche subzelluläre Struktur diesen darstellt und wie der Mechanismus der inter- oder intrazellulären biochemischen Signaltransduktion bis hin zum Effektor, der Kontraktion der glatten Muskulatur funktioniert. Ein Verständnis dieses essenziellen Mechanismus ist von sehr großen Interesse, denn sowohl eine Störung mit Verlust der HPV, als auch ihre generalisierte Aktivierung führt zu häufigen, teil schwerwiegenden klinischen Krankheitsbildern. Ein Beispiel ist die pulmonale Hypertonie [41,59,67].

Eine weitgehende Kenntnis der Regulationsvorgänge ist jedoch für spezifische therapeutische Interventionen unabdingbar. Zu einer Störung oder dem Ausfall der HPV kann es unter anderem bei Erkrankungen wie der Pneumonie, der Sepsis, dem ARDS und in seltenen Fällen der Leberzirrhose kommen. Die Möglichkeit einer HPV-spezifischen Intervention zur Senkung des Shuntvolumens ist daher von großem Interesse [56,68-70].

Die bei Gesunden physiologisch sinnvolle Vasokonstriktion in Bereichen hypoxischer Alveolen führt unter chronischer Hypoxie zur massiven Verringerung des Gesamtquerschnittes der pulmonalen Strombahn. Dadurch steigt der Druck im Lungenkreislauf und es kommt zu einer sogenannten pulmonalen Hypertonie. Abbildung 1.2. zeigt eine Originalaufzeichnung des arteriellen Druckverlaufes einer hypoxieinduzierten pulmonalen Vasokonstriktion. Die Widerstandszunahme führt zur

Erhöhung des pulmonalarteriellen Druckes (PAP), weil die Kontinuität des Herzzeitvolumens des rechten Ventrikels eine physiologische Notwendigkeit darstellt und erst mit der Entwicklung einer Herzinsuffizienz abnimmt. Zusätzlich kommt es zu einem Umbau der Lungengefäße mit Hypertrophie und Hyperplasie der Gefäßmuskulatur. Der nicht für Druckbelastung angelegte rechte Ventrikel hypertrophiert bei chronischer Belastung und es entwickelt sich ein Cor pulmonale. Eine globale alveoläre Hypoxie mit Rechtsherzbelastung findet sich auch bei Menschen, die in großer Höhe leben. Das in großer Höhe auftretende Höhenödem der Lunge ist möglicherweise auf eine ungleichmäßige HPV zurückzuführen [68-70].

Die Lokalisation der HPV wird durch die anatomische Struktur der Lunge determiniert. Die die Alveolen lakunenartig umschließende Kapillarstrombahn sind präkapilläre, muskularisierte Gefäße vorgeschaltet. Diese versorgen die abhängigen Azini. Muskularisierte Arteriolen und Bronchioli terminalis eines Azinus liegen in enger räumlicher Beziehung zueinander, und es gibt Areale im Bereich des Eintrittes der Arteriole in den Azinus, an denen abhängige Alveolen direkt der Gefäßwand anliegen. Dieser Bereich ist nach der gegenwärtigen Vorstellung das morphologische Korrelat dafür, dass ein alveoläres Hypoxiesignal zur Perfusionsminderung in der zugehörigen Kapillarstrombahn führt. Der direkte alveolo-arterioläre Kontakt ist die Voraussetzung für die Hypothese der Regulation der HPV mittels Hypoxie-induzierter oder Hypoxie-inhibierter Mediatorproduktion durch pulmonale Nicht-Muskelzellen, konsekutive Signalvermittlung durch Diffusion der Mediatoren zur glatten Muskulatur der Arteriole und nachfolgender Aktivierung oder Inhibition intrazellulärer Signalsysteme, die zur Kontraktion der glatten Muskelzelle führen [59,69,71].

Diese Mediatorhypothese geht von einem von der glatten Muskelzelle unabhängigen Sauerstoffsensoren aus, wie z.B. die metabolisch leistungsfähigen Endothelzellen, Typ II Pneumozyten oder Alveolarmakrophagen. Im Gegensatz dazu wird bei der Hypothese der Regulation der HPV durch direkte Hypoxiewirkung davon ausgegangen, dass die glatte Muskelzelle den Hypoxiesensoren und Effektor in einem darstellt. Die Signaltransduktion ist dabei also ausschließlich intrazellulär und nicht interzellulär lokalisiert. Zumindest für die akute HPV wird derzeit von der direkten Einwirkung einer Hypoxie auf die glatte Muskelzelle als hinreichenden Stimulus als Auslöser ausgegangen. Zusätzlich ist ein Anstieg des intrazellulären Kalziums messbar. Hierbei ist die Ursprungsquelle des Kalziums nicht hinreichend geklärt. In der Literatur gibt es sowohl Hinweise für einen extrazellulären, als auch für einen

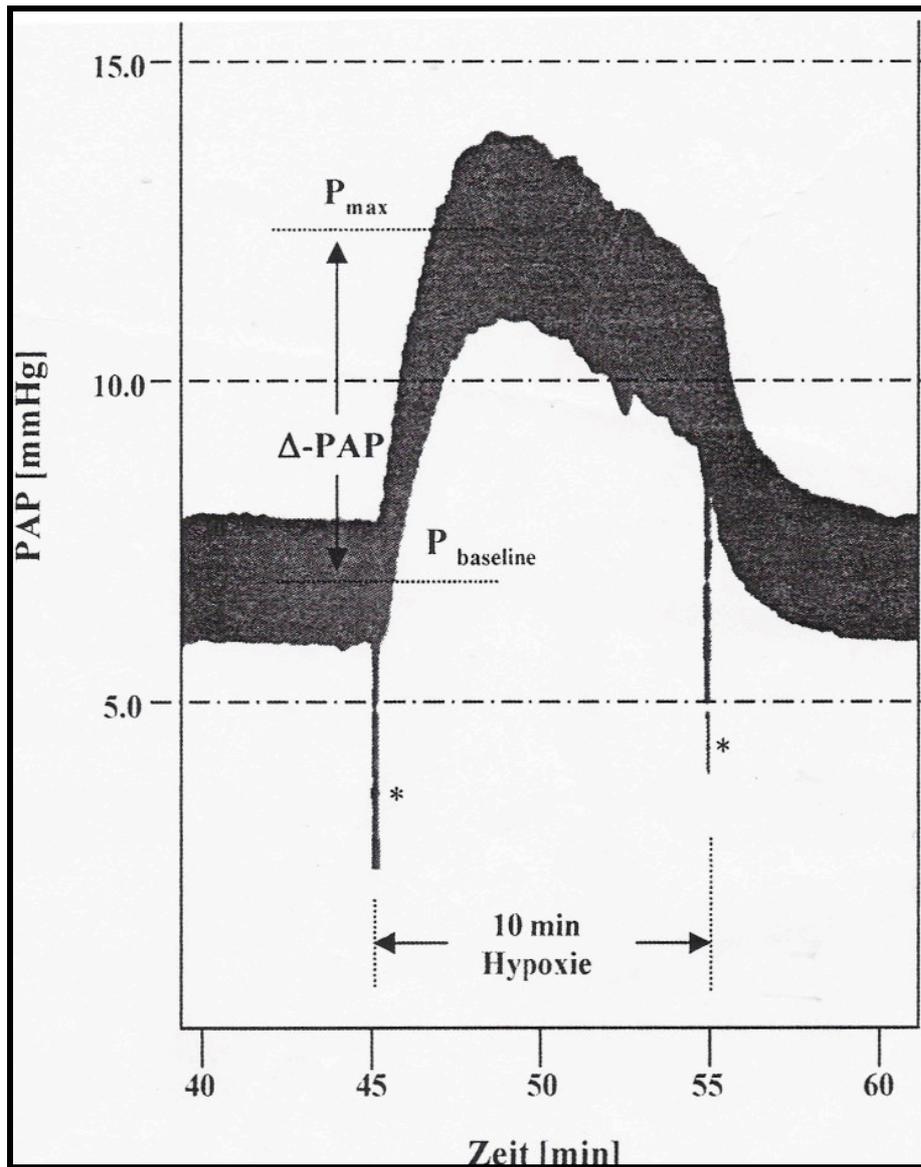
intrazellulären (sarkoplasmatisches Retikulum) Ursprung. Insbesondere in der subakuten Phase der HPV spielen nicht-selektive Kationen-Kanäle und Kalzium-Einstrom eine Rolle. Eine wesentliche Rolle scheint da Depolarisation der Zellen mit konsekutivem Kalzium Einstrom nach Hemmung spannungsabhängiger Kalium-Kanäle zu spielen. Neben Mitochondrien und NADPH-Oxidasen kommen somit auch sauerstoffsensitive Kalzium- oder Kalium-Kanäle als Sauerstoffsensoren in Frage [41,42,57,61,72-91].

Mitochondrien und/oder NADPH-Oxidasen stehen in Diskussion über eine Änderung des Redox-Status der Zelle entsprechende spannungsabhängige Kanäle zu beeinflussen. Als mögliche Vermittler der Änderung des Redox-Status werden sowohl ein direkter Einfluss des Anstiegs oder Abfalls der Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies als auch die Änderung des Verhältnisses von Redox-Paaren diskutiert. Weiterhin spielen vasoaktive Substanzen wie z.B. NO, Angiotensin II, biogene Amine, Metabolite des Arachidonsäurestoffwechsels und Neurotransmitter eine wesentliche modulatorische Rolle in der Regulation der HPV [42,45,92-101].

Es gibt Hinweise dafür, dass innerhalb der Mitochondrien die Enzyme der Atmungskette an der Bildung reaktiver Sauerstoff-Radikale beteiligt sind. Möglicherweise wird der intrazelluläre Kalziumhaushalt auch durch Mitochondrien beeinflusst. Auch die paradoxen Ergebnisse ob es zu einem Anstieg bzw. Abfall von ROS bei Hypoxie kommt ist Bestandteil vieler Diskussionen [101].

Eine Vielzahl der physiologisch vasoaktiven Substanzen und Mediatoren wurde seit der Publikation des Euler-Liljestrand-Mechanismus untersucht. Basierend auf diesen Ergebnissen konzentriert sich die Forschung zum jetzigen Zeitpunkt auf folgende Mediatoren oder Regulationsvorgänge [42,102]:

- a) Sauerstoffradikale und deren Metabolite
- b) NO und seine Metabolite
- c) Zyklische Nucleotidmonophosphate und diese regulierende Enzymsysteme
- d) Membranständige Ionenkanalproteine
- e) intrazelluläre Kalzium-Homöostase



**Abb.1.2:** Originalaufzeichnung des arteriellen Druckverlaufes der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion einer isoliert ventiliert und perfundierten Kaninchenlunge. Eingezeichnet ist die pulmonalarterielle Druckanstiegsdifferenz ( $\Delta$  PAP) zwischen Basisdruck ( $P_{\text{baseline}}$ =normoxischer Druck) und Maximaldruck ( $P_{\text{max}}$ ). Der Druckanstieg beginnt wenige Sekunden nach Zuführen des hypoxischen Gasmisches, durchläuft ein transientes Maximum und kehrt danach etwa auf ein Ausgangsdruckniveau zurück. Die Abszisse zeigt die fortlaufende Versuchsdauer in Minuten an. Die Ordinate skaliert den pulmonalarteriellen Druck in mmHg.

#### 1.4. Die Elektronenspinresonanzspektroskopie (ESR)

Die Messung von Sauerstoffradikalen ist komplex und die Quantifizierung von reaktiven Sauerstoffspezies in intakten Organen ist größtenteils ungelöst. Ein Nachweis erfolgte bisher überwiegend unter Verwendung von verschiedenen Farbstoffen, wie z.B. Fluorochromen, die aber nur eine begrenzte Spezifität oder Sensitivität sowie unerwünschte Eigeneffekte zeigten. Der Einsatz verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe und die Methode der Chemilumineszenz (Lucigenin-verstärkte Chemilumineszenz, Coelenterazin-verstärkte Chemilumineszenz, Luminol-verstärkte Chemilumineszenz), welche bei Untersuchung isolierter Zellen und von Gewebeschnitten nutzbar sind, ist auch durch begrenzte Spezifität und Sensitivität sowie unerwünschter Eigeneffekte limitiert [9,44,103-108].

Die ESR-Technik ist ein Verfahren, das zur Strukturuntersuchung verschiedener paramagnetischer Substanzen verwendet wird. Paramagnetische Stoffe haben ein magnetisches Moment. Im Wesentlichen sind dies Stoffe mit unpaarigen Elektronen. Wird an eine paramagnetische Substanz von außen ein starkes Magnetfeld angelegt, richten sich die unpaarigen Elektronen in zwei unterschiedlichen Energiezuständen aus, die dem gegensätzlich ausgerichteten Spin entsprechen (Zeemann-Effekt) [109-111].

Dabei entspricht  $-1/2$  der Ausrichtung der Elektronen in Richtung des Magnetfeldes und dem niedrigeren Energiezustand, der mit hoher Wahrscheinlichkeit eingenommen wird.  $+1/2$  entspricht der entgegen gesetzten Ausrichtung und dem höheren Energiezustand der Elektronen. Der Abstand dieser Energiezustände ist der Feldstärke des angelegten Magnetfeldes proportional. Bei Einstrahlung einer elektromagnetischen Welle mit der Frequenz  $\nu$ , die der Differenz dieser Energiezustände entspricht, tritt eine Resonanz-Absorption durch die Elektronen mit dem niederen Energiezustand auf. Diese werden dadurch in den höheren Zustand versetzt. Die sich daraus ergebende Energiedifferenz kann analog der Lichtabsorption in der Spektroskopie gemessen werden. Unterschiedliche paramagnetische Substanzen werden durch ein unterschiedliches Verhältnis von Absorptionsfrequenz zu magnetischer Feldstärke charakterisiert und können dann mit Hilfe des Spektrums quantifiziert werden [109,112-121].

Für das freie Elektron ergibt sich ein Absorptionsspektrum. Dieses Verhältnis ist der sogenannte „g-Faktor“, der mit dem Eigendrehimpuls und mit dem Bahndrehimpuls

verknüpft ist. Die Wechselwirkung von Elektronen mit magnetischen Kernen führt zur Aufspaltung der Resonanzlinie. Diesen Effekt bezeichnet man als „Hyperfeinaufspaltung“. Zur Ermittlung von Resonanz wird entweder die Frequenz bei konstantem Magnetfeld oder die Magnetfeldstärke bei gleichbleibender Frequenz variiert. Sauerstoffradikale haben zwar paramagnetische Eigenschaften und sind deshalb grundsätzlich ein geeignetes Substrat für die Bestimmung mit der ESR-Spektroskopie. In der Praxis wird ihre Bestimmung aber durch ihre Instabilität stark erschwert. Die Radikale werden sofort nach ihrer Entstehung wieder in weniger reaktive Verbindungen umgewandelt. Diese Reaktionsfreudigkeit führt zu einer sehr geringen Halbwertszeit, die eine genaue quantitative Erfassung erschwert [109,112-121].

Nach dem derzeitigen Kenntnisstand ist die ESR-Technik eine für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit eine neue, bisher im Rahmen der Fragestellung nicht angewendete Detektionsmethode. Mit Hilfe der sog. „Spintrapping-Technik“ erlaubt die ESR-Analyse eine quantitative Aussage über die gebildeten ROS und ggf. ihre weitere Differenzierung über unterschiedliche Spektren (Superoxid-Anion vs. Hydroxyl-Radikal) [122].

### **1.5. Die Spintrapping-Technik**

Die Spintrapping-Technik kombiniert mit der ESR-Technik ist derzeit zur Detektion von Superoxidradikalen und Hydroxylradikalen eine gängige Methode. Die Detektion von reaktiven Sauerstoffspezies ist in biologischen Systemen mit einer Vielzahl von Schwierigkeiten verbunden. Die Bestimmung von ROS wird durch Ihre geringe Halbwertszeit limitiert.

Die „Spin-Trapping“ Technik kann zur Aufklärung von Struktur, Kinetik und Bedeutung von ROS in physiologischen bzw. in pathophysiologischen Prozessen dienen. Diese Technik benutzt bestimmte diamagnetische Substanzen (Spinfallen, Spintrap-Moleküle), die mit freien Radikalen reagieren und ein relativ stabiles Produkt (Spinaddukt) bilden, das mit Hilfe der ESR-Spektroskopie erfasst werden kann. Das Spektrum, das für ein solches Addukt gemessen wird, ist dabei sowohl von der Art des Spintrap-Moleküls als auch von den Eigenschaften des gebundenen Radikals abhängig. Die genaue Bestimmung des gebundenen Radikals ist gerade in biologischen Systemen, wo eine Vielzahl verschiedener Radikale gleichzeitig

aufzutreten, unabdingbar. Die Unterscheidung verschiedener Radikale wird dabei durch eine hyperfeine Aufspaltung der Spektrallinien ermöglicht, die für jedes Addukt ein charakteristisches Muster erzeugt. Es gibt verschiedene Spinproben, die zur ESR-Messung eingesetzt werden können. Sie unterscheiden sich in der Sensitivität gegenüber den verschiedenen Radikalen und in ihrer Lebensdauer. Bisher gebräuchliche Spinproben waren die Nitronderivate, wie das 5,5-Dimethyl-1-Pyrrolin-N-Oxid (DMPO), N-Tert-Butyl-Nitron (PBN) 5,5,3-Trimethyl-1-Pyrrolin-N-Oxid (TMPO) und das 5-Diethoxyphosphoryl-5-Methyl-1-Pyrrolin-N-Oxid (DEPMPO) [26,111,123-127].

In isoliert ventiliert und perfundierten Lungen wurden Spinproben wie z.B. 5,5-Dimethyl-1-Pyrrolin-N-Oxid oder Natrium 3,5-Dibromo-4-Ditrosobenzenesulfonat zur Messung von Sauerstoffradikalen verwendet. Die Hauptproblematik dieser Substanzen war die zu einer Tendenz zur Autooxidation und zum anderen eine Interaktion mit Ascorbat im Gewebe [43,50,103,108,128-129].

## 1.6. Arbeitshypothesen

Bisher ist nur für wenige Substanzen der Beweis erbracht worden, dass sie spezifisch in den Sensor- oder Regulationsmechanismus der HPV eingreifen. Die mitochondriale Atmungskette, der Arachidonsäurestoffwechsel, insbesondere die Lipooxygenase und Cyclooxygenase, Cytochrom p450s, Xanthinoxidase, NADH/NADPH-Oxidase, NO-Synthasen und Peroxidasen sind mögliche Quellen für die ROS-Generierung [1,130].

### *NADPH-Oxidasen:*

Die Rolle und Funktion dieser Enzyme ist in der Literatur ausführlich beschrieben. Diese Enzyme sind sowohl in Leukozyten als auch in pulmonal-vaskulären Endothelzellen nachweisbar. In Granulozyten dient die NADPH-Oxidase der zellvermittelten Pathogenabwehr. Reguliert wird die vaskuläre NADH/NADPH-Oxidase durch Zytokine, und durch hormonelle Einflüsse. Stimulation der glatten Gefäßmuskulatur mit Angiotensin II, Thrombin und Tumorstromungsfaktor alpha führt zur erhöhten Aktivität der NADH/NADPH-Aktivität. Der NADPH-Komplex besteht aus mehreren Untereinheiten. Als Grundbaustein der granulozytären NADPH-Oxidasen dient das Cytochrom  $b_{558}$ , bestehend aus den membranständigen Untereinheiten p22-phox und gp91-phox. Die beiden Untereinheiten p47-phox und

p67-phox sind im nicht aktivierten Zustand im Zytosol lokalisiert. Durch Phosphorylierung kommt es zur Aktivierung der p47-phox-Untereinheit und konsekutiv zur Komplexbildung mit der p67-phox-Untereinheit, welches die Superoxidbildung induziert. Diese Reaktion ist Proteinkinase C abhängig. In vaskulären NADPH-Oxidasen wurden auch alle Untereinheiten nachgewiesen. Jedoch zeigen sich im Vergleich zu granulozytären NADPH-Oxidasen funktionelle Unterschiede. So ist in Granulozyten die Aktivität der NADPH-Oxidasen durch Phorbol-12-Myristate-13-Azetat (PMA) sehr schnell und stark beeinflussbar (oxidative burst). In vaskulären Zellen erfolgt die Superoxidbildung eher auf geringerem Niveau [1,6,57,128,131-146].

Es bestehen Hinweise für eine zentrale Rolle der NADPH-Oxidase für die Regulation der HPV. Diese Hinweise basieren zu einem bedeutenden Teil auf Untersuchungen mit Diphenyleneidonium (DPI) und 4-(2-Aminoethyl)-Benzosulfonyl-Fluorid-Hydrochlorid (AEBSF(kompetitiver Inhibitor der NADPH-Oxidase)). Beide Agenzien haben einen spezifisch inhibitorischen Einfluss auf die akute Phase der HPV der isoliert und artifiziell ventilierten, blutfrei perfundierten Kaninchenlunge sowie auf die hypoxisch induzierte Bildung von Superoxidanionen in glatten Muskelzellen der Pulmonalarterie des Kalbes gezeigt. Es ist bekannt, dass der akuten bzw. der protahierten Phase der HPV teilweise unterschiedliche Regulationsmechanismen zu Grunde liegen. Potenziell sind NADPH-Oxidasen mehr an der Regulation der akuten Phase der HPV und Mitochondrien mehr an der Regulation der protahierten Phase der HPV beteiligt ist [23,48, 145,147-150,169].

#### *ROS:*

Vorausgehende Untersuchungen legen nahe, dass durch NADPH-Oxidase generierte Sauerstoffradikale an der Regulation der HPV beteiligt sind. Die bisherigen Untersuchungsergebnisse basieren auf Arbeiten, bei denen der NADPH-Oxidase-Inhibitor DPI eingesetzt wurde. Die Arbeiten belegen eine dosisabhängige vollständige Aufhebung der Hypoxie-induzierten Vasokonstriktion. Eine pharmakologisch induzierte Vasokonstriktion konnte hingegen nicht aufgehoben werden [1-6].

#### *Zytochrom p450-Oxidoreduktase:*

Dieses Enzym ist eine weitere mögliche Quelle für pulmonalgeneriertes Superoxid-Anion bei Hypoxie [1,151].

*Xanthinoxidase:*

Die Xanthinoxidase ist an der Oxidation von Hypoxanthin und Xanthin im Rahmen des Purinstoffwechsels beteiligt. In Endothelzellen ist die Aktivität und Expression abhängig von Interferon gamma. Es ist an der Produktion von  $O_2^{\cdot-}$  und  $H_2O_2$  beteiligt. Wahrscheinlich ist es vorrangig unter Bedingungen eines anoxischen Energiemangels mit ATP-Abbau, und darauffolgender Reperfusion bzw. Reoxygenierung der Lunge von Bedeutung [1,135].

*Endotheliale NO-Synthase:*

Dieses Enzym fördert die Bildung von NO und Superoxidanionen. Die Balance zwischen beiden Radikalen ist offenbar vom Kofaktor Tetrahydrobiopterin abhängig, der eine Koppelung zwischen NADPH-Verbrauch und L-Arginin-Oxidation bewirkt. Eine unzureichende Kopplung dieser Prozesse kann eine vermehrte Superoxid-Produktion bewirken [1,4].

**1.7. Zielsetzung der vorliegenden Doktorarbeit**

Zur Bestimmung des Entstehungsortes und der Freisetzungskinetik von ROS bei Ischämie/Reperfusion und ihrer Beteiligung an der Signaltransduktion bei hypoxisch induzierter Vasokonstriktion wurden Experimente an isoliert ventilierten Kaninchenlungen durchgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch ex-vivo Experimente eine Methode für die Detektion von ROS an isoliert und ventiliert Kaninchenlungen mittels ESR-Spektroskopie etabliert. Aufgrund der geringen chemischen Halbwertszeit der Radikal-Addukte ist die räumliche Nachbarschaft von Messeinheit und Versuchsanordnung des isolierten Lungenmodells notwendig. Mit dem ESR-Spektrometer MS 100 (Magnetech, Berlin, Deutschland) ist die Messung, Quantifizierung und Differenzierung von vaskulär generierten ROS-Molekülen aus dem rezirkulierenden Lungenperfusat möglich.

Als Spinprobe wurde das zyklische CPH (1-Hydroxy-3-Carboxy-Pyrrolidin) verwendet. CPH wurde in den letzten Jahren zur quantitativen Messung von reaktiven Sauerstoffspezies in biologischen Systemen eingeführt. Es gilt als eine sensitive Spinprobe, welche eine Möglichkeit zur Quantifizierung von Superoxiden und Hydroxylradikalen bietet. CPH wird durch ROS nichtspezifisch oxidiert. Hierbei

können ROS mit der Detektion des korrespondierenden Radikals 3-Carboxy-Proxyl (CP<sup>•</sup>) mittels ESR quantifiziert werden [129,152-153].

CPH hat die Eigenschaft, dass es auch ohne Anwesenheit von Radikalen durch Sauerstoff oxidiert werden kann. Dieser Vorgang wird als Autooxidation bezeichnet, der von verschiedenen Parametern abhängig ist und bei der ESR-Messung von Radikalen berücksichtigt werden muss. Aus diesem Grund ist eine Charakterisierung der Autooxidation notwendig.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war:

- a) Entwicklung einer Methode für die Detektion an isoliert ventilierten Kaninchenlungen mittels ESR-Spektroskopie
- b) Quantifizierung der Radikalfreisetzung an isoliert perfundierten und ventilierten Kaninchenlungen mittels ESR-Spektroskopie
- c) Charakterisierung der „Spinprobe“ (CPH) und der Autooxidation mit verschiedenen Substanzen (Eisen(II)-chlorid, Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Deferoxamin (DFO), Diethyldithiocarbamate (DETC), Superoxiddismutase (SOD))
- d) Untersuchung einer möglichen sauerstoffabhängigen Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies
- e) Untersuchung der HPV nach Generierung von ROS durch Stimulation der NADPH-Oxidasen mit Hilfe von Phorbol-12-Myristate-13-Azetat (PMA)

## 2. Material

### 2.1. Experimentelle Agenzien und Pharmaka

Aqua dest, Baxter S.A. (Lessines Belgien)

CPH (1-Hydroxy-3-Carboxy-2,2,5,5-Tetramethylpyrrolidin), L-Optik (Berlin, Deutschland)

DMSO (Dimethylsulfoxid), Merck (Darmstadt, Deutschland)

DETC (Diethyldithiokarbaminsäure), Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland)

DFO (Deferoxamin), Sigma- Aldrich (Deisenhofen, Deutschland)

Ethanol, pro analysi, J.T. Baker Chemicals (Deventer, Holland)

Isotone Kochsalzlösung 0,9 % (NaCl), Braun (Melsungen, Deutschland)

Ketanest, 50 mg/ml (Ketaminbase), Park-Davis (Berlin, Deutschland)

Liquemin 25000: 5000 I.E./ml (Na-Heparin), Hoffman La Roche (Grenzach-Wyhlen, Deutschland)

Natriumhydrogenkarbonat 8,4 %, Baxter GmbH (Unterschleißheim, Deutschland)

Perfusatlösung , Serag-Wiessner (Naila, Deutschland)

PMA, Sigma- Aldrich (Deisenhofen, Deutschland)

Rompun 2 % (Xylazolin), Bayer (Leverkusen, Deutschland)

SOD (Cu/Zn-Superoxiddismutase), Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland)

Xylocain 2% (Lidocainhydrochlorid), ASTRA Chemicals (Wedel, Deutschland)

## 2.2. Geräte und Hilfsmittel

Wägezelle, Typ U1, Hottinger Baldwin Messtechnik (Langen, Deutschland)

x-y-Scheiber, Rikadenki R50 Series, Rikadenki Electronics (Freiburg, Deutschland)

Blutgasanalysegerät, ABL 330 Radiometer (Copenhagen, Deutschland)

Druckaufnehmer Combitrans Monitoring SET, B. Braun Medical (Melsungen, Deutschland)

Gasmischanlage, KM 60-3/6 MESO, Witt (Witten, Deutschland)

Glaskapillaren , Labor Brand (Giessen, Deutschland)

Membranoxygenator, Hilite 1000, (Stolberg, Deutschland)

MS Spektrometer Magnetech, (Berlin, Deutschland)

Nahtmaterial, Mersilene 4, Ethicon (Norderstedt, Deutschland)

Perfustfilter, Pall Cardioplegia Plus 0,2 µm, Pall Biomedical Corp. (Fajardo, USA)

Perfusionsystemschräuche, arterielle Seite, Tygon, Kalensee (Gießen, Deutschland)

Perfusionsystemschräuche, venöse Seite, PVC, Sorion Biomedica (Düsseldorf, Deutschland)

Peristaltikpumpe, roller pump BP 742, Fresenius (Bad Homburg, Deutschland)

Starling Beatmungspumpe, Cat/Rabbit Ventilator 6025, Hugo Sachs Elektronik (Mach-Hugstetten, Deutschland)

Thermopumpe, Frigomix 1495, Thermomix 1480, Braun (Melsungen, Deutschland)

## 3. Methoden

### 3.1. Modell der isolierten Kaninchenlunge

#### 3.1.1. Einführung

Die Experimente wurden an der isolierten, blutfrei perfundierten und artifiziell ventilierten Kaninchenlunge vorgenommen. Das Modell der ex-vivo ventilierten und perfundierten Kaninchenlunge war bereits etabliert und wurde schon mehrfach beschrieben. Das isolierte, intakte Organ bietet ein von den zentralnervösen, metabolischen und humoralen Einflüssen des Gesamtorganismus unabhängiges experimentelles System. Es wurde daher mit leichten Modifikationen in verschiedenen Experimenten eingesetzt [64,69-70,154].

Mit dem Organmodell können physiologische Organreaktionen untersucht werden, ohne die komplexe Beziehung der interzellulären biochemischen Interaktion zu stören. Das Modell ermöglicht die standardmäßige und kontinuierliche Messwerteerfassung folgender biophysikalischer Parameter:

*Pulmonalarterieller Druck (PAP)*-kontinuierliche Messung über Druckwandler

*Pulmonalvenöser Druck (LVP)*-kontinuierliche Messung über Druckwandler

*Ventilationsdruck (VP)*-kontinuierliche Messung über Druckwandler

*Lungengewicht*- gemessen an der Nettoflüssigkeitseinlagerung, die über eine Wägezelle kontinuierlich erfasst wurde

Des Weiteren vereinfacht das Modell die Entnahme von sowohl arteriellen als auch venösen Probenentnahmen aus dem zirkulierenden Perfusat für biochemische und biophysikalische Untersuchungen. In vorherigen in vitro-Experimenten wurde die Basis für die Versuche dieser Arbeit geschaffen, in dessen Rahmen der Lungenmessplatz zur Optimierung der Detektion von reaktiven Sauerstoffradikalen an isoliert perfundierten und ventilerten Kaninchenlungen entwickelt wurde. Die Charakterisierung des gesamten Perfusions-, Ventilations-, und Messsystem sowie die Entwicklung optimaler Versuchsmodi erfolgte bereits in vorangehenden Untersuchungen.

### 3.1.2. Aufbau des Arbeitsplatzes

Die Perfusion der isolierten Lunge gewährleistete, über einen pulsierenden Perfusatfluss, eine Schlauch-Peristaltikpumpe. In den Kreislauf waren zwei parallel geschaltete temperierbare Perfusatbehälter mit je maximal 300 ml Füllvolumen integriert. Temperierbar war auch das die Lunge umgebende Gefäß. Die Perfusatbehälter garantierten einen problemlosen Perfusatwechsel ohne Unterbrechung. Während des Versuchs kam jeweils nur ein Perfusatbehälter zum Einsatz. Von diesen Behältern aus gelangte das Perfusionsmedium über die Pumpe zunächst zu einem zeitweise zwischengeschalteten Perfusatfilter. Dies diente zur Separation ausgespülter Zellen mit nachfolgender Blasenfalle, zur Vorbeugung von Luftembolien. Anschließend floss das Perfusat über den pulmonalarteriellen Katheter in die Arteria pulmonalis. Das Perfusat passierte die Lungenstrombahn, floss danach über einen im linken Ventrikel fixierten Katheter und über einer so genannten Kaskade, einer höhenverstellbaren Vorrichtung zur Regulation des pulmonalvenösen Druckes zurück in eines der beiden Perfusatbehälter. Es bestand ein rezirkulierendes System.

Kurz vor dem Eintritt des pulmonalarteriellen Katheters in die Arteria pulmonalis konnten über einen Injektionsstopfen Agenzien infundiert und injiziert werden. Die Perfusatbehälter konnten auch zu diesem Zwecke genutzt werden.

In dem pulmonalarteriellen Katheter befand sich ein kleinelumiger hartwandiger Druckmesskatheter (Innendurchmesser 1mm), dessen distale Öffnung in der Pulmonalarterie zu liegen kam. Dieser Katheter war luftblasenfrei und mit isotonischer Kochsalzlösung gefüllt. Über eine Abzweigung war der Katheter im pulmonalarteriellen Schenkel des Schlauchsystems an einem elektromechanischen Druckwandler angeschlossen. Auch der pulmonalvenöse Katheter war an einem elektromechanischen Druckwandler angeschlossen. Mittels eines elektromechanischen Druckwandlers wurde das Signal über einen Messverstärker auf einen Schreiber übertragen und zeitgleich mit einer speziellen Software auf einen Personal-Computer registriert.

Das Volumen mit der die Versuche durchgeführt wurden betrug 150 ml (75 ml im Schlauchsystem + 75 ml im Reservoirgefäß).

Die Perfusattemperatur variierte zwischen 4 °C und 38 °C. Die für die initialen Präparationsschritte notwendige Kühlung des Perfusates auf 4 °C erfolgte durch ein

Kühlgerät (Frigomix). Eine Thermopumpe war analog zuständig für die Erwärmung des Perfusates auf 38,5 °C. Beim Wärmeaustausch spielten verschiedenen Faktoren eine wesentliche Rolle:

1. Reservoirgefäße, die aufgrund ihrer doppelwandigen Eigenschaft ständig von der Temperierflüssigkeit durchströmt waren
2. Eine doppelwandige Glaskapillare, die als Wärmeaustauscher innerhalb des pulmonalarteriellen Schenkels integriert war
3. Ein Trog, in der die Lunge erwärmt und integriert wurde, um Wärme- und Feuchtigkeitsverluste an der Lungenoberfläche zu minimieren
4. Ein gekoppelter Wärmeaustauscher innerhalb der Membranoxygenatoren

Das Perfusionsmedium war eine synthetisch hergestellte sterile Elektrolytlösung (Krebs-Henseleit-Puffer, Serag Wiessner KG, Naila Bayern) mit folgender Zusammensetzung:

NaCl	125,0 mM
KCl	4,3 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,1 mM
CaCl <sub>2</sub>	2,4 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,3 mM
Glucose	13,32 mM

Der pH-Wert des Perfusates wurde vor dem Beginn des Versuches auf Werte zwischen 7,33 – 7,40 eingestellt. Verwendet hierfür wurden 23 ml Natriumhydrogenkarbonat (NaHCO<sub>3</sub>, als Elektrolytkonzentrat 8,4%, Braun, Melsungen) pro 1000 ml Perfusat.

Weiterhin wurde dem Perfusatmedium 5 µM Diethyldithiocarbamat über 12 Stunden und 20µM Deferoxamin kurz vor Versuchsbeginn zugesetzt. Hierdurch kam es zur Ausfällung bzw. Sedimentation von Übergangsmetallen. Hierbei konnte eine Übergangsmetall induzierte Oxidation (Autooxidation) der Spinprobe reduziert werden.

Die Perfusion begann zu Beginn des Versuches mit einem Volumenfluss von 10 ml/min, der parallel zur Erwärmung des Organs auf 100 ml/min gesteigert wurde. Nach Erreichen der für den Versuchsablauf nötigen Temperaturverhältnisse und der Perfusionsgeschwindigkeit begann die „steady state“ Periode. Nur Lungen, die über diesen Beobachtungszeitraum von 20 Minuten Druck- und Gewichtsstabil waren, wurden in die Untersuchungen aufgenommen.

Die Ventilation wurde durch eine Kleintier-Beatmungspumpe gewährleistet. Diese Beatmungspumpe wurde entweder mit Raumluft oder mit definierten Gasgemischen betrieben. Die Beatmung der Lunge wurde mit 30 ml pro Atemzug, 30 Atemzüge pro Minute und mit einem positivem endexpiratorischen Druck (PEEP) von 1 cm Wassersäule gewährleistet.

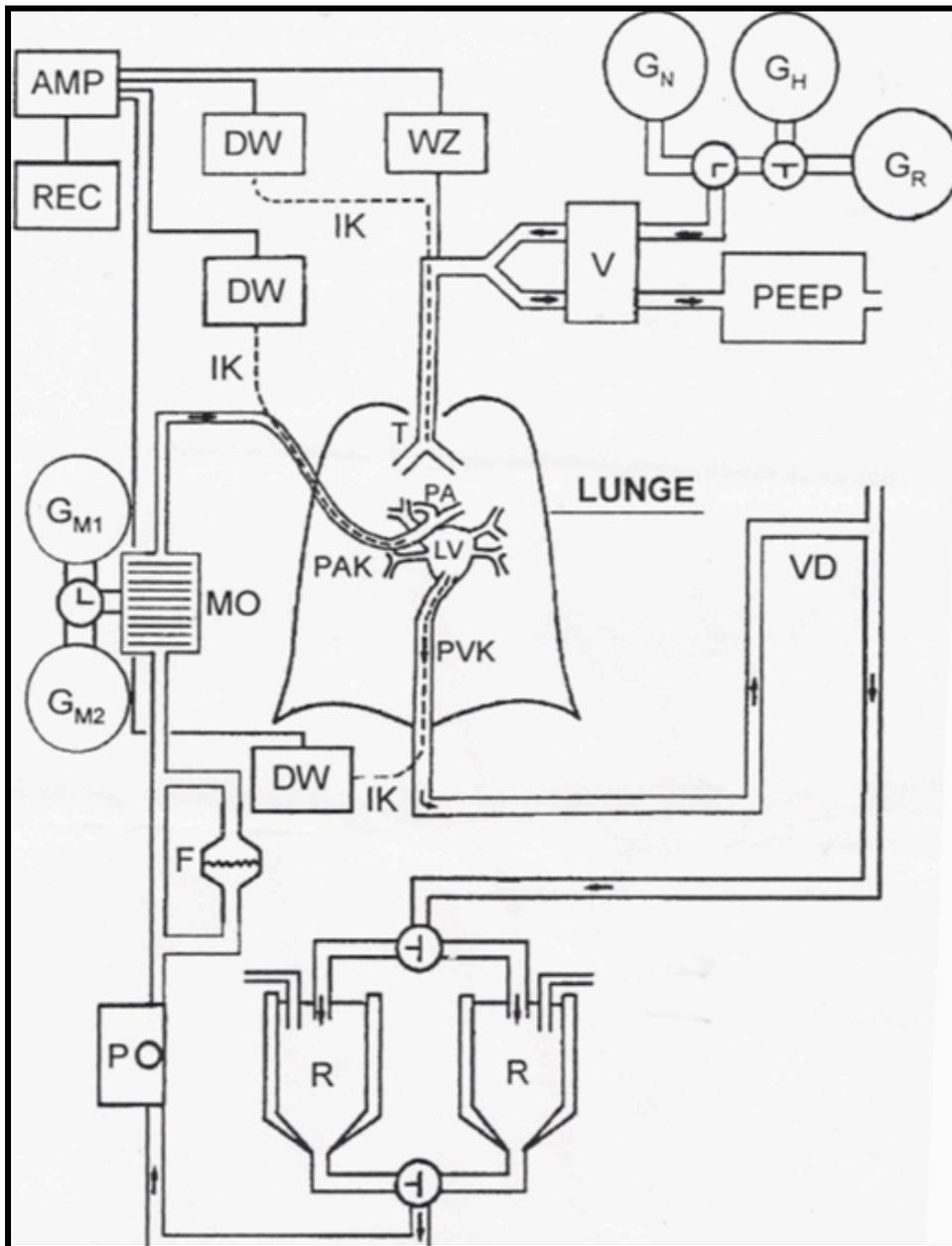
Folgende Atemgase kamen zur Anwendung (Angaben in Volumenprozent):

- a) Raumluft (Beatmung des Tieres bis zum Einbinden des arteriellen Katheters in die Arteria pulmonalis)
- b) normoxisches Gasgemisch aus einer Gasflasche (21,0 % O<sub>2</sub>, 5,3 % CO<sub>2</sub>, 73,7 % N<sub>2</sub>)
- c) hypoxisches Gasgemisch aus Gasmischanlage mit 5 % O<sub>2</sub>

Die Gaspartialdrücke sowie der pH-Wert des Perfusates wurden mit Hilfe eines Blutgasanalysator ABL (ABL 330 Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) ermittelt.

Eine extra angefertigte Gas-Ventilinstallation ermöglichte einen schlagartigen Wechsel der Beatmungsgase untereinander innerhalb von wenigen Sekunden.

Der für die Durchführung der Kontrollexperimente benutzte Membranoxygenator funktionierte wie eine künstliche Lunge. Er ermöglichte den Gasaustausch zwischen dem Versorgungsgas und der Perfusionslösung. Das Prinzip beruhte auf Diffusion über dünne Silikonmembranen. Verwendet wurde das Modell Hilite 1000, Stolberg, Germany. Die schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus ist in Abb. 3.1. gezeigt.



**Abb.3.1.:** Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus der isolierten Kaninchenlunge (modifiziert nach Weißmann et al 1995)

AMP: Messverstärker; DW: elektromechanischer Druckwandler; F: Filter; GM1 + GM2: Gasgemischkammern zur Begasung des Membranoxygenators; GN + GH + GR: Gasgemische zur Ventilation der Lunge; IK: Innenkatheter; LV: linker Ventrikel; MO: Membranoxygenator; P: Peristaltikpumpe; PA: Pulmonalarterie; PAK: pulmonalarterieller Katheter; PVK: Pulmunalvenöser Katheter; PEEP: positiv endexpiratorischer Druck; R: Reservoirgefäß für Perfusionsmedium; REC: Schreiber und Personalcomputer zur Registrierung der gemessenen Parameter; T: Trachea; V: Ventilator; VD: Vorrichtung zur Regulation des pulmonalvenösen Druckniveaus. Pfeile geben die Richtung des Perfusionsmediums und der Gase an.

### 3.1.3. Präparation der isolierten Lunge

Für die Versuchsreihen wurden New Zealand Kaninchen beiderlei Geschlechts verwendet. Das Körpergewicht lag zwischen 2,4 und 3,3 kg.

Nach Punktion der Ohrrendvene, erhielten die Kaninchen eine initiale Analgosedierung. Die Analgosedierung bestand aus einem Gemisch von Ketanest® (30–50 mg/kg Körpergewicht Ketamin, Parke Davis, Berlin) und Roumpun® (6–10 mg/kg Körpergewicht Xylazin, Bayer, Leverkusen) im Verhältnis 2:3. Die Kaninchen erhielten über die punktierte Ohrrendvene ca. 0,6 bis 0,8 ml dieses Gemisches. Dabei war wichtig, dass die Spontanatmung erhalten blieb. Es folgte die Applikation von 1000 I.E. Liquemin® pro kg Körpergewicht (Liquemin® = 5000 I.E. Heparin/ml). Nach ausreichender Relaxation bei erhaltener Spontanatmung wurde das Kaninchen in Rückenlage fixiert. Nach Abtasten der Trachea unterhalb des Larynx wurde diese ventrale Halsregion durch die Injektion von 2%igem Xylocain® ( Lidocain 2%, Astra, Wedel) lokal anästhesiert. Dadurch war die Sensibilität innerhalb weniger Minuten für die folgende Tracheotomie aufgehoben. Folgend konnte die Trachea schmerzfrei und durch schichtweises Präparieren unter Schonung der großen Gefäße und des Nervus vagus dargestellt werden. Die Trachea wurde durch Querinzision eröffnet und es folgte die endotracheale Kanülierung. Die Kanüle wurde durch eine Ligatur fixiert. Die Lunge wurde zunächst maschinell mit Raumluft mit einer Atemfrequenz von 30 Atemzügen pro Minute und einem Hubvolumen von 30 ml pro Atemzug beatmet. Bei gesicherter maschineller Beatmung wurde die Narkose über 10 Minuten, bis zur für die weitere Präparation notwendigen Analgesie vertieft. Dies geschah unter ständiger Herzfrequenzkontrolle mittels Palpation. Weiterhin wurde die Haut durch oberflächliche Schnitte über dem Sternum und entlang der Rippenbögen weiträumig mobilisiert und schließlich entfernt. Unterhalb des Processus Xiphoideus erfolgte die Oberbauchlaparotomie. Das Xiphoid wurde mittels chirurgischer Klemme kontrolliert und das Abdomen durch Scherenschnitte entlang der Rippenbögen unter Schonung des Diaphragmas breit eröffnet. Im nächsten Schritt wurde das Diaphragma stumpf abpräpariert und nach kaudal mittels chirurgischer Klemme fixiert. Somit wurden die Pleurahöhlen eröffnet ohne das Lungengewebe zu verletzen. Es folgte mittels einer Knochenschere die mediane Sternotomie und die stumpfe Entfernung großer Teile des Thymusgewebes. Die beiden freiliegenden Rippenenden wurden mit Klemmen fixiert und gespreizt und eventuelle Blutungen aus den Aa. intercostales oder der Aa. thoracica internae mittels Klemmen

unterbunden. Nach Eröffnung des Perikards konnte die Herzspitze mit einer kleinen Klemme fixiert werden. Dies war wichtig für das weitere Vorgehen. Die Aorta und A. pulmonalis wurden mit je einem Faden (Kette Handfaden, Mez, Freiburg) unter äußerster Vorsicht umschlungen und jeweils vorgeknotet.

Daraufhin konnte die Beatmung auf das normoxische Gasgemisch mit 5,3% CO<sub>2</sub> und 21,0 % O<sub>2</sub> umgestellt werden. Dadurch wurde unter bevorstehender kalter Perfusion der Lunge mit bikarbonatgepufferten Perfusionsmedium eine optimale pH-Wert Einstellung gewährleistet. Nach einem kleinen Schnitt in das rechte Ventrikelmyokard des schlagenden Herzens wurde der pulmonalarterielle Katheter sofort ohne Unterbrechung des Lungenkreislaufs vorgeschoben. Der bereits vorgelegte Knoten konnte zugezogen und zweimal nachgeknotet werden. Der Katheter war somit luftdicht fixiert. Unmittelbar danach wurde zügig die Herzspitze reseziert, um einer Volumenbelastung entgegenzuwirken. Damit konnte sich kein Abflusswiderstand aufbauen, der eine Erhöhung des pulmonalvaskulären Filtrationsdruckes mit Lungenödem zur Folge hätte. Auch die Aorta wurde durch den vorgelegten Faden luftdicht. Der arterielle Schenkel des Perfusatsystems, das somit an die Lunge angeschlossen war, war mit 4 °C kaltem Perfusat blasenfrei gefüllt. Die Perfusion begann mit einem Fluss von 10 ml/min. Ab diesem Zeitpunkt erfolgte die Fremdperfusion der Lunge. Die Lunge konnte nun vom Tierkörper explantiert werden.

#### **3.1.4. Integration der Lunge in das Messsystem**

Zunächst wurde entlang der Wirbelsäule mit kleinen vorsichtigen Schnitten die Lunge von kranial nach kaudal mobilisiert. Dabei wurde auch die Aorta, der Ösophagus und die V. cava inferior et superior durchtrennt. Das nun atraumatisch vom Tierkörper gelöste Herz-Lungen-Paket wurde auf einem speziellen Präparationsgestell fixiert und weiter bearbeitet. Reste des mediastinalen Bindegewebes konnten vorsichtig abpräpariert werden, um bessere Sicht zu verschaffen. Damit ein funktionsfähiger Kreislauf zustande kommt, wurden linksventrikulär die Papilarmuskeln entfernt. In den linken Ventrikel wurde anschließend ein Konnektionskatheter mit einer Tabaksbeutelnaht intramyocardial eingenäht und fest fixiert. Um schwankende Druckverhältnisse zu verhindern, wurde zusätzlich das linke Herzohr legiert. Das Präparat war nun bereit, durch Verbinden des Konnektionskatheters mit dem

venösen Schenkel des Systems, in den Perfusionskreislauf integriert zu werden. Dies geschah durch Adaptation des Konnektionskatheters mit dem venösen Schenkel des Perfusatsystems. Nach Sicherung aller Verbindungen wurde die Lunge an der Wägezelle hängend in einem temperierten Behälter platziert. Zu diesem Zeitpunkt fand die erste Registrierung und Begutachtung des PAP, LVP, VP und der Lungenmasse.

Nach einer pH-Wert Kontrolle konnte mit der Erwärmung des Perfusates auf 38,5 °C begonnen werden. Parallel hierzu wurde alle 30 Sekunden der Perfusatfluss um 10 ml/min erhöht, bis ein Endfluß von 100 ml/min erreicht war. Die Beatmung wurde nun mit einem PEEP von 1 cm Wassersäule durchgeführt. Zudem wurde der LVP auf 2 mmHg eingestellt. Das Perfusionssystem wurde bis zu diesem Zeitpunkt nicht-rezirkulierend betrieben, d.h. es lag immer noch ein offener Kreislauf vor. Das bis jetzt aus der Lunge austretende Volumen wurde verworfen. Um die Lunge weitgehend freizuspülen und sie von Blutbestandteilen sowie Blutresten zu befreien wurden noch zwei Spülvorgänge mit jeweils einem Liter sterilem Perfusat vorgenommen. Erst dann wurde das ganze System auf Rezirkulation mit einem Gesamtvolumen von 150 ml gestellt. Mit diesem Perfusat im System wurde der Versuch bis zum Ende, ohne Austausch des Perfusionsmediums durchgeführt. Es war also ein geschlossener Kreislauf entstanden.

Der Nullpunkt der Druckwandler wurde vor jedem Versuch auf Höhe des Lungenhilus gegen atmosphärischen Druck abgeglichen. Eine Kontrolle der Eichung des gesamten Messsystems erfolgte täglich mit einem Eichgerät nach Prof. Dr. O. H. Gauer.

Die Lunge musste zur Verwendung für einen Versuch folgende Einschlusskriterien erfüllen:

- a) Sie musste eine homogene, nach Ausspülen des Blutes, weiße Oberfläche ohne sichtbare Atelektasen besitzen.
- b) Sie musste über einen Zeitraum von acht Minuten eine Erhöhung des LVP ohne irreversible Gewichtszunahme tolerieren.
- c) Sie musste Druck- und Gewichts-konstant während der steady-state Periode (30 Minuten) sein.
- d) Sie muss die Normwerte für PAP (4-8 mmHg) und VP (6-11 mmHg) einhalten.

e) Ferner mussten vollständige Dichtigkeit des Schlauchsystems und der Verbindungsstellen zwischen diesem und dem Organ gewährleistet sein.

Die Zeit ab der die Lunge an das Messsystem angeschlossen wurde bis zur ersten ESR-Spektroskopie-Messung betrug genau 60 Minuten. Fünf Minuten vorher wurde die Spinprobe 1 mM l-Hydroxy-3-Carboxy-2,2,5,5-Tetramethylpyrrolidine (CPH) dem Perfusatsystem hinzugegeben.

Es existierten drei Versuchsansätze:

a) Normoxische Ventilation mit 21 % O<sub>2</sub> für eine Dauer von zweieinhalb oder drei Stunden. Im Falle von drei Stunden folgte eine Bolusinjektion von Phorbol-12-Myristate-13-Azetat (PMA) in den pulmonalarteriellen Schenkel mit einer Konzentration im Perfusatmedium von 1 µM. In den Kontrollexperimenten wurde anstatt PMA Kochsalzlösung appliziert.

b) In 30-minütigen Abständen wurde aufeinanderfolgend mit verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (21,0 %; 16,0 %; 10,0 %; 5,0 %; 2,5 %; oder 1,0 %) ventiliert. Insgesamt betrug die Versuchsdauer drei Stunden.

c) Nach 30 Minuten Ventilation mit einer der bestimmten Sauerstoffkonzentration (21,0 %; 16,0 %; 10,0 %; 5,0 %; 2,5 %, oder 1,0 %) erfolgte eine Bolusinjektion PMA in den pulmonalarteriellen Schenkel mit einer Konzentration im Perfusatmedium von 1 µM. In den Kontrollexperimenten wurde anstatt PMA eine Kochsalzlösung appliziert.

Weiterhin wurde anstatt der Lunge für die Experimente ein Membranoxygenator (Hilite, Stolberg, Germany) für die Oxygenation des Perfusates benutzt.

### **3.1.5. Vorbereitung und Reinigung des Perfusionssystems**

Zu Beginn der Versuchsreihen bestand das Perfusionssystem zum größten Teil aus mit Konnektionsstücken verbundenen Silikoseschläuchen.

Lediglich der Peristaltikpumpenschlauch und der arterielle Schenkel ab dem Filter bestanden aus Tygon. Durch Vorversuche wurde klar, dass Silikoseschläuche nicht geeignet für derartige Versuche sind. Silikoseschläuche haben eine zu geringe Diffusionsbarriere gegenüber der Umgebungsluft. Das Perfusatsystem wurde daraufhin entsprechend modifiziert.

Nachdem das System aufgebaut wurde, wurde es zu jedem Experiment zunächst mit zwei Litern destilliertem Wasser, mit zwei Litern NaCl (0,9%) und anschließend mit zwei Litern steriler Perfusatlösung nicht-rezirkulierend durchspült. Während des Spülvorganges wurden alle Luftblasen aus dem System entfernt und das System auf 4 °C gefahren. Ein in den Perfusatfluss eingeschalteter endotoxinbindender Filter sorgte zusätzlich für entsprechende Partikelfreiheit.

Die Reinigung nach jedem Experiment bestand aus mehrfacher gründlicher Spülung des gesamten Perfusionssystem sowie des Beatmungssystems bei 60 °C unter Zugabe eines Detergens mit folgender mehrfacher Spülung mit demineralisiertem Wasser. Zum Trocknen wurde das Schlauchsystem mit Druckluft ausgeblasen. Abschließend wurde das Perfusionssystem in Folie eingepackt und in der Zentralstelle für Sterilisation des Uniklinikums Giessen sterilisiert.

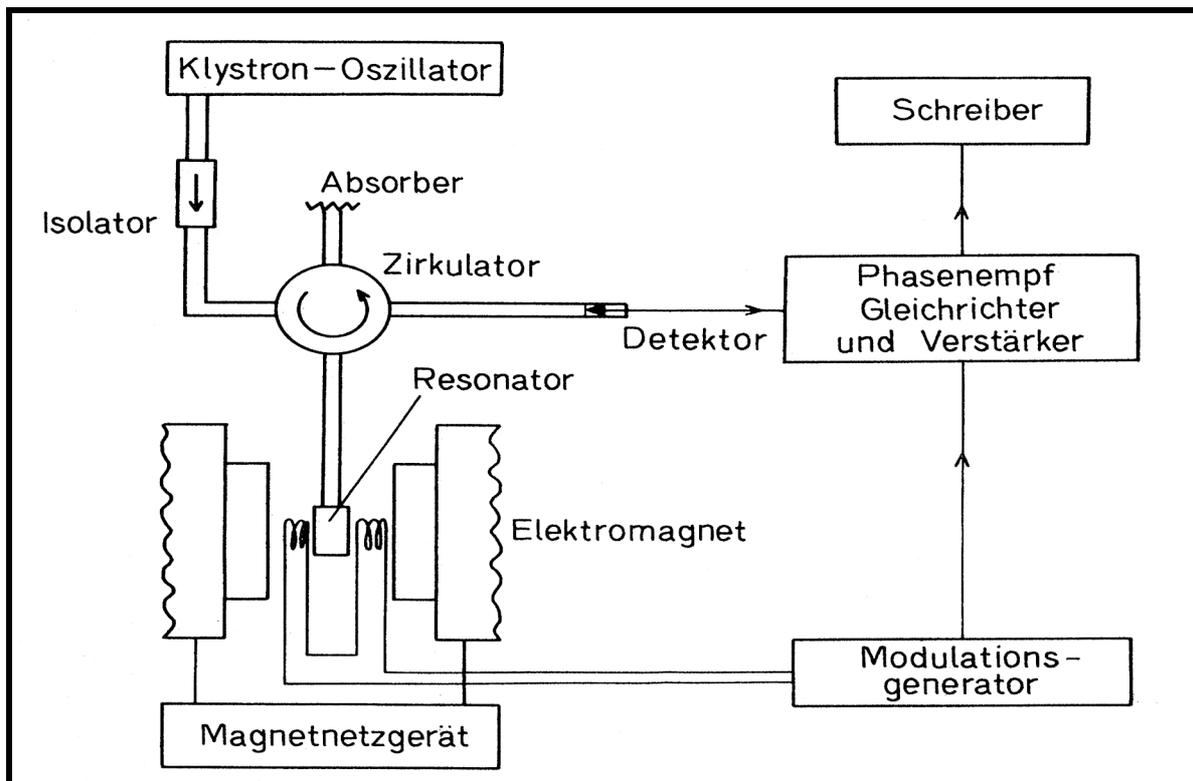
Die Membranoxygenatoren wurden mit insgesamt vier Litern sterilem Aqua destillata gereinigt und kühl gelagert, und konnten so bei sechs Experimenten Verwendung finden.

### 3.2. Die Methode der Elektronenspinresonanzspektroskopie (ESR)

#### 3.2.1. Apparative Grundlagen

Grundsätzlich besteht jedes ESR-Spektrometer aus mindestens drei Komponenten. In Abb. 3.2. ist ein Blockdiagramm eines ESR-Spektrometers dargestellt [129,155]:

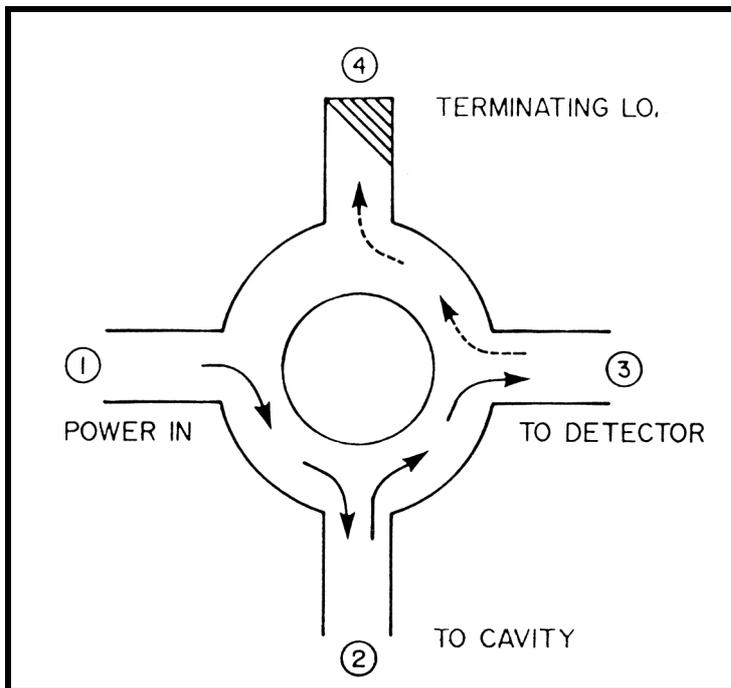
- 1) Mikrowellenteil zur Erzeugung und Detektion des Mikrowellenfeldes.
- 2) Ein Magnetfeld zur Steuerung und Stabilisierung des statischen Magnetfeldes.
- 3) Ein elektronisches System zur Verstärkung und Aufzeichnung der Messsignale.



**Abb. 3.2.:** Blockdiagramm eines ESR-Spektrometers [152,156]

Die Probe befand sich zwischen den Polen eines Elektromagneten in einem Hohlraumresonator. Die in der Mikrowellenquelle erzeugte elektromagnetische Welle wurde dabei senkrecht zum äußeren Magnetfeld eingestrahlt. Die Energieabsorption im Resonanzfall bewog eine Änderung der Mikrowellenleistung, die von einer Detektordiode gemessen wurde. Da Inhomogenitäten des Magnetfeldes zur Verbreiterung der Resonanzlinien beitragen, war es wichtig, ein über das gesamte Probenvolumen stabiles und homogenes Magnetfeld zu erzeugen [152,156].

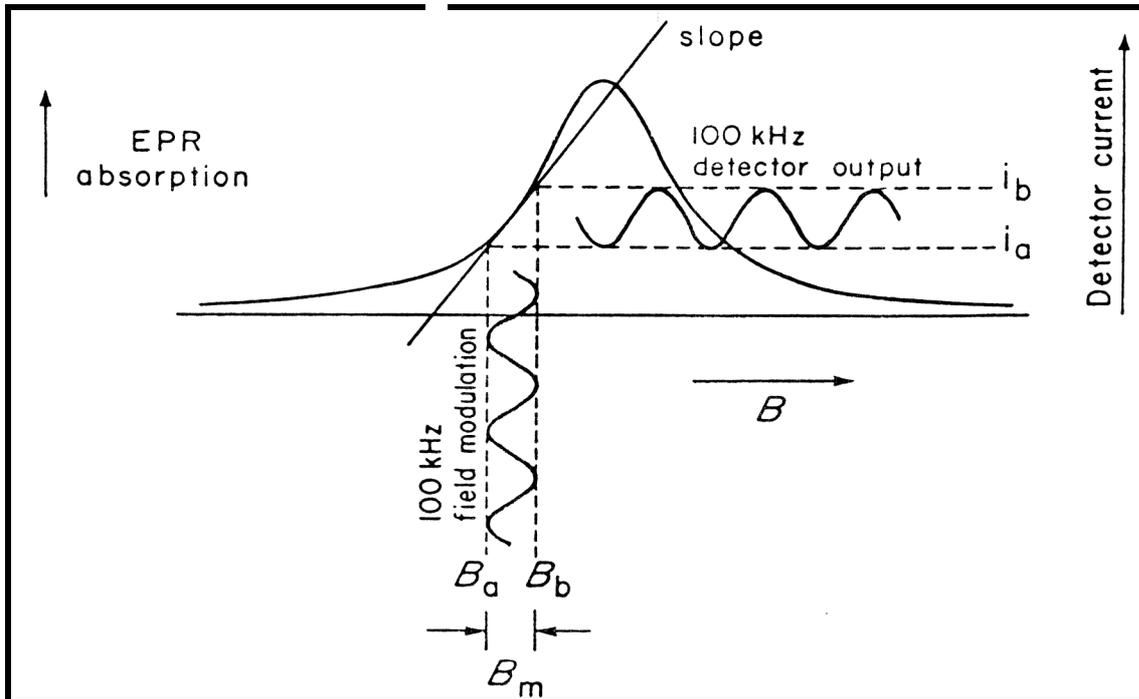
Als Strahlungsquelle wo die Anregungsmikrowelle erzeugt wurde, diente ein Gunn-Oszillator. Der Hohlraumresonator bestimmte die Mikrowellenfrequenz. Über einen Hohlleiter wurden die Mikrowellen bis zum Resonator weitergeleitet. Der Isolator gewährleistete, dass die Mikrowellenenergie vermindert wurde. Dadurch wurden Störungen im Oszillator vermindert. Der Zirkulator lenkte die ankommende Mikrowelle in den Resonatorarm. Anschließend wurde durch den Zirkulator nur die vom Resonator reflektierte Welle zum Detektor gelenkt. Ggf. sorgte ein vierter Arm am Zirkulator für die Absorption der vom Detektor reflektierten Mikrowelle (siehe Abb. 3.3.) [152,155].



**Abb. 3.3.:** Vier-Arm-Zirkulator [152]

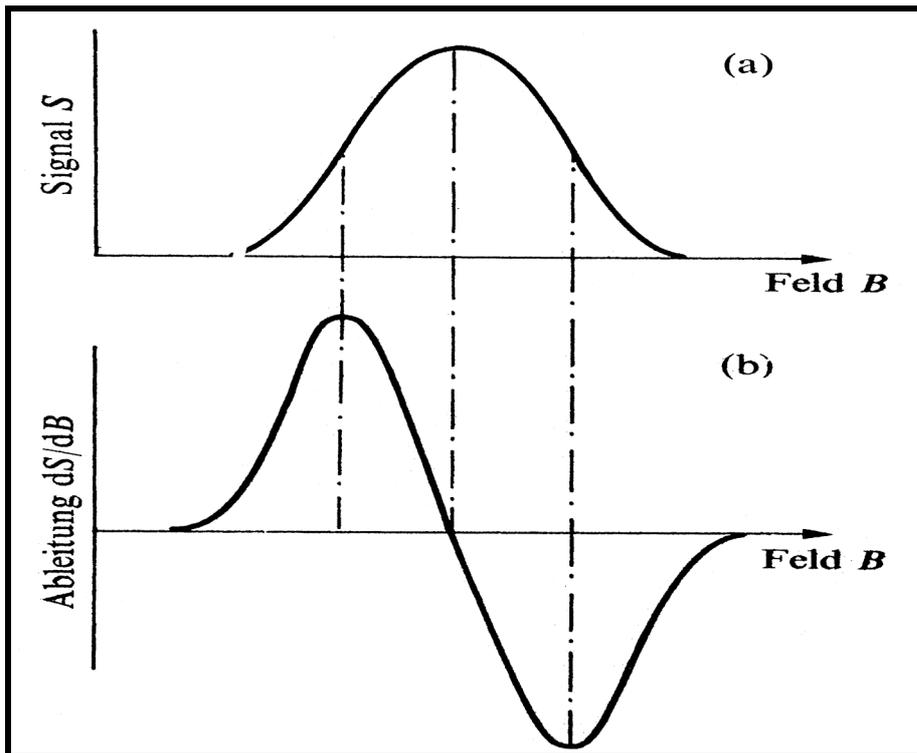
Das Messsignal (Diodenstrom) war so lange feldunabhängig, bis die Probe Mikrowellen absorbierte. Dann erschien die Modulation auch im Diodenstrom. Dieses Signal wurde elektronisch herausgefiltert und gleichgerichtet. Zusätzlich wurde das äußere Magnetfeld mit einem weiteren magnetischen Feld von 100 kHz moduliert (siehe Abb. 3.4.). Dafür waren Helmholtz-Spulen auf jeder Seite des Resonators angeordnet. Durch diese Modulation wurde ein besseres „Signal-zu-Rausch“ Verhältnis erreicht, weil sich das frequenzabhängige Verstärkerrauschen antiproportional zur Frequenz verhält. Man erhielt eine elektrische Spannung, deren Stärke proportional zur Absorption der Probe ist. Der Vorteil dieser Methode ist, dass alle zeitabhängigen Einflüsse auf das Messsignal, die nicht exakt der Modulationsfrequenz entsprachen (z.B. Rauschen, Drift), eliminiert wurden. Durch

die Feldmodulation konnte die Empfindlichkeit des Spektrometers um mehrere Größenordnungen gesteigert werden [117,120,152,155,156].



**Abb. 3.4.:** Auswirkung einer 100 kHz Feldmodulation auf den Detektorstrom; EPR absorption = ESR-Absorptionssignal, Detector current = Detektorstrom; detector output = Signal am Detektor; field modulation = Feldmodulation; slope = Steigung [152]

Der am Detektor registrierte Strom war mit der gleichen Frequenz wie das äußere Magnetfeld moduliert. Seine Amplitude war proportional zur Änderung der Energieabsorption  $\Delta S$ . Durch die Magnetfeldmodulation  $\Delta B$  erhielt man als Signal die 1. Ableitung des Absorptionssignals  $\Delta S / \Delta B$  (Abb.3.5.), wenn die Modulationsamplitude im Verhältnis zur Linienbreite klein genug war. Die Linienbreite war als Abstand zwischen Maximum und Minimum des abgeleiteten Absorptionssignals definiert. Die Größe der Modulationsamplitude hatte eine Auswirkung auf die Linienbreite. Grundsätzlich wurde zwischen der natürlichen und der optimalen Linienbreite unterschieden. Die natürliche Linienbreite war die Linienbreite, bei der diese trotz Verkleinerung der Modulationsamplitude nicht mehr weiter abnimmt. Im Gegensatz dazu war bei der optimalen Linienbreite die Amplitude des Signals am größten [117,120].



**Abb. 3.5.:** Zusammenhang zwischen Absorptions- und ESR-Signal Absorptionssignal 1. Ableitung des Absorptionssignals nach Feld  $B$  (magnetische Induktion) als ESR-Signal nach phasenempfindlicher Gleichrichtung.

Ein Vorteil der differenzierten Resonanzkurve bestand unter anderem in der besseren spektralen Auflösung, so dass Feinheiten im Kurvenverlauf besser sichtbar wurden [157].

Durch die Differenzierung war eine Phasenverschiebung um  $180^\circ$  zwischen Detektorsignal und Modulation am Maximum der Absorptionskurve zu berücksichtigen. Unterhalb des Absorptionsmaximums bestand Phasengleichheit, oberhalb des Absorptionsmaximums waren die beiden Signale in ihrer Phase entgegengesetzt [120].

Mit einem Schmalbandverstärker wurde nur die 100 kHz-Komponente des modulierten Detektorsignals verstärkt. Danach wurde das Signal phasenempfindlich gleichgerichtet. Dazu fand ein Vergleich zwischen dem verstärkten Signal und dem 100 kHz-Signal vom Oszillator statt. Bei Phasengleichheit war die Ausgangsspannung positiv, bei entgegengesetzter Phase negativ [120,152].

Im Folgenden wird unter dem ESR-Signal immer die 1. Ableitung des Absorptionssignals verstanden.

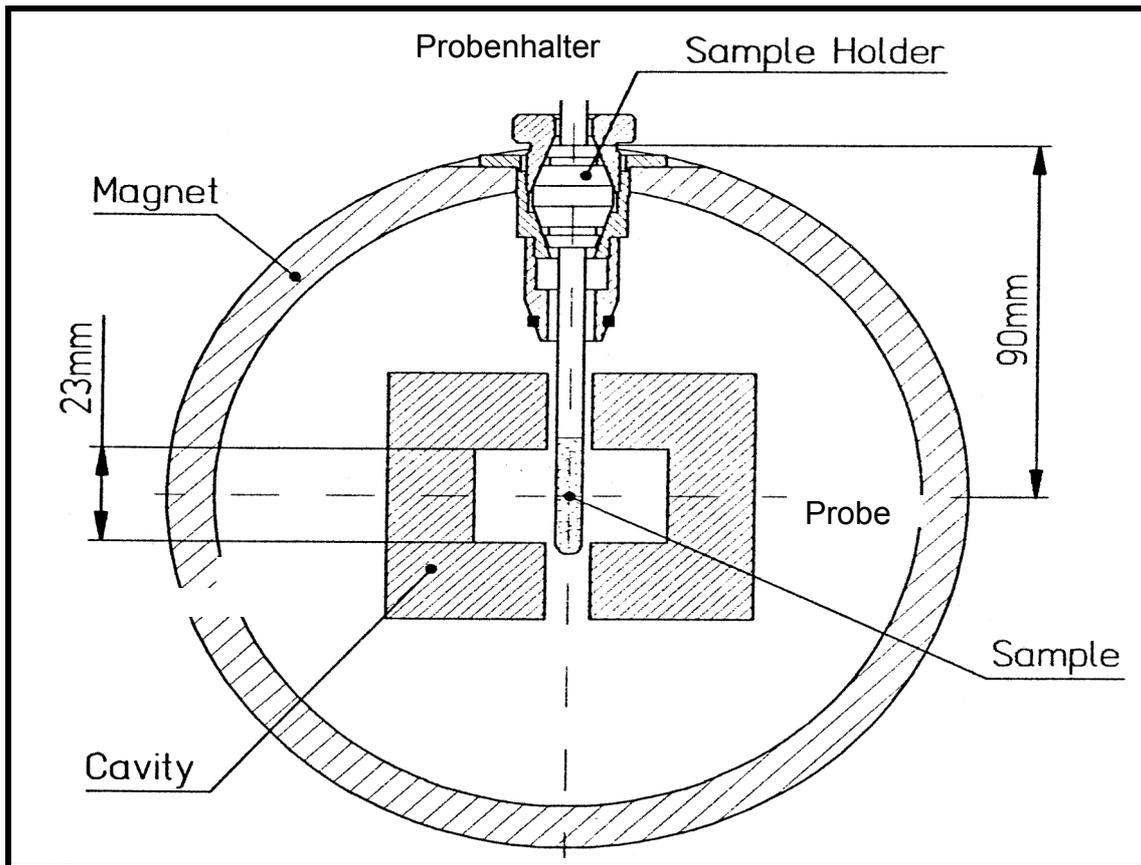
### 3.2.2. Messung von reaktiven Sauerstoffspezies durch ESR

Die ESR-Messungen wurden mit dem Spektrometer MS 100 (Magnetech GmbH, Berlin) durchgeführt. Für die Spektrenaufzeichnung wurde das Programm EprCmd16 (Magnetech GmbH, Berlin) verwendet. Die technischen Daten des Spektrometers MS 100 sind in Tab. 3.1. aufgeführt.

Gehäuse	53·35·42 cm / 60 kg
Magnetfeldbereich	0 - 4500 G
Feldhomogenität	+/- 50 mG Probenbereich
Feldstabilität (Kurzzeit)	50 mG/min
Leistungsaufnahme	ca. 500 W
Empfindlichkeit	$3 \cdot 10^{10}$ Spins/G
Sweepzeit	10 s - 1 h
Modulationsfrequenz	100 kHz
Feldmodulation	5 mG – 10 G
Mikrowellenfrequenz	9,3-9,6 GHz
Mikrowellenleistung	10 $\mu$ W - 70 mW
Schnittstelle	RS232

**Tab. 3.1.:** Technische Daten des ESR-Spektrometers MS100 [155]

Die Proben wurden in 50  $\mu$ l-Glaskapillaren mit einem Durchmesser von 1 mm (Labor-Brand, Giessen) gemessen. Die Kapillaren befanden sich zur ESR-Messung in einem Führungsröhrchen. Die Position des Führungsröhrchens im Gerät konnte variiert werden. Das Führungsröhrchen konnte in dem entsprechenden Halter verschoben werden, während der Halter selbst immer die gleiche Position einnahm. Abb. 3.6. zeigt den Magneten mit dem Führungsröhrchen im Querschnitt. Der aktive Messraum hatte nur eine Länge von 23 mm. Es lieferte nur die Probensubstanz einen Signalbeitrag, die sich in diesem Meßraum befanden. Die 90 mm in Abb.3.6. entsprachen dem Abstand von der Oberkante des Führungsröhrchen-Halters zur Resonatormitte [158]. Da sich das obere Ende des Halters 6 mm über der Geräteoberfläche befand, lag die Mitte des aktiven Bereichs in 84 mm Tiefe.



**Abb. 3.6.:** Magnet und Resonator mit dem Führungsröhrchen im Querschnitt [120]

Mit dem Programm EprCmd16 (Magnetech GmbH, Berlin) mussten vor jeder Messung einige Parameter eingestellt und kontrolliert werden. Die Einstellparameter sind in Tab. 3.2. näher erläutert.

**Tab. 3.2:** Erläuterung der Einstellparameter [155]

Einstellparameter	Bedeutung	Wertebereich	Einfluß auf Signalqualität
Center field	Feldmitte des Spektrums [1 G = 10 <sup>-4</sup> T] G = Gauß, T = Tesla	Maximal: 4500 G – Sweep width/2	keine Auswirkung
Sweep width	Breit des abzuscannenden Feldes	Maximal: 4500 G;	je kleiner, desto höher die Empfindlichkeit (4096 Werte)
Sweep time	Zeit für einen Scan	11 – 2056 Sekunden	Verlängerung der Meßzeit verbessert Signal/Rausch (S/N)- Verhältnis
Number	Anzahl der Scans zur Spektrenakkumulation (Mittelwertbildung → Herausrmittelndes Rauschens, weil zufällig verteilt)	1-255	Signal steigt linear mit Number
Modulation amplitude	Amplitude der Modulation	50 – 10000 mG	Bis zu einem bestimmten Wert führt eine Vergrößerung zur Erhöhung von S/N
Power attenuation	Dämpfung der Mikrowellenleistung,	0 - 40 dB	Vergrößerung der Mikrowellenleistung führt zur Erhöhung von S/N!
Receiver gain	Elektronische Verstärkung des Meßsignals:	Wert: 1 – 9 Exponent: 0 - 2	keine Verbesserung von S/N, weil gleiche Verstärkung für Signal und Rauschen
Signal phase	Invertieren des Signals (phasenempfindliche Gleichrichtung)	0 oder 180 °	keine Auswirkung

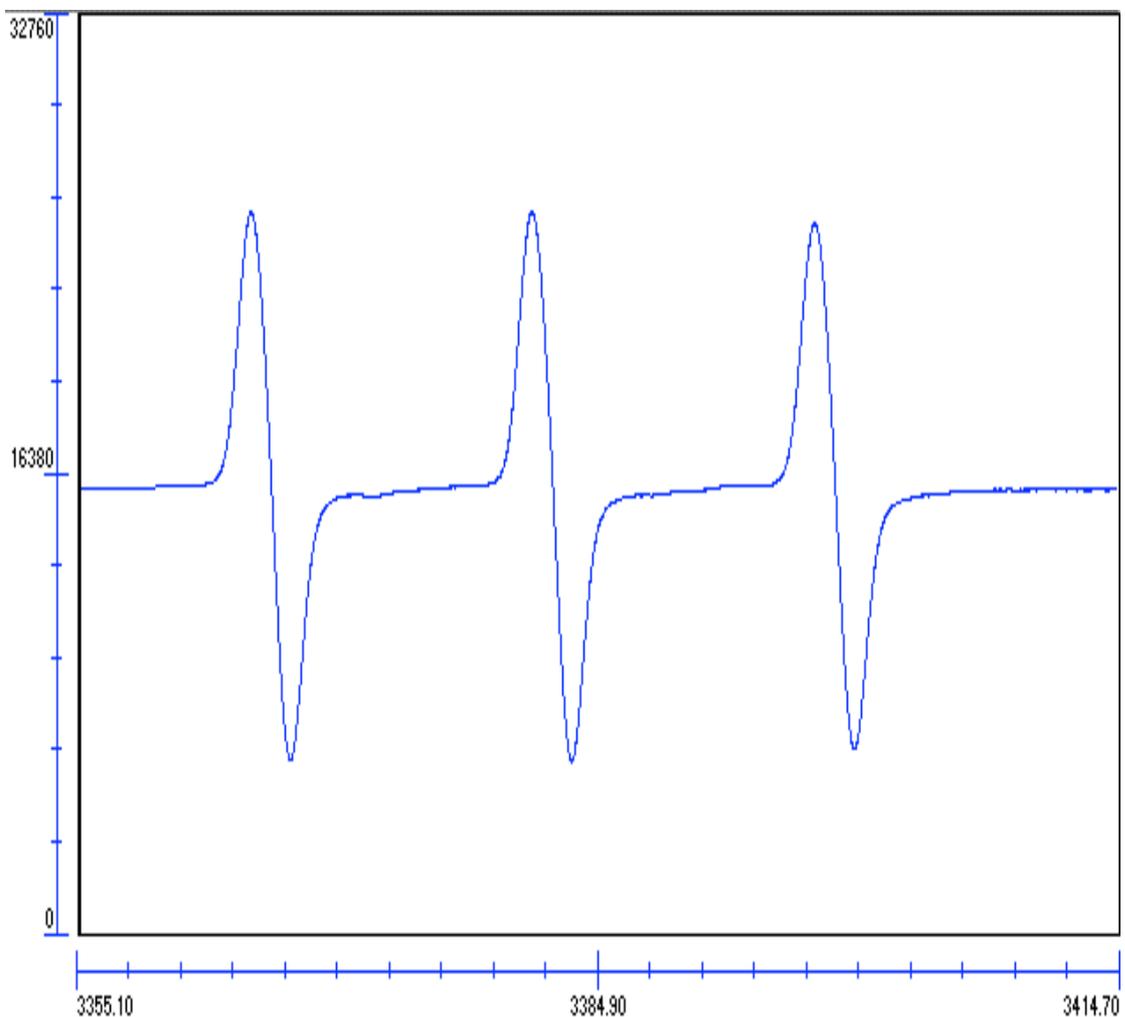
Zu den Kontrollparametern gehörten [157]:

Detector: Anzeige für den Diodenstrom nach automatischem Abgleich

Field: Anzeige für die Abweichung des Magnetfeldwertes vom Sollwert

AFC: Anzeige für die Regelabweichung der automatischen Mikrowellenfrequenzregelung

Durch die Zeigerstellung der Kontrollparameter in den Bereichen rot, gelb oder grün wurde der Zustand des Spektrometers angezeigt. Alle drei Parameter sollten sich zu Messbeginn im grünen Bereich befinden. Abb.3.7. zeigt ein typisches tripple band Spektrum der verwendeten Spinprobe CP-H.



**Abb. 3.7.:** Typisches CP-H „triple-band“ Spektrum. Y-Achse: relative Einheiten; X-Achse: Magnetische Induktion

Das ESR-Signal wurde nach der phasenempfindlichen Gleichrichtung A/D-gewandelt und in einem temporären Speicher gespeichert, bevor die Daten auf einen PC übertragen wurden. Entsprechend der Anzahl der Speicherplätze (12-Bit-Speicher) bestand ein Scan aus 4096 Werten. Auf der y-Achse waren relative Einheiten aufgetragen.

Mit dem Programm Analysis (Magnettech GmbH, Berlin) konnte die Amplitude des ESR-Signals bestimmt werden [159].

Zur Bestimmung der Amplitude wurde der aus dem y-Abstand von Signalmaximum und Signalminimum errechnete Wert des mittleren Peaks halbiert. Die  $\Delta y$ -Bestimmung konnte manuell oder automatisch durch das Programm geschehen. Bei verrauschten Signalen war erstere Variante geeigneter, es sei denn das Signal wurde vorher geglättet.

Bei spektrometrischen Verfahren wird üblicherweise die Fläche unter dem Absorptionssignal ausgewertet. Dabei ergibt sich durch die Integration eine Stufenkurve. Die Stufenhöhe ist ein Maß für die sich in Resonanz befindenden Elektronen. Weil das ESR-Signal die 1. Ableitung des Absorptionssignals ist, ergab sich der Wert für diese Fläche durch zweimalige Integration des Spektrums mit anschließender Bestimmung des Abstandes der beiden mittleren Stufen mittels zweier Cursor [119].

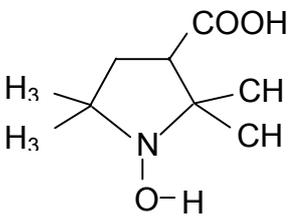
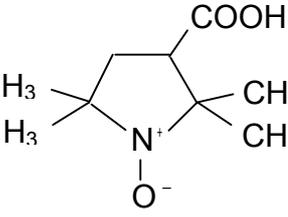
### **3.2.3. Eigenschaften der Spinprobe CPH**

Mit der ESR-Spektroskopie sind nur paramagnetische Substanzen, d.h. Moleküle mit freien Elektronen nachweisbar. Radikale sind jedoch häufig so kurzlebig, dass die Aufzeichnung eines ESR-Spektrums zu lange dauern würde. Mit Hilfe der sogenannten „Spintrapping“-Technik können diese reaktiven Substanzen indirekt detektiert werden. Dabei wird durch die Reaktion spezieller Verbindungen, den Spinproben, mit freien Radikalen ein relativ stabiles sekundäres Radikal gebildet [110,156].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Spinprobe CP-H (L-Optik, Berlin) verwendet. Dabei handelt es sich um ein zyklisches Hydroxylamin, das durch Oxidation in ein stabiles Nitroxid-Radikal umgewandelt wird. Die Stabilität ergibt sich einerseits durch die sterische Hinderung, die durch die Alkylierung der  $\alpha$ -ständigen C-Atome entsteht

und andererseits durch die Existenz von mesomeren Grenzstrukturen des Nitroxidradikals. Allerdings können diese Nitroxidradikale in Anwesenheit bestimmter Substanzen, z.B. Ascorbat, wieder rückreduziert werden. Tab.3.3. zeigt die Strukturformel des reduzierten und oxidierten Zustandes und das Molekulargewicht von CP-H [152,160,161].

**Tab. 3.3.:** Formel und Molekülmasse der Spinprobe CP-H [161]

Spintrap	reduzierte Form	oxidierte Form	Molekülmasse
CP-H			186,21

CPH kann auch ohne Anwesenheit von Radikalen oxidiert werden. Hierfür sind insbesondere Übergangsmetalle verantwortlich. Dieser Mechanismus wird Autooxidation genannt. Bei der quantitativen Bestimmung der gemessenen Radikale muss der durch Autooxidation gebildete Signalanteil als Basiswert vom Gesamtsignal subtrahiert werden [156].

Die Oxidation von CPH durch reaktive Sauerstoffspezies resultiert in einer Bildung von CP<sup>•</sup>. Durch die ESR-Spektroskopie konnte das triple-line Spektrum des CP Radikals detektiert werden. Benutzt wurde der MS 100 Spektrometer (Magnettech, Berlin, Germany). Die ESR-Messungen wurden mit folgenden Einstellparameter durchgeführt: Mikrowavefrequenz: 9,78 GHz, Modulationfrequenz: 100 kHz, Modulationamplitude 2 G und Mikrowavepower 18 mW. CPH wurde in einer Stickstoffatmosphäre in Pulverform bei -4°C im Kühlschrank aufbewahrt und kurz vor Gebrauch dem Kühlschrank entnommen. Vor Versuchsbeginn wurde CPH in der Pufferlösung aufgelöst (1 mM) und anschließend in dem geschlossenen System hinzugegeben [129,161-162].

### 3.2.4. Durchführung der ESR-Messungen

Die ESR-Messungen wurden mit Hilfe von Glaskapillaren durchgeführt. Nach Abnahme der Proben aus dem venösen Schenkel des rezirkulierenden Systems erfolgte die Messung unmittelbar bei Raumtemperatur. Die erste Probe wurde fünf Minuten nach Gabe von CPH gemessen. Je nach Experiment wurden alle fünf Minuten oder im Minutentakt gemessen. Das Führungsröhrchen wurde im Spektrometer so positioniert, dass sich im gesamten aktiven Bereich Probenflüssigkeit befand. Es war darauf zu achten, dass das Führungsröhrchen nicht verunreinigt war. Zusätzlich wurde die befüllte Glaskapillare jeweils unten und oben an den Öffnungsstellen mit Knetmasse abgedichtet.

PMA (Sigma) wurde in Dimethylsulphoxid (DMSO) in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst. Diese Stammlösung wurde bei -20 °C aufbewahrt und mehrfach verwendet. Die Arbeitslösung in der Konzentration 8 µg/ml wurde täglich aus der Stammlösung frisch vorbereitet. Nach PMA-Gabe wurden im Minutentakt Proben aus dem Perfusat genommen und im ESR-Spektrometer gemessen. PMA wurde direkt in den arteriellen Schenkel des rezirkulierenden Systems appliziert.

Nach Eingabe der Einstellparameter mit den angegebenen Werten wurden diese auf das ESR-Spektrometer übertragen. Danach wurde der automatische Abgleich manuell gestartet. Befanden sich die Kontrollparameter im Normbereich, konnte mit der Aufzeichnung des Spektrums begonnen werden. Für die Quantifizierung wurde das Second-field des ESR-Spektrums benutzt.

Mit dem Programm Analysis (Magnettech GmbH, Berlin) konnte die Amplitude des ESR-Signals bestimmt werden.

### **3.3. Statistik**

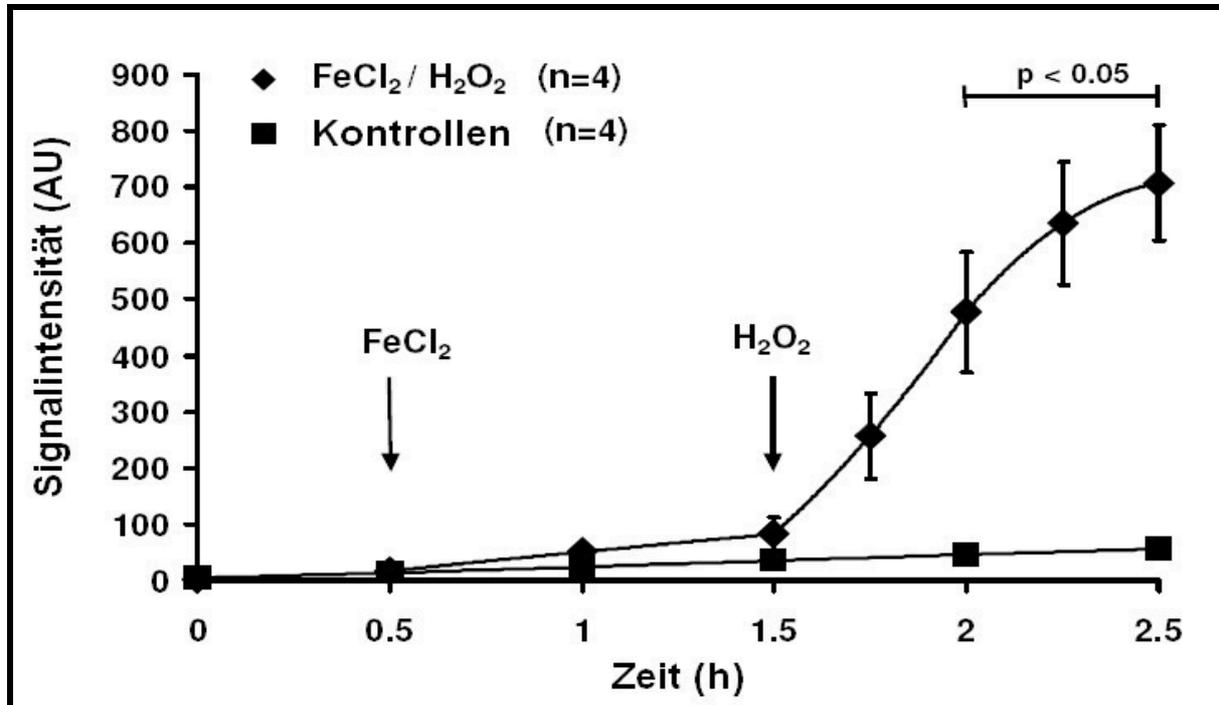
Die Auswertung der Daten erfolgte unter Zuhilfenahme eines Personalcomputers und der Programme Excel 1997(Microsoft, Ort) und PlotIt 3.2 (scientific programming enterprises, SPE, USA). Die vom einen XY-Schreiber (Rikadenki, Freiburg) aufgezeichneten Druck- und Gewichtskurven wurden ausgemessen und in Excel-Tabellen eingetragen. Die jeweiligen Mittelwerte und Standardfehler (SEM, standard error of the mean) wurden mit Hilfe von Excel 97 errechnet und mit Hilfe von PlotIt 3.2 grafisch dargestellt. Beim Vergleich zweier Gruppen kam der Student t-Test für unverbundene Stichproben zur Anwendung, beim Vergleich mehrerer Gruppen kam eine einfaktorielle Varianzanalyse (oneway analysis of variance, ANOVA) mit Student-Newman-Keuls-Test zur Anwendung. Statistische Signifikanz wurde für alle Vergleiche bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  angenommen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. ESR-Signalintensität unter Baselinebedingungen und in Gegenwart von $\text{FeCl}_2/\text{H}_2\text{O}_2$

Nach Erfüllung aller Einschlußkriterien wurde dem geschlossenen System (Perfusatvolumen, 150 ml) fünf Minuten vor Versuchsbeginn die „Spinprobe“ CPH in einer Gesamtkonzentration von 1 mM zugeführt. Zum Zeitpunkt 0 begann das Experiment mit der ersten ESR-Messung. Das ESR-Signal zeigte sich in ex-vivo Experimenten in einem „tripleband“ Spektrum (siehe Abb.3.7).

Unter normoxischer Ventilation der isoliert perfundierten Lunge über zweieinhalb Stunden, stieg die ESR-Signalintensität stetig linear an (siehe Abb. 4.1. und Abb. 4.4). Nach 30 Minuten erbrachte die zusätzliche Gabe von  $\text{FeCl}_2$  in einer Gesamtkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  im Perfusatvolumen eine Zunahme des ESR-Signals. Verglichen wurde dies mit einer Kontrollgruppe. Hier wurde kein  $\text{FeCl}_2$  zugesetzt. Der Anstieg des ESR-Signals mit Zugabe von Eisen (II) wies auf eine Übergangsmetall-katalysierte Oxidation der Spinprobe hin.



**Abb. 4.1.:** ESR-Signalintensität unter Baselinebedingungen und in Gegenwart von  $\text{FeCl}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ .  $\text{FeCl}_2$ -Gabe (1  $\mu\text{M}$ ) zum Zeitpunkt 0,5 h.  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Gabe (kontinuierliche Infusion (8  $\mu\text{mol}/\text{min}$ )) zum Zeitpunkt 1,5 h. Abszisse: Zeit (h). Ordinate: Signalintensität (AU). Mittelwert  $\pm$  SEM.

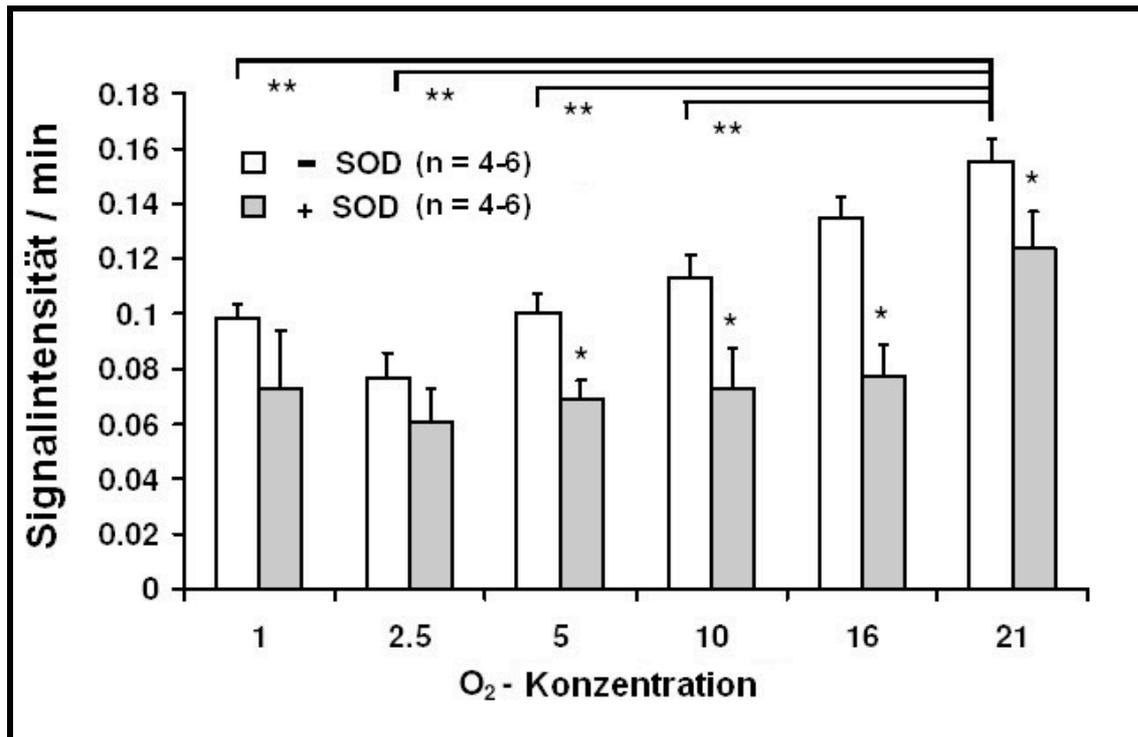
Um eine Bildung von reaktiven Hydroxylradikalen durch die  $\text{Fe}^{2+}$  vermittelte Fenton-Reaktion zu provozieren, wurde 30%iges Wasserstoffperoxid eingesetzt. Die Zugabe von Wasserstoffperoxid erfolgte als kontinuierliche Infusion mit  $8\mu\text{mol}/\text{min}$  in das rezirkulierende System mittels eines Perfusors. Der Anschluss des kontinuierlichen Wasserstoffperoxid-Perfusors an das rezirkulierende System erfolgte nach 1,5 Stunden. Es konnte durch Generierung von Hydroxylradikalen durch die Fenton-Reaktion ein ausgeprägter Anstieg des ESR-Signals nachgewiesen werden. Innerhalb einer Stunde nach Zuführen von Wasserstoffperoxid stieg das Signal bis auf  $707,1 \pm 103,1 \text{ AU}$  ( $n=4$ ) an (Abb. 4.1.).

#### **4.2. Hypoxieabhängigkeit der Superoxidfreisetzung und der vasokonstriktiven Antwort**

Um eine mögliche Sauerstoffabhängigkeit der Superoxidfreisetzung zu untersuchen, wurden die isolierten Lungen abwechselnd für eine Dauer von 30 Minuten mit verschiedenen inspiratorischen Sauerstoffkonzentrationen ventiliert (1,0 %, 2,5 %, 5,0 %, 10,0 %, 16,0%, 21,0 %). Insgesamt dauerten die Experimente drei Stunden. Es wurde darauf geachtet dass die Sauerstoffkonzentrationen randomisiert verändert wurden. Das ESR-Signal zeichnete sich durch einen linearen Anstieg in den letzten 20 Minuten der jeweiligen Periode aus. Für die ESR-Messungen wurden die Proben aus dem Lungeneffluent alle fünf Minuten entnommen und direkt gemessen. Für die einzelnen Ventilationsphasen wurden die Steigungen der ESR-Signalintensität ermittelt und in ein zeitliches Verhältnis gesetzt.

Der zeitabhängige Anstieg des ESR-Signals (Signalintensität pro Minute) war am größten bei einer Sauerstoffkonzentration von 21,0 % und am geringsten bei einer Sauerstoffkonzentration von 2,5 % (Abb. 4.2.).

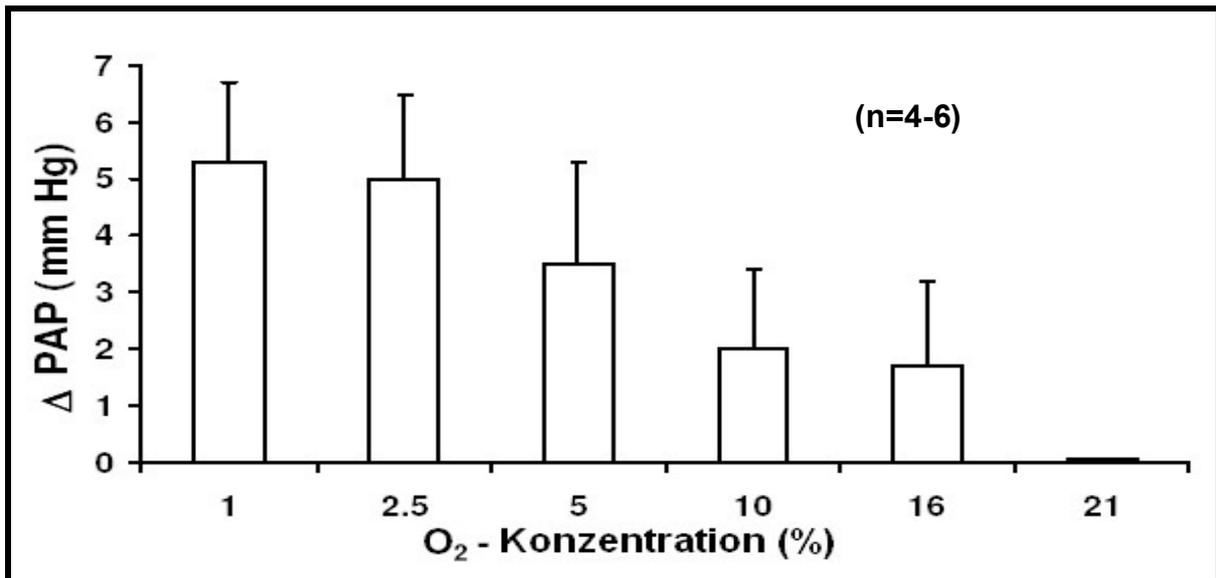
Parallel hierzu wurden die gleichen Versuchsbedingungen in Gegenwart von Superoxiddismutase (SOD) mit einer Konzentration von 150 U/ml durchgeführt. Die Gabe von SOD katalysierte die Dismutation von Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid. Die Signalintensität pro Minute war daher während allen Sauerstoffkonzentrationen verringert (Abb. 4.2.).



**Abb. 4.2.:** Hypoxieabhängige ROS-Freisetzung

Während einer Gesamtdauer von drei Stunden wurden die O<sub>2</sub>-Konzentrationen randomisiert von 1-21 % verändert. Die Ordinate zeigt die Signalintensität pro Minute. Die Abszisse zeigt die verschiedenen O<sub>2</sub>-Konzentrationen. Die -SOD-Gruppe ist in weiß und die +SOD-Gruppe ist in grau dargestellt. SOD (150 U/ml) katalysiert die Dismutation von Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid. Mittelwert ± SEM. \*Signifikante Unterschiede zwischen der -SOD-Gruppe und der +SOD-Gruppe für die jeweilige O<sub>2</sub>-Konzentration. \*\* Signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen inspiratorischen Sauerstoffkonzentrationen verglichen mit der 21% O<sub>2</sub>-Konzentration

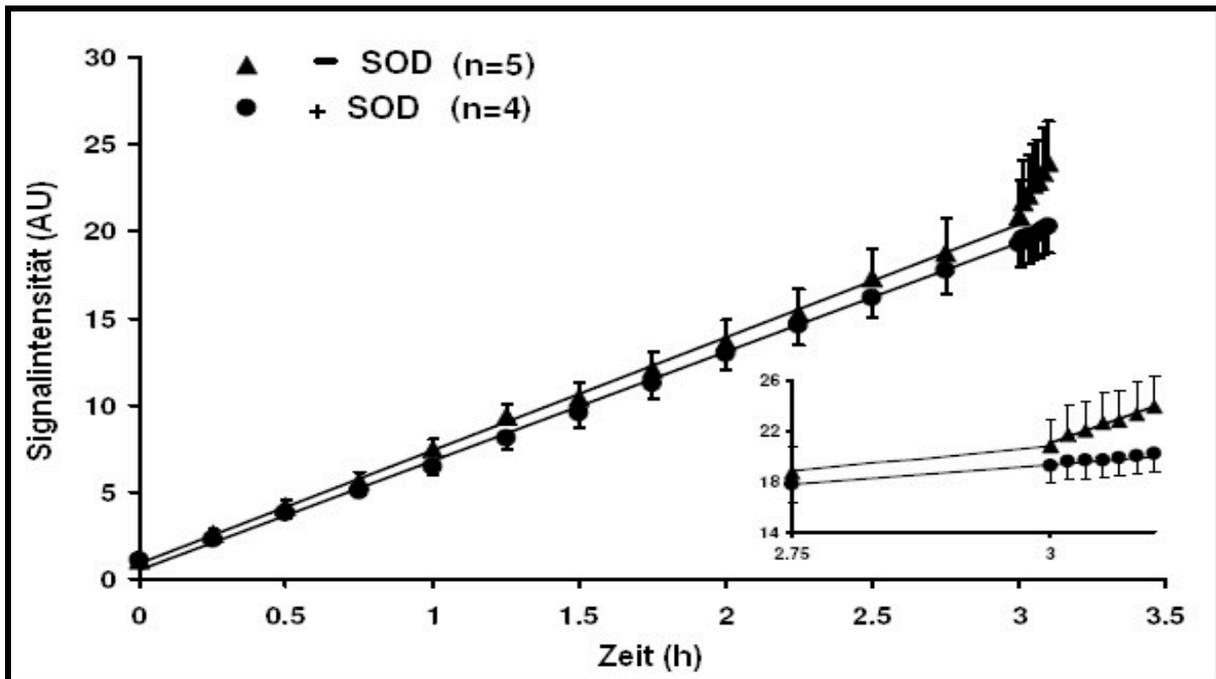
Abb. 4.3. stellt den Effekt der verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen im Ventilationsgas auf den pulmonal-arteriellen Druck (PAP) dar. Eine hypoxische Ventilation zeigte einen Anstieg des PAP. Am höchsten war der PAP bei einer Sauerstoffkonzentration von 1,0 % und am niedrigsten bei 16 %. Unter einer inspiratorischen Ventilation mit 21,0 % O<sub>2</sub> konnte man keinen Anstieg des PAP nachweisen.



**Abb. 4.3.:** Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV): Dargestellt ist der maximale Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes ( $\Delta$ PAP) für die verschiedenen O<sub>2</sub>-Konzentrationen. Der normoxische PAP lag bei  $8,8 \pm 0,6$  mmHg. Abszisse: verschiedene O<sub>2</sub>- Konzentrationen. Ordinate:  $\Delta$ PAP. Mittelwert  $\pm$  SEM:

#### 4.3. PMA induzierte Superoxidfreisetzung unter normoxischer Ventilation

Hierzu wurde die isoliert perfundierte Lunge zunächst normoxisch (21% O<sub>2</sub>) ventiliert. Nach drei Stunden erfolgte die Gabe von PMA mit einer Gesamtkonzentration von 1  $\mu$ M im Perfusatvolumen. PMA wurde dem rezirkulierenden System als intraarterieller Bolus zugeführt. Diese Applikation äußerte sich in einem raschen Anstieg des ESR-Signals. Im zeitlichen Verlauf war die Signalintensität vor und nach PMA-Bolus Gabe linear ansteigend. Dies ist in Abbildung 4.4. veranschaulicht. Durch Gabe von SOD in einer Konzentration von 150 U/ml ließ sich der PMA Effekt ganz blockieren (Abb.4.4.). Dies wies auf eine PMA-induzierte Superoxidfreisetzung hin.

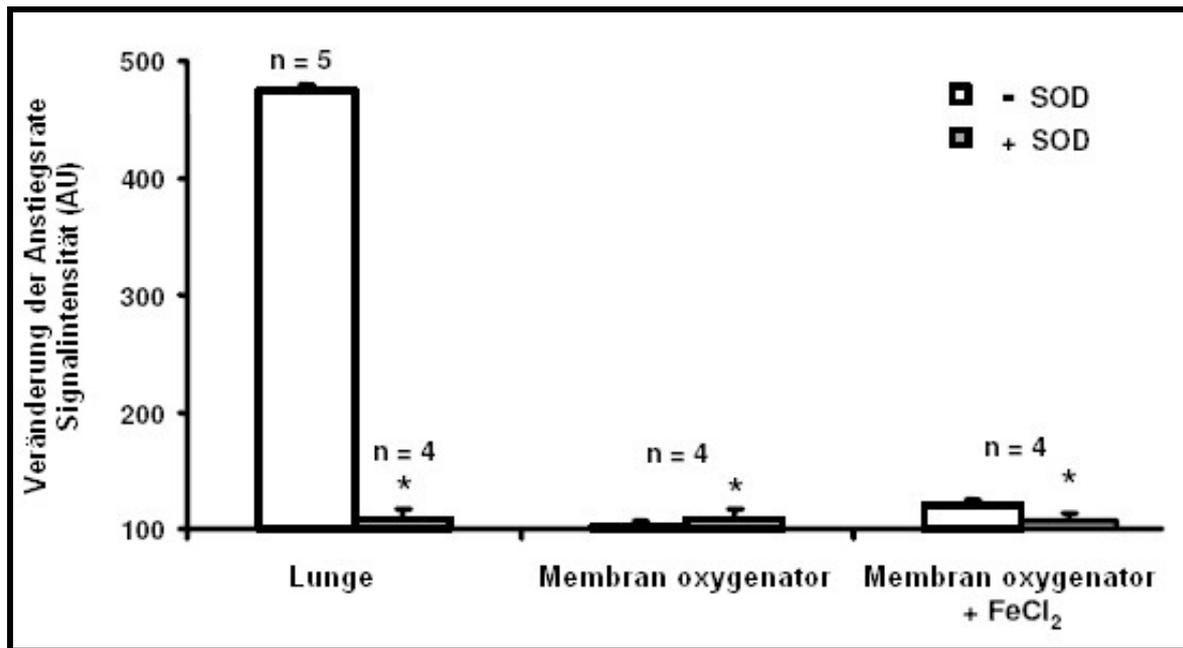


**Abb. 4.4.:** PMA-Abhängigkeit der Signalintensität (AU) während normoxischer Ventilation. Vollständige Unterdrückung des PMA-Effektes unter SOD. Dies spricht für eine PMA-induzierte Superoxidbildung. Abszisse: Zeit (h). Ordinate: Signalintensität (AU). Mittelwert  $\pm$  SEM.

Es wurden zunächst die Anstiegsraten vor und nach PMA-Bolusgabe ermittelt. Hierdurch konnte eine genaue Aussage über die prozentuale Zunahme der ESR-Signalintensität vor und nach PMA-Bolusgabe getroffen werden. Abb. 4.5. zeigt einen prozentualen Vergleich der Anstiegsraten vor und nach PMA-Bolusgabe der Gruppen in An- bzw. Abwesenheit von SOD (150 U/ml). Es zeigte sich eine deutlich reduzierte prozentuale Anstiegsrate in der Gruppe mit SOD. Dies spricht für die Dismutation von Superoxidanionen durch SOD. Als Kontrollversuche dienten Hohlfasermembran-Oxygenatoren. Der Versuchsablauf der Hohlfasermembran-Oxygenatoren entsprach dem der isolierten Lunge. Durch die Experimente mit Hilfe der Oxygenatoren konnten zwei Effekte nachgewiesen werden. Erstens konnte gezeigt werden, dass die Superoxidanionen-Generierung durch PMA ausschließlich in der Lunge geschieht. Zweitens konnte ein direkter Effekt von PMA auf die CPH-Oxidation ausgeschlossen werden. Im Rahmen der Hohlfasermembran-Oxygenator-Experimente zeigte sich unter Einsatz von  $1 \mu\text{M}$   $\text{FeCl}_2$  die schon beschriebene Autooxidation (siehe Abschnitt 3.2.3).

Weiterhin konnte ein Effekt von PMA auf den pulmonalarteriellen Druck (PAP) nachgewiesen werden. Vor PMA-Bolusgabe lag der PAP im Durchschnitt bei

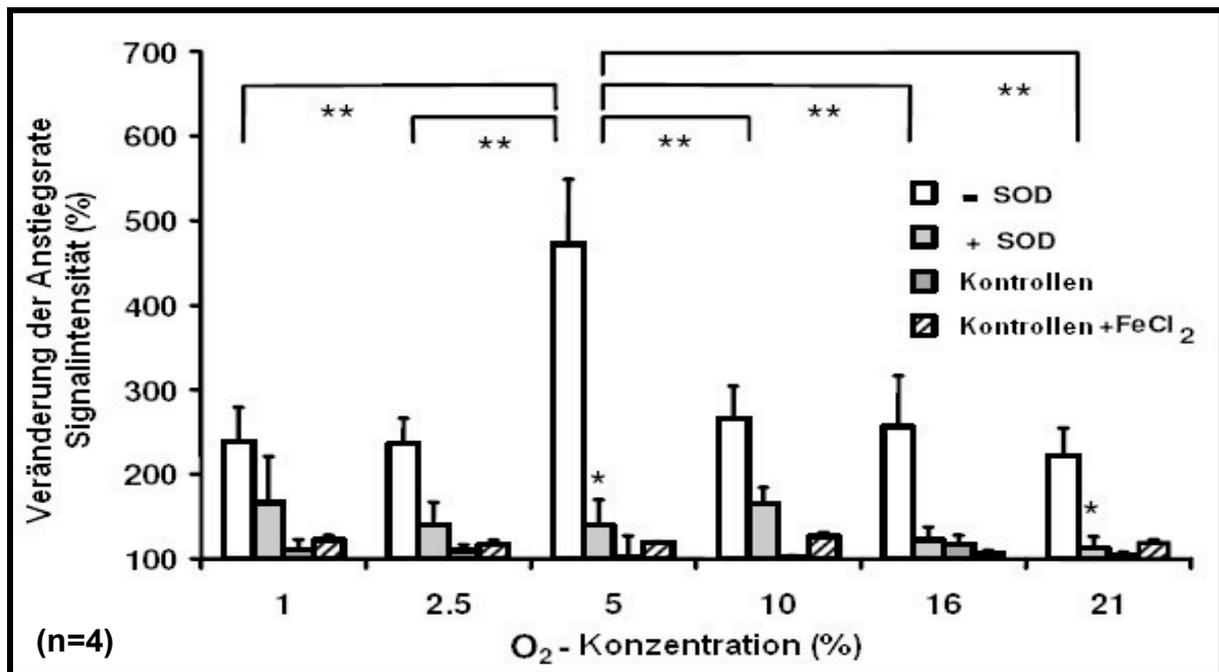
10,4±0,4 mmHg in Abwesenheit von SOD und in der SOD-Gruppe im Durchschnitt bei 8,9±0,7 mmHg. Nach PMA-Gabe lag der PAP in Abwesenheit von SOD nach sechs Minuten im Durchschnitt bei 15,2±1,1 mmHg und in der SOD-Gruppe bei 9,9±0,7 mmHg. Dies wies auf eine Unterdrückung des PAP Druckes durch Dismutation von Superoxidanionenradikalen in Anwesenheit von SOD hin. Superoxidanionen-Radikale könnten eine Rolle in der Regulation des pulmonalen Gefäßtonuses spielen.



**Abb. 4.5.:** Prozentuale Veränderung der ESR-Signal Anstiegsraten in An- bzw. Abwesenheit von SOD nach PMA-Bolus-Gabe in den pulmonalarteriellen Schenkel während normoxischer Ventilation. Als Kontrollen dienten Versuche mit einem Hohlfasermembranoxygenator. Ordinate: Veränderung der Anstiegsrate Signalintensität (AU). Mittelwert ± SEM. \*Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen in An- bzw. Abwesenheit von SOD

In weiteren Experimenten wurde der Effekt der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration auf die PMA induzierte CP-Radikalbildung untersucht. Hierfür wurden kurze Experimente mit einer Laufzeit von jeweils 30 Minuten mit einer bestimmten inspiratorischen Sauerstoffkonzentration (21,0 %, 16,0 %, 10,0 %, 5,0 %, 2,5 %, 1,0 %) durchgeführt. Nach 30 Minuten folgte die PMA-Bolusgabe (1 µM) in den arteriellen Schenkel des Perfusionssystems. Auch hier wurden die Steigungen der ESR-Signalintensität pro Zeiteinheit vor und nach PMA-Bolusgabe ermittelt. Die höchste Signalintensität pro Zeiteinheit zeigte sich bei einer Sauerstoffkonzentration von 5,0 %. Parallele Experimente mit SOD zeigten dass ein Großteil der ESR-

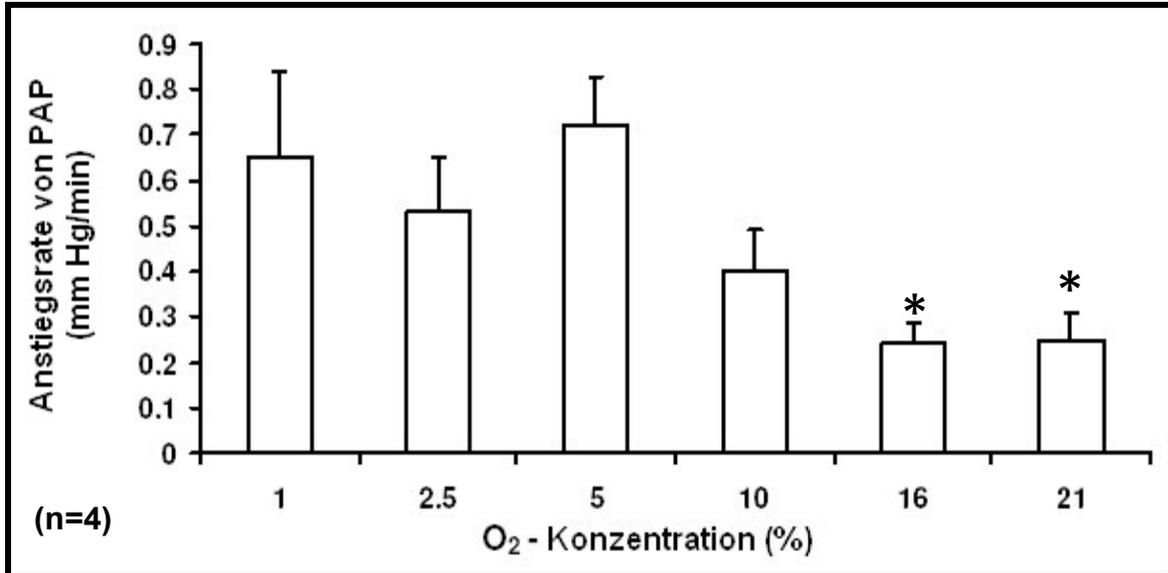
Signalintensitätssteigerung auf eine Superoxidfreisetzung zurückzuführen ist. Erneut dienten Hohlfasermembran-Oxygenatoren als Kontrollen. Diese zeigten bei den jeweiligen O<sub>2</sub>-Konzentrationen keinen Anstieg der ESR-Signalintensität nach PMA Bolusgabe. Dies bedeutete dass ein Anstieg der ESR-Signalintensität ausschließlich pulmonal zu generieren war. Auch nach Zugabe von FeCl<sub>2</sub> (1 µM) war keine Steigerung der Signalintensität festzustellen. In der Abbildung 4.7. zeigt sich die PMA-Bolusgabe in einer Steigerung des PAP wieder. Die größte Steigerung war bei einer Ventilation von 5 % O<sub>2</sub> zu beobachten.



**Abb. 4.6:** Sauerstoffabhängigkeit der PMA induzierten Veränderung der ESR-Signalintensität in An- bzw. Abwesenheit von SOD. Die Ordinate stellt die Signalintensitätssteigerung nach PMA Gabe dar. Abszisse: verschiedene Sauerstoffkonzentrationen. Als 100 % wurde die Steigung der Signalintensität pro Zeiteinheit vor PMA-Bolusgabe gesetzt. Als Kontrolleexperimente dienten Hohlfasermembranoxygenatoren. Mittelwert  $\pm$  SEM. \*Signifikante Unterschiede zwischen -SOD und +SOD-Gruppen. \*\*Signifikante Unterschiede bei verschiedenen O<sub>2</sub>-Konzentrationen.

#### 4.4. PMA induzierter Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (PAP)

Unter einer inspiratorischen Sauerstoffkonzentration von 5,0 % konnte der schnellste Anstieg der ESR-Signalintensität verifiziert werden. Auch der PAP stieg unter einer Ventilation mit 5,0 % O<sub>2</sub> nach PMA-Gabe am stärksten an.



**Abb. 4.7.:** Steigerung des PAP (mmHg) pro Minute nach PMA Bolusgabe in den rezirkulierenden pulmonalarteriellen Schenkel. Abszisse: verschiedene Sauerstoffkonzentrationen. Ordinate: Anstiegsrate von PAP (mmHg/min). \* Signifikanter Unterschied vs. 5,0 % O<sub>2</sub>. Mittelwert ± SEM.

## 5. Diskussion

### 5.1. Methodische Aspekte

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) spielen eine wichtige Rolle bei diversen pulmonalen und kardiovaskulären Erkrankungen wie Atherosklerose, Herzinsuffizienz, KHK, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, ARDS, Pneumonie und Schlafapnoe [1-7,9-11,14,18,30-34,38-39,41,163]. Durch vermehrte Bildung von ROS oder/und verringerter antioxidativer Kapazität kommt es zum Überwiegen der ROS und dadurch zu oxidativem Stress [1,3-4,6-9,33,41]. Dies ist bei vielen kardiopulmonalen Erkrankungen der Fall. Auch im Rahmen von physiologischen Prozessen, z.B. bei der Signaltransduktion verschiedener Regulationsprozesse oder der Regulation des Gefäßwandtonuses spielen ROS eine wichtige Rolle [1,6-8,14-18]. Eine mögliche Bedeutung von ROS an Signaltransduktionsmechanismen von Hypoxie-Zuständen im pulmonalen Kreislauf wird bis heute kontrovers diskutiert [41-44,50]. Zudem ist nicht hinreichend geklärt, ob ROS während alveolärer Hypoxie vermindert oder paradoxerweise vermehrt freigesetzt werden [41,46,50]. Weiterhin bleibt die Quelle der ROS-Generation offen [41,46,50,130]. Umso wichtiger ist die Detektion und Charakterisierung von ROS in der pulmonalen Zirkulation. Der Nachweis von ROS in intakten Organen stellte sich bisher schwierig und komplex dar [41]. Die Nachweismethoden erfolgten bisher überwiegend unter Verwendung von verschiedenen Farbstoffen, wie z.B. Fluorochrome, die aber nur eine begrenzte Spezifität oder Sensitivität sowie unerwünschte Eigeneffekte zeigten [103-108]. Der Einsatz verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe und die Methode der Chemilumineszenz, welche bei der Untersuchung von isolierten Zellen und von Gewebeschnitten verwendet werden, ist ebenfalls wegen begrenzter Spezifität und Sensitivität limitiert [103-108]. Den bisherigen Methoden, die sich mit der Detektion von reaktiven Sauerstoffspezies aus der pulmonalen Kreislaufbahn beschäftigten, mangelte es an der Spezifität, die Autoxidation der eingesetzten „Spinprobe“ zu charakterisieren [103-108,128,150,164].

Die ESR-Technik weist möglicherweise einige dieser Defizite nicht auf. Sie stellt eine spezifische Methode zur Messung von reaktiven Sauerstoffspezies dar [110,111,126-127]. Nach derzeitigem Kenntnisstand ist die ESR- und Spintrapping-Technik für die vorliegende Fragestellung die beste Detektionsmethode. Die ESR-Analyse erlaubt

eine quantitative Aussage über die gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies [110,111,114,122-124].

Bei der Detektion von Radikalen in ex vivo perfundierten Organen oder Zellkulturen mittels ESR-Spektroskopie können verschiedene Radikalsorten an der Signalgebung beteiligt sein [156,162,166,168]. Dem Dreilinienspektrum des Spintraps CPH kann aber nicht entnommen werden welche Radikale und in welchem Verhältnis die einzelnen Radikalspezies zum Signal beitragen. Denn die Amplitude erlaubt nur eine Aussage über die Summe der beteiligten Radikale. Zur Quantifizierung der verschiedenen Radikalspezies können aber bestimmte Substanzen dem Perfusionsmedium zugesetzt werden, die ganz spezielle Reaktion inhibieren oder katalysieren, so dass eine Radikalspezies entweder nicht entsteht oder aber weiterreagiert [156,162,166,168]. Der Unterschied zwischen der Amplitude des Signals mit und ohne einer zugesetzten Substanz entspricht dann dem Anteil dieser Radikalspezies an der Gesamtradikalmenge. Als Beispiel sei die Superoxiddismutase (SOD) genannt, die die Reaktion vom Superoxid zum Wasserstoffperoxid katalysiert [22,24].

Aufgrund der zuvor beschriebenen geringen chemischen Halbwertszeit der Radikal-Addukte ist die räumliche Nachbarschaft von Messeinheit und Versuchsanordnung des isolierten Lungenmodells notwendig. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit gewährleistet, indem die ESR-Messeinheit und der Messplatz der isoliert perfundiert und ventilierten Lunge unmittelbar nebeneinander aufgebaut wurden.

Schon in einer vorausgegangenen Studie wurde die ESR-Technik und die Spintrapping-Technik für die Detektion von reaktiven Sauerstoffspezies an isoliert ventilert und perfundierten Kaninchenlungen eingesetzt. Jedoch wurde die „Spinprobe“ außerhalb des Perfusionssystems dem Lungeneffluent zugesetzt. Dadurch wurden die ROS nicht direkt im pulmonalen Gefäßbett detektiert. Eine große Problematik stellte zudem die bekannte kurze Halbwertszeit der ROS dar [116,165].

Unter Berücksichtigung der kurzen Halbwertszeit von reaktiven Sauerstoffspezies und um ROS direkt am Ort des Entstehens abzufangen wurde im Rahmen dieser Arbeit, die „Spinprobe“ direkt in das rezirkulierende System hinzugefügt. Eingesetzt wurde das zyklische Hydroxylamin CPH. Umfangreiche Literatur zeigt das CPH ein effektiver Radikalfänger und quantitative Messungen von reaktiven Sauerstoffspezies

mittels Detektion des korrespondierenden Nitroxid Radikals erlaubt. Die Reaktionszeit von CPH mit reaktiven Sauerstoffspezies beträgt  $3.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  [129,153,161,162,166-169]. Dies ist ungefähr 10 fach höher als die bisher eingesetzten Nitronenderivate wie z.B. DMPO oder DEPMPO [129,,153,161,162,166-169]. Für die Detektion von Superoxidanionen sind Nitronenderivate aufgrund ihrer geringen Spezifität und geringen Sensitivität für ex-vivo Experimente nicht geeignet. Es ist bekannt, dass das gebildete Spinaddukt in vivo und in vitro nicht stabil ist [129,,153,161,162,166-169]. Ferner ist bekannt das CPH weniger anfällig als z.B. das Hydroxyamin 1-Hydroxy-2,2,2,2-Tetramethyl-4-Oxo-Piperidin (Tempone-H) gegenüber der Reduktion durch die Ascorbinsäure ist [129,153,161,162,166-169]. Die geringe Aufnahme von CPH über die Zellmembran erlaubt die direkte Messung von extrazellulär gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies im Effluent der Lunge. Dies beruht auf der hohen Stabilität des gebildeten Nitroxidradikals, sowohl in vivo als auch in ex-vivo. [129,153,161,162,166-169].

Beschrieben ist jedoch das durch Spuren von Übergangsmetallen wie Eisen oder Kupfer die Autooxidation der „Spinprobe“ katalysiert wird [170]. Durch Zugabe von  $\text{Fe}_2\text{Cl}_2$  in das rezirkulierende Perfusat konnte einen Anstieg der ESR-Signalintensität verzeichnet werden. Dies bestätigt die Autooxidation der eingesetzten „Spinprobe“ CPH durch Spuren von Übergangsmetallen. Übergangsmetalle wurden gezielt durch Chelatoren eliminiert. Eingesetzt wurden die Chelatoren DFO und DETC [19,25,126,170].

Aus diesem Grunde wurde der Puffer mit  $20 \mu\text{M}$  DFO und  $5 \mu\text{M}$  DETC behandelt. Dies führte zur Sedimentation und zur Ausfällung von Übergangsmetallen. So wurden alle Experimente der isoliert perfundiert und ventilierten Kaninchenlunge mit dem DFO-und DETC-behandelten Puffer durchgeführt. Dieser behandelte Puffer der zur Perfusion der isoliert ventilierten Kaninchenlungen benutzt wurde, konnte erfolgreich mit Hilfe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zeigen daß dieser zur Detektion von ROS geeignet ist. Nach Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  kam es zu einem deutlichen Signalanstieg. Der Anstieg ist am ehesten mit der Generation von Hydroxylradikalen über die Fenton-Reaktion erklärbar [26-27,170-172].

Weiterhin zeigen die erhobenen Daten zeigen, dass es offensichtlich zur kontinuierlichen Oxidation von CPH während der Zirkulation durch die Lunge kommt.

Dies geschieht entweder abhängig von ROS oder durch Autooxidation und ist somit unabhängig von durch die Lunge gebildeter ROS.

## **5.2. Superoxidfreisetzung und Sauerstoffabhängigkeit**

In weiteren Experimenten wurde die Abhängigkeit der ESR-Signalintensität von der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration untersucht. Hierzu wurden verschiedene inspiratorische Sauerstoffkonzentrationen verwendet (1,0 %, 2,5 %, 5,0 %, 10,0 %, 16,0 %, 21,0 %). Die Zusammensetzung des inspiratorischen Gases wurde alle 30 Minuten verändert. Die niedrigste ESR-Signalintensität zeigte sich bei 2,5 %. Bei 1,0 % kann es zu einem Anstieg der ESR-Signalintensität. Durch Zugabe von SOD konnte bei allen Sauerstoffkonzentrationen die ESR-Signalintensität signifikant gesenkt werden. Extrazelluläres SOD, welches die Zellmembran nicht passiert, katalysiert die intravaskuläre Dismutation von Superoxidradikalen [22,24]. Dies deutet darauf hin, dass ein Anteil des ESR-Signals durch intravaskulär gebildetes Superoxid zustande kommt.

Da sich andere ROS, außer Superoxidradikale, jedoch nicht durch SOD hemmen lassen, kann das CP-Signal möglicherweise zusätzlich durch andere ROS induziert werden [22,24].

Dass CPH in geringen Mengen die Zellmembran passiert ist bekannt. In wieweit intrazelluläres Superoxid durch CPH detektiert werden kann, sollte weitergehend untersucht werden (z.B. in der vaskulären glatten Muskelzelle). Sinnvoll scheint in diesem Zusammenhang die weitere Analyse intrazelluläre Schlüsselenzymsysteme, in denen eine ROS Generierung involviert ist. Die erhobenen Daten sagen zudem nichts über die Herkunft der Superoxide aus. Einige Enzymsysteme wie NADPH-Oxidasen, Xantin-Oxidasen oder Arachidonsäure-Oxidasen und die mitochondriale Atmungskette kommen für die sauerstoffabhängige Superoxidfreisetzung in Betracht [16,17,43-44,49,153,161,162,163,172-174].

Unter hypoxischer Ventilation zeigte sich ein Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (PAP). Die HPV dient dazu, den Gasaustausch zu optimieren und hypoventilierte Areale von der Perfusion auszuschließen [64]. In der Literatur wird darüber kontrovers diskutiert, ob es zu einer Zunahme oder Abnahme von ROS unter Hypoxiebedingungen kommt und wo die Quelle der hypoxie-induzierten ROS-Generierung liegt [41,46]. Es gibt Hinweise, dass in der Lunge gebildete reaktive

Sauerstoffspezies für diese hypoxieinduzierten Vasokonstriktion eine bedeutende Rolle spielen. mitochondriale NADPH-Oxidasen sind in diesem Zusammenhang als eine mögliche Quelle zu nennen [41,42,45-50,64,58,175].

### **5.3. Superoxidfreisetzung und die Rolle von NADPH-Oxidasen**

Zur Untersuchung der NADPH-Oxidase-abhängigen Superoxidfreisetzung wurde PMA benutzt. PMA stimuliert durch Aktivierung der Proteinkinase C NADPH-Oxidasen [5,47-51]. In Untersuchungen an humanen kultivierten Lymphoblasten-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass PMA durch Stimulierung von NADPH-Oxidasen, über eine Aktivierung der Proteinkinase C, Superoxidanionen generiert. Im Rahmen der durchgeführten Arbeit konnte in eigenen Experimenten nachgewiesen werden, dass es tatsächlich unter PMA-Einfluss zu einem signifikanten Anstieg der CPH-Oxidation kommt. Dies könnte auf einen Anstieg einer intravaskulären Superoxidbildung zurückzuführen sein [166].

Zur weiteren Charakterisierung wurde Superoxiddismutase eingesetzt. Es existieren drei Isoformen der SOD (zytosolische (Cu-Zn-SOD), mitochondriale (Mn-SOD), die extrazelluläre CuZn-SOD (EC-SOD)). Alle drei Isoformen katalysieren die gleiche Reaktion [171,173-174]. Unter dem Einsatz des extrazellulären Cu-Zn-SOD ließ sich die PMA induzierte CP-Bildung komplett hemmen bzw. antagonisieren. Um eine direkte CPH-Oxidation durch PMA auszuschließen, wurde die Lunge im Rahmen von Kontrollexperimenten, durch ein Hohlfaseroxygenator ersetzt. Hierbei ließ sich kein Anstieg des ESR-Signals durch Zugabe von PMA nachweisen. Somit konnte eine direkte Substanzwechselwirkung und somit eine direkte Oxidation der Spinprobe durch PMA ausgeschlossen werden. Übertragen ins pulmonale System bedeutete dies, dass PMA sehr wahrscheinlich über eine Stimulierung von NADPH-Oxidasen Superoxidanionenradikale generiert und dadurch eine vermehrte Bildung der CPH-Oxidation bewirkt [44,165-166].

In weiteren, an die vorliegende Arbeit anschließenden Untersuchungen konnte die PMA-induzierte Superoxidgenerierung mit Hilfe des NADPH-Oxidase-Inhibitor Apozynin gehemmt werden. Weiterhin blieb in aktuellen Untersuchungen in Mäusen, welchen die NADPH-Oxidase Untereinheit gp91phox (Nox-2) fehlt, der PMA-Effekt aus. Von großer Bedeutung kann dies bei Patienten mit chronisch granulomatöser

Erkrankung sein. Im Rahmen dieser Erkrankung kommt es zum Fehlen einer oder mehrerer Untereinheiten der NADPH-Oxidasen [131,134,140].

Ebenso konnte in weiteren Untersuchungen Rotenone, ein mitochondrialer Komplex I Inhibitor den Effekt der PMA-induzierten Superoxidfreisetzung nicht verhindern. Dies kann hindeuten, dass mitochondrial gebildete Superoxide keine Rolle bei der PMA-induzierten hypoxieabhängigen Superoxidbildung spielen.

Aktuellen Daten zeigten, dass die akute und die protahierte HPV unterschiedlich reguliert werden. Die NADPH-Oxidase-Aktivität ist mehr in der Regulation der akuten Phase der HPV beteiligt. So zeigt in jüngeren Untersuchungen die protahierte Phase der HPV eine vermehrte mitochondriale Abhängigkeit.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass PMA einen PAP-Anstieg auslöst. Diese Vasokonstriktion konnte durch SOD gehemmt werden. Ein direkter Effekt von PMA induzierten Superoxidanionenradikalen könnte hierbei eine entscheidende Rolle spielen. In neuesten Untersuchungen konnte diese PMA induzierte Vasokonstriktion mit Hilfe eines NADPH-Oxidase Inhibitors gehemmt werden. Diese Daten zeigen somit zusammen mit den Daten der vorliegenden Arbeit, dass PMA eine Vasokonstriktion über eine Stimulation von NADPH-Oxidasen und letztlich durch Superoxidbildung induziert. Untersuchungen anderer weisen darauf hin, dass PMA eine Vasokonstriktion über Kalziumsensitivierung und Inhibition von Myosin-Leichtkettenphosphatasen induziert [61-62,66,76-82,90,99]. Die Superoxidanionenradikal-induzierte Vasokonstriktion in dieser Arbeit schließt eine intrazelluläre Kalzium Mobilisation durch zyklische ADP-Ribose Produktion, Aktivierung der RhoA/Rho-Kinase-Aktivität, oder Inaktivierung von NO durch Superoxid nicht aus [75,88, 91,120,176-178].

Zur Untersuchung der Sauerstoffabhängigkeit der PMA induzierten Superoxidbildung wurden in den eigenen Untersuchungen isolierte Kaninchenlungen mit unterschiedlichen inspiratorischen Sauerstoffkonzentration ventiliert (21,0 %, 16,0 %, 10,0 %, 5,0 %, 2,5 %, 1 %). Insgesamt betrug die Versuchsdauer 30 Minuten. Am Ende (nach 30 Minuten) wurde mittels eines pulmonalarteriellen Bolus mit PMA stimuliert. Hierbei zeigte sich die höchste ESR-Signalintensität bei einer inspiratorischen Ventilation mit 5,0% O<sub>2</sub>. Zudem zeigte sich die stärkste vasokonstriktive Antwort ebenfalls bei einer inspiratorischen Sauerstoffkonzentration von 5,0% O<sub>2</sub>.

Die erhobenen Daten zeigen somit, dass hypoxische Ventilation einen Anstieg des ESR-Signals durch PMA-induzierte Superoxidfreisetzung bewirkt. Dabei kommt es zu einer pulmonal-arteriellen Vasokonstriktion. Es ist anzunehmen dass dieser Mechanismus eine Rolle bei der Regulation der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion spielt

Die endotheliale NADPH-Oxidase gilt als Hauptquelle für vaskuläre Superoxidbildung und unterliegt vielfältigen Regulationsmechanismen [143-146]. Angiotensin II spielt möglicherweise in der Modulation der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion eine bedeutende Rolle [132,181]. Es ist bekannt, dass Angiotensin II zu einer Expressionserhöhung der NADPH-Oxidase-Untereinheit gp91-phox führt und dadurch eine verstärkte Generierung von Superoxiden bewirkt [180]. Weiterhin führt Angiotensin II zu erhöhten Plasmaspiegeln von Endothelin-1, welches zu den potentesten Vasokonstriktoren gehört. In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Angiotensin II unter Hypoxie über Stimulation von vaskulären NADPH-Oxidase eine Vasokonstriktion ausübt. Hierbei wird erhöhter oxidativer Streß induziert Dieser Mechanismus ist möglicherweise für die Regulation der protahierten HPV von Bedeutung [8,56,57,178-181].

In der Regulation der NADPH-abhängigen Superoxidbildung kommt NO ebenfalls eine wichtige Bedeutung zu. NO kann zur Hemmung der NADPH-Oxidase abhängigen Superoxidfreisetzung durch S-Nitrosylierung der NADPH-Oxidase Untereinheit p47phox führen. Außerdem kann es  $O_2^{\cdot-}$  abfangen. Hierbei entsteht das  $ONOO^{\cdot-}$  [32,184].

Drei verschiedene wichtige Effekte sollten in Zusammenhang mit der PMA-induzierten intravaskulären Superoxidfreisetzung berücksichtigt und kritisch betrachtet werden. Erstens existieren Hinweise dafür, dass es möglicherweise einen direkten Effekt von Hypoxie auf die Aktivität von NADPH-Oxidase gibt. Obwohl ein derartiger Effekt für NADPH-Oxidase von phagozytierende Zellen nicht bekannt ist, ist dies für vaskuläre NADPH-Oxidase bei verschiedenen Isoformen nicht auszuschließen. An kultivierten Endothelzellen scheint es unter Hypoxie und NADPH-Stimulation zur vermehrter Bildung von ROS zu kommen. Es könnte eine Modulation der HPV durch Endothelzellen geben. Wahrscheinlich spielen Endothelzellen zur Aufklärung der Rolle von ROS in Ischämie/Reperfusion eine wichtige Rolle. Als zweites kann die ansteigende Superoxidfreisetzung mit

Veränderungen in der Kaskade der NADPH-Oxidasen-Aktivierung in Zusammenhang stehen. Alternativ kann auch über einen Proteinase C unabhängigen Weg nachgedacht werden. Als drittes besteht sicherlich eine Abhängigkeit von der intravaskulären/zellulären Sauerstoffkapazität [102-104,182-183].

## 6 Zusammenfassung

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) spielen eine wichtige Rolle in biologischen Systemen. ROS gewinnen bei einer Reihe von Krankheiten, aber auch bei physiologischen Regulationsmechanismen, immer mehr an Bedeutung. Deshalb ist es wichtig, ihre Rolle in pathophysiologischen Prozessen, wie z.B. beim ARDS (Adult Respiratory Distress Syndrome), bei Sepsis, beim Ischämie/Reperfusionsschaden und bei Signaltransduktionsmechanismen in biologischen Systemen aufzuklären. Im pulmonalen System wird vermutet, dass reaktive Sauerstoffspezies unter Hypoxie am Mechanismus der Ventilations-Perfusions-Anpassung beteiligt sind. Jedoch ist unklar, ob ROS während alveolärer Hypoxie vermindert oder paradoxerweise vermehrt freigesetzt werden und von welcher Quelle die ROS gebildet werden. Als Quellen kommen u.a. Mitochondrien und NADPH-Oxidasen in Betracht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode zur Detektion von intravaskulär freigesetzten ROS an der isoliert ventilierten und perfundierten Kaninchenlungen etabliert. Hierbei stellte die Kombination aus Elektronenspinresonanzspektroskopie (ESR-Spektroskopie), Spin-Trapping-Technik und der Methode der isolierten Lunge eine neue Entwicklung dar. Als „Spinprobe“ wurde in der vorliegenden Arbeit das zyklische Hydroxylamin 1-Hydroxy-3-Carboxy-2,2,5,5-Tetramethylpyrrolidin (CPH) benutzt und charakterisiert. CPH wurde in den letzten Jahren zur quantitativen Messung von reaktiven Sauerstoffspezies in biologischen Systemen eingeführt. ROS können mit der Detektion des korrespondierenden Radikals 3-Carboxy-Proxyl ( $CP^{\cdot}$ ) mittels ESR quantifiziert werden. Durch ESR-Spektroskopie konnte das triple-line Spektrum des  $CP^{\cdot}$  Radikals detektiert werden.

CPH hat die Eigenschaft, dass es auch ohne Anwesenheit von Radikalen durch Sauerstoff oxidiert werden kann. Dieser Vorgang wird als Autooxidation bezeichnet. Aus diesem Grund wurde zunächst eine Charakterisierung der Autooxidation notwendig.

Um eine mögliche Sauerstoffabhängigkeit der Superoxidfreisetzung zu untersuchen, wurden die isolierten Lungen alternierend mit verschiedenen inspiratorischen Sauerstoffkonzentrationen ventiliert. Hierbei zeigte sich ein Minimum des ESR-Signals bei 2,5 %  $O_2$ . Durch Zugabe von Superoxiddismutase (SOD) konnte bei allen Sauerstoffkonzentrationen die ESR-Signalintensität signifikant gesenkt werden. Dies

deutet darauf hin, dass ein Anteil des ESR-Signals durch intravaskulär gebildetes Superoxid zustande kommt. Weiterhin kam es unter der Applikation von Phorbolmyristataacetat (PMA) zu einer Vasokonstriktion und zu einem signifikanten Anstieg der CPH-Oxidation. Unter dem Einsatz der SOD ließ sich die PMA induzierte  $CP^{\cdot-}$ -Bildung und die Vasokonstriktion komplett hemmen. Zur Untersuchung der Sauerstoffabhängigkeit der PMA induzierten Superoxidbildung wurden mit unterschiedlichen inspiratorischen Sauerstoffkonzentrationen ventiliert. Hierbei zeigte sich die höchste ESR-Signalintensität und die stärkste vasokonstriktive Antwort bei einer inspiratorischen Ventilation mit 5,0%  $O_2$ .

In neuesten Untersuchungen konnte diese PMA induzierte Vasokonstriktion mit Hilfe eines NADPH-Oxidase Inhibitors gehemmt werden.

Die Daten zeigen, dass die durch PMA induzierte Vasokonstriktion wahrscheinlich durch Superoxid, generiert von NADPH-Oxidasen, vermittelt wird und dass es bei Hypoxie zu einer paradoxen, vermehrten  $O_2^{\cdot-}$  Freisetzung kommen kann. Die Daten lassen weiterhin den Schluss zu, dass in der hypoxieabhängigen Regulation des pulmonalen Gefäßtonuses NADPH-Oxidasen involviert sein könnten. Weiterführende Untersuchungen sollten auf die zelluläre Ebene fokussieren, um die subzelluläre Quelle der hypoxieabhängigen ROS-Bildung zu identifizieren. Weiterhin kann die im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierte Methode zur Untersuchung der ROS-Bildung bei Ischämie/Reperfusion der Lungenstrombahn hilfreich sein.

## 7. Summary

Reactive oxygen species (ROS) play an important role in biological systems. While it is largely accepted that ROS mediated oxidative damage occurs under pathophysiological conditions, recent evidence suggests a role for ROS as signalling molecules in physiological processes. In the respiratory system, ROS are thought to be involved in the pathogenesis of the adult respiratory distress syndrome (ARDS), sepsis and ischemia-reperfusion, but may also play a role in the development of hypoxia-and non-hypoxia-induced pulmonary hypertension. In the context of regulatory processes of the lung, a growing body of evidence is emerging indicating that ROS may contribute to signalling events such as underlying hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV), an essential mechanism matching lung perfusion to ventilation in order to optimize pulmonary gas exchange. The question of whether ROS generation is decreased or paradoxically increased during alveolar hypoxia, and the sources from which ROS may be derived under these conditions, are controversial. In fact, evidence exists for both a decrease as well as increase in lung ROS generation during alveolar hypoxia. Both mitochondria and NADPH oxidases have been proposed as sources of ROS generation underlying HPV.

In this thesis a method combining electronspinresonance (ESR) spectroscopy with the spin trapping technique for measurement of superoxide release from isolated perfused and ventilated rabbit lungs was established. Superoxide was detected by the cyclic hydroxylamine 1-hydroxy-3-carboxy- 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine (CPH) which was recently introduced for quantitative ROS measurements in biological systems. ROS formation can be quantified by detection of the corresponding radical 3-carboxy-proxyl ( $CP^{\cdot}$ ) using ESR spectroscopy.

After having proven the feasibility of CPH for ROS detection in the isolated perfused and ventilated rabbit lungs, the autooxidation of CPH was characterized. Perfusing lungs with CPH over a range of different inspired oxygen concentrations revealed an oxygen-dependence of  $CP^{\cdot}$  formation rate, with a minimum at 2,5 %  $O_2$ . Addition of superoxide dismutase (SOD) to the buffer fluid illustrated that a portion of this intravascular ROS release was attributable to superoxide. Intravascular stimulation of the lungs by phorbolmyristateacetate (PMA) caused a rapid increase in  $CP^{\cdot}$  formation, concomitant with pulmonary vasoconstriction. Both the PMA-induced CPH oxidation and the vasoconstrictor response were completely suppressed by SOD.

When the PMA challenge was performed at different oxygen concentrations, maximum superoxide liberation and pulmonary vasoconstriction occurred at 5,0 % O<sub>2</sub>.

The PMA-induced vasoconstriction in the isolated lung experiments was inhibited by a NADPH-oxidase inhibitor

These data demonstrate that the PMA-induced vasoconstriction is caused by superoxide generated from NADPH oxidases and that superoxide release may paradoxical be increased in hypoxia. NADPH oxidases thus may contribute to the hypoxia-dependent regulation of pulmonary vascular tone. Further experiments should be focused on cellular and subcellular sources of the hypoxia-dependent ROS-generation. Furthermore the established method may be helpful to clarify the role of ROS-generation in ischemia/reperfusion in the pulmonary vasculature.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Cai H, Harrison DG: Endothelial dysfunction in cardiovascular disease: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000, 87: 840-844
2. Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Cheng Y, Kojda G, Harrison DG: Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J Clin Invest* 2000, 105: 1631-1639
3. Griending KK, Harrison DG: Dual role of reactive oxygen species in vascular growth. *Circ Res* 1999, 85: 562-563
4. Harrison DG: Cellular and molecular mechanism of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 1997, 100: 2153-2157
5. Münzel T, Harrison DG: Evidence for a role of oxygen-derived free radicals and protein kinase C in nitrate tolerance. *J Mol Med* 1997, 75: 891-900
6. Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J: Reaktive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem* 2001, 11: 173-186
7. Dhala NS, Temsah RM, Netticaden T: Role of oxidative Stress in cardiovascular disease. *J Hypertens* 2000, 18: 655-673
8. Harrison DG: Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest.* 1997, 100: 2153-2157
9. Midorikawa J, Maehara K, Yaoita H, Watanabe T, Ohtani H, Ushiroda S, Maryuama Y: Continuous observation of superoxide generation in an in situ ischemia-reperfusion rat lung model. *Jpn Circ J* 2001, 65: 207-212
10. Fisher PW, Huang YT, Kennedy TP, Piantadoni CA: P02 dependent hydroxyl radical production during ischemia-reperfusion lung injury. *Am j Physiol* 1993, 265: L279-L285
11. Mc Cord JM: Oxygen derived radicals in postischämische tissue injury. *N Engl J Med* 1985, 312: 159-163
12. Weisdeld ML: Reperfusion and reperfusion injury. *Clin Res* 1987, 35: 13-20
13. Deeb GM, Grumm CM, Lynch MJ, Guyunn TP, Gallagher KP, Ljungmann AG: Neutrophils are not necessary for induction of ischemia-reperfusion lung injury. *J Appl Physiol* 1990, 68: 374-281
14. Kennedy TP, Rao NV, Hopkins C, Pennington L, Toley E, Hoidal JR: Role of reactive oxygen species in reperfusion injury of the rabbit lung. *J Clin Invest* 1989, 83: 1326-1335
15. Hsu K, Wand D, Wu S, Shen C, Chen HI: Ischemia-reperfusion lung injury attenuated by ATP-MgCl<sub>2</sub> in rats. *J Appl physiol.* 1993, 76: 545-552
16. Adkins WK, Taylor AE: Role of xanthine oxidase and neutrophils in ischemia-reperfusion injury in rabbit lung. *J Appl Physiol* 1990, 69: 2012-2018

17. Lynch MJ, Grum CM, Gallager GP, Bolling SF, Deeb GM, Morganroth ML: Xantin oxidase inhibition ischemic–reperfusion lung injury. *J Surg Res* 1988, 538-544
18. Shah AM, Channon KM: Free radicals and redox signalling in cardiovascular disease. *Heart* 2004, 90: 486-487
19. Halliwell B, Gutteridge JMC: Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990, 186: 1-85
20. Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT: Mitochondrial reactive oxygen spezies trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95: 11715- 11720
21. Cadenas E: Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Commun* 1989, 58: 79-110
22. Fridovich I: Superoxide dismutases. *Adv Enzymol Relat Areas mol Biol* 1974, 41: 35-97
23. Tauber AI, Babior BM: O<sub>2</sub> and host defense the production and fate of O<sub>2</sub> in neutrophils. *Photochem Photobiol* 1978, 28(4-5): 701-9.
24. Britigan B, Roeder T, Buettner G: Spin traps inhibit formation of hydrogen peroxide via the dismutation of superoxide: implications for spin trapping the hydroxyl free radical. *Biochem Biophys Acta* 1991, 1075: 213-222
25. Britigan B, Rosen G, Thompson B, Chai Y, Cohen M: Stimulated human neutrophils limit iron-catalyzed hydroxyl radical formation as detected by spin trapping technique. *J Biol Chem* 1986, 261: 17026-17032
26. Burkitt M: ESR spin trapping studies into the nature of the oxidizing species formed in the Fenton reaction: Pitfalls associated with the use of 5,5-DMPO in the detection of the hydroxyl radical. *Free Radic Res.* 1993, 18: 43-57
27. Winterbourn CC: Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett* 1995, 82–83: 969-974
28. Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, Tracey WR, Pollock JS, Harrison DG, Marsden PA: Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc. Biol* 1997, 17: 2479-2488
29. Pou S, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1992, 267: 24173-24176
30. Shimowaka H, Flavahan NA, Vanhoutte PM. Loss of endothelial pertussis toxin sensitive G-Protein function in atherosclerotic porcine coronary arteries. *Circulation* 1991, 83: 652-660
31. Harrison DG. Endothelial function and oxidant stress. *Clin Cardiol* 1997, 20: 1-17
32. Mihm MJ, Coyle CM, Schanbacher BL, Weinstein DM, Bauer JA: Peroxynitrite induced nitration and inactivation of myofibrillar creatine kinase in experimental heart failure. *Cardiovasc Res* 2001, 49(9): 798-807

33. Bauer G: Reactive oxygen and nitrogen species: efficient, selective, and interactive signals during intercellular induction of apoptosis. *Anticancer Res* 2000, 20(60b): 4115-39
34. Weinstein DM, Mihm MJ, Bauer JA: Cardiac peroxynitrite formation and left ventricular dysfunction following doxorubicin treatment in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2000, 294(1): 396-401
35. Saleh D, Ernst P, Lim S, Barnes PJ, Giaid A: Increased formation of the potent oxidant peroxynitrite in the airways of asthmatic patients is associated with induction of nitric oxide synthase: effect of inhaled glucocorticoid. *FASEB J* 1998, 12(11): 929-37
36. Dusting GJ, Fennessy P, Yin ZL, Gurevich V: Nitric oxide in atherosclerosis: vascular protector or villain? *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 1998, 25: 34-41
37. Bosaller C, Habib GB, Yamamoto H, Williams C, Wells S, Henry PD: Impaired muscarinic endothelium-dependent relaxation and cyclic guanosine 5-monophosphate formation in atherosclerotic human coronary artery and rabbit aorta. *J Clin Invest* 1987, 79: 170-174
38. Forstermann U, Mügge A, Alheid U, Haverich A, Frolich JC: Selective attenuation of endothelium-mediated vasodilatation in atherosclerotic human coronary arteries. *Circ Res* 1988, 62: 185-190
39. Shimokawa H, Vanhoutte PM: Impaired endothelium-dependent relaxation to aggregating platelets and related vasoactive substances in porcine coronary arteries in hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Circ Res* 1989, 64: 900-914
40. Pryor WA, Aquadrito GL: The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide and superoxide. *Am J Physiol* 1995, 268: L699-L722
41. Weissmann N, Grimminger F, Olschewski A, Seeger W: Hypoxic pulmonary vasoconstriction: a multifactorial response? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001, 281: L314-317
42. Sylvester JT: Hypoxic pulmonary vasoconstriction: a radical view. *Circ Res* 2001, 88: 1228-1230
43. Archer SL, Huang J, Henry T, Peterson D, Weir EK: A redox-based O<sub>2</sub> sensor in rat pulmonary vasculature. *Circ Res* 1993, 73: 1100-1112
44. Archer SL, Nelson DP, Weir EK: Simultaneous measurement of O<sub>2</sub> radicals and pulmonary vascular reactivity in rat lung. *J Appl Physiol* 1989, 67: 1903-1911
45. Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, Schumacker PT: Reactive oxygen species generated at mitochondrial III stabilize hypoxia-inducible factor 1 alpha during hypoxia: a mechanism of O<sub>2</sub> sensing. *J Biol Chem* 2000, 275: 25130-25138
46. Chandel NS, Schumacker PT: Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. *Am J Physiol* 2000, 88: 1880-1889
47. Marshall C, Marmay AJ, Verhoeven AJ, Marshall BE: Pulmonary artery NADPH-oxidase is activated in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996, 15: 633-644
48. Waypa GB, Chandel NS, Schumacker PT: Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing. *Circ Res* 2001, 88: 1259-1266

49. Waypa GB, Schumacker PT: O<sub>2</sub> sensing in hypoxic pulmonary vasoconstriction: the mitochondrial door re- opens. *Respir Physiol Neurobiol* 2002, 132: 81-91
50. Weissmann N, Tadic A, Hanze J, Rose F, Winterhalder S, Nollen M, Schermuly RT, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F: Hypoxic vasoconstriction in intact lungs: a role for NADPH oxidase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ?. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000, 279: L683-690
51. Voelkel NF: Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am Rev Respir Dis* 1986, 133: 1186-1195
52. Von Euler US, G. Liljestrand: Observation on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta Physiol. Scand* 1946, 12: 301-320
53. Weissmann N, Nollen M, Gerigk B, Ghofrani HA, Schermuly RT, Günther A, Quanz K, Fink L, Hänze J, Rose F, Seeger W, Grimminger F: Downregulation of hypoxic vasoconstriction by chronic hypoxia in rabbits: effects of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002, 284: 931-938
54. Gregory B. Waypa, Navdeep S. Chandel and Paul T. Schumacher: Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing. *Circ Res* 2001, 88: 1259-1266
55. Weissmann N, Akkayagil E, Quanz K, Schermuly RT, Ghofrani HA, Fink L, Hänze J, Rose F, Seeger W, Grimminger F: Basic features of hypoxic pulmonary vasoconstriction in mice. *Res Physiology & Neurobiology* 2004, 139: 191-2002
56. Weismann N, Zeller S, Schäfer RU, Turowski C, Ay M, Quanz K, Ghofrani HA, Schermuly RT, Fink L, Seeger W, Grimminger F. Impact of Mitochondria and NADPH Oxidases on acute and sustained hypoxic pulmonary Vasoconstriction. *Resp Cell and Molec Biol* 2006, 34: 505-513
57. Weir EK, Barneo JL, Bucklerk J, Archer SL: Acute oxygen sensing Mechanisms. *N Engl J M* 2005, 353: 2042-55
58. Fishman AP: Hypoxia on the pulmonary circulation. How and where it acts. *Circ Res* 1976, 38: 221-231
59. Staub, NC: Site of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Chest* 1988, 88: 240-245
60. Bartels RE, Dejours P, Kellog H, Mead J: Glossary on respiration and gas exchange. *J Appl Physiol* 1997, 34: 549-558
61. Robertson PT, Hague DE, Aaronson PI, Ward JPT: Voltage-independent calcium entry in hypoxic pulmonary vasoconstriction of intrapulmonary arteries of the rat. *J Physiol* 2000, 525: 669-680
62. Bennie, R.E., C.S. Packer, D.R. Powell, N. Jin, R.A. Rhoades: Biphasic contractile response of pulmonary artery to hypoxia. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol* 1991, 261: L156-163
63. Domino, K.B., L. Chen, C.M. Alexander, J.J. Williams, C. Marshall, B.E. Marshall: Time course and responses of sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction in the dog. *Anaesthesiology* 1984, 60: 562-566
64. Weissmann, N., F. Grimminger, D. Walmrath and W. Seeger: Hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs. *Resp Physiol* 1995, 00: 159-169

65. Wellington K.I., R. Sanchez, J.B. Ravn, B. Larsen, O. Amtorp. Effect of prolonged alveolar hypoxia on pulmonary arterial pressure and segmental vascular resistance. *J Appl. Physiol* 1993; 194-1200
66. Woodmansey, P.A., F. Zhang, K.S. Channers, K.A. Morice: Effects of the calcium antagonist amlodipine on the two phases of hypoxic pulmonary vasoconstriction in rat large and small isolated pulmonary arteries. *J. Cardiovasc Pharmacol* 1995, 25: 324-329
67. Hillier SC, Graham JA, Hanger CC, Goodbye PS, Glen RW, Wagner WW: Hypoxic vasoconstriction in pulmonary arterioles and venules. *Appl Physiol* 1997, 82: 1084-1090
68. Weismann N, Summer N, Schermuly RT, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F: Oxygen sensors in hypoxic pulmonary Vasoconstriction. *Circ Res* 2006, 71(4): 620-9
69. Weissmann N, Grimminger F, Walmrath D, Seeger W: Hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbits lungs. *Respir Physiol* 1995, 100: 159-169
70. Seeger W., Walmrath D, Grimminger F, Rosseau S, Schütte H, Krämer H-J, Ermert L, Kiss L: Adult respiratory distress syndrome: model systems using isolated perfused rabbit lungs. *Methods Enzymol.* 233:549-548.
71. Fishman AP: Hypoxia on the pulmonary circulation. How and where it acts. *Circ Res* 1976, 38: 221-231
72. Hillier SC, Graham JA, Hanger CC, Wagner WW: Hypoxic vasoconstriction in pulmonary arterioles and venules. *J Appl Physiol* 1997, 82: 1084-1090
73. Moudgil R, Michelakis ED, Archer SL: Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Appl Physiol* 2005, 98: 390-403
74. Staub NC: Sites of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Chest* 1985, 88: 240-245
75. Wilson HL, Dipp M, Thomas JM, Lad C, Galione A, Evans AM: ADP-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydroxylase act as a redox sensor: a primary role for cADPR in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Biol Chem* 2001, 276: 11180-11188
76. Cornfield DN, Stevens T, McMurty IF, Abman, Rodman DM: Acute hypoxia increases cytosolic calcium in fetal pulmonary smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1993, 265: 3-56
77. Dipp M, Nye PC, Evans AM: Hypoxic release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of artery smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001, 281: L318-325
78. Jabr RI, Toland H, Gelband CH, Wang XX, Hume JR: Prominent role of intracellular  $Ca^{2+}$  release in hypoxic vasoconstriction of canine pulmonary artery. *Br. J. Pharmacol* 1997, 122: 21-30
79. Salvaterra CG, Goldman WF: Acute hypoxia increases cytosolic calcium in cultured pulmonary arterial myocytes. *Am J Physiol* 1993, 264: 323-328
80. Ward JPT, Snetkov VA, Aaronson PI: Calcium, mitochondria and oxygen sensing in the pulmonary circulation. *Cell calcium* 2004, 36: 209-220

81. Waypa GB, Marks JD, Mack MM, Boriboun C, Mungai PT, Schumacker PT: Mitochondrial reactive oxygen species trigger calcium increases during hypoxia in pulmonary arterial myocytes. *Cir Res* 2002, 91: 719-726
82. Kang TM, Park PK, Uhm D: Effects of hypoxia and mitochondrial inhibition on the capacitative calcium entry in rabbit pulmonary arterial smooth muscle cells. *Life Sciences*.2003, 72: 1467-1479
83. Archer SI, Souil E, Dhin-Xuan AT, Schremmer B, Mercies JG, Jaagoub AEI, Nguyen-Huu L, Reeve HL, Hampl V: Molecular identification of the role of voltage-gated K<sup>+</sup> channels, Kv1.5 and Kv2.1, on hypoxic pulmonary vasoconstriction and control of resting membrane potential in rat pulmonary artery myocytes. *Clin Invest* 1998, 101: 2319-2330
84. Post JM, Gelband CH, Hume JR: Ca<sup>2+</sup> inhibition of K<sup>+</sup> channels in canine pulmonary artery: novel mechanism for hypoxia-induced membrane depolarisation. *Circ Res* 1995, 77: 131-139
85. Post JM, Hume JR, Archer SL, Weir EK: Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol* 1992, 262: C882-890
86. Turner JL, Kozlowski RZ: Relationship between membrane potential, delayed rectifier K<sup>+</sup> currents and hypoxia in rat pulmonary arterial myocytes. *Exp Physiol* 1997, 82: 629-645
87. Lin Mj, Leung GPH, Zhang WM, Yang XR, Yip KP, Tse CM, Sham JSK: Chronic hypoxia-induced Upregulation of store-operated and receptor operated Ca<sup>2+</sup> Channels in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Circ Res* 2004, 95: 496
88. Aaranson PI, Robertson TP, Knock GA, Becker S, Lewis TH, Snetkow V, Ward JPT: Hypoxic pulmonary vasoconstriction: mechanisms and controversies. *J Physiol* 2006, 570: 53-58
- 89 Post JM, Hume JR, Archer SL, Weil EK: Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol* 1992, 262: C882-890
90. Robertson TP, Aaronson PI, Ward JP: Hypoxic vasoconstriction and intracellular Ca<sup>2+</sup> in pulmonary arteries: evidence for PKC-independent Ca<sup>2+</sup> sensitization. *Is J Physiology* 1995, 268: H301-H307
91. Wang Z, Jin N, Ganguli S, Swartz DR, Li L, Rhoades RA: Rho-Kinase activation is involved in hypoxia induced pulmonary vasoconstriction. *Am J Respir Cell Mol Biol*.2001, 25: 628-35
92. Waypa GB, Schuhmacker PT: Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox events in oxygen sensing. *J Appl Physiol* 2005, 98: 404-414
93. Waypa GB, Schumacker PT: O<sub>2</sub> sensing in hypoxic vasoconstriction: the mitochondrial door re-opens. *Resp. Physiol Neurobiol* 2002, 132: 81-91
94. Chandel NS, Schuhmacker PT: Cellular oxygen sensing by mitochondria: old question, new insight. *J Appl Physiol* 2000: 1880-1889
95. Sham JSK: Hypoxic pulmonary vasoconstriction: Ups and downs of reactive oxygen species: *Circ res* 2002, 91: 649-651

96. Chen Q, Vazques EJ, Moghaddas S, Hopper CL, Lesnefsyky EJ: Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 2003, 278: 36027-36031
97. Paddenberg R, Ishaq A, Goldenberger A, Faulhammer P, Rose F, Weismann N, Braun-Dullaues RC, Kummer W: Essential role of complex II of the respiratory chain in hypoxia induced ROS generation in the pulmonary vasculature. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003, 284: 710-719
98. Kang TM, Park MK, Uhm DY: Characterization of hypoxia-induced  $[Ca^{2+}]$  rise in rabbit pulmonary artery smooth muscle cell. *Life Science* 2002, 70: 2321-2333
- 99 Roux E, Marhl M: Role of sarcoplasmic reticulum and mitochondria in  $Ca^{2+}$  removal on airway myocytes. *Biophys J*.2004, 86: 2583-2595
100. Szibor M, Richter C, Ghafourifar P: Redox control of mitochondrial functions. *Antioxid Redox Signal*.2001, 3: 515-523
101. Ward JPT, Snetkow VA, Aaronson PI: Calcium, mitochondria and oxygen sensing in the pulmonary circulation. *Cell calcium* 2004, 36: 209-220
102. Weismann N, Schermuly RT, Ghofrani HA, Hänze J, Goyal P, Grimminger F, Seeger W: Hypoxic pulmonary vasoconstriction: triggered by an increase in reactive oxygen species. *Novartis Found Symp* 2006, 272: 196-208
103. Munzel T, Afanas IB, Kleschyov AL, Harrison DG: Detection of superoxide in vascular tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002, 22: 1761-1768
104. Zou L, Clanton TL: Detection of reactive oxygen and nitrogen species in tissues using redox-sensitive Fluorescent probes. *Methods Enzymol* 2002, 352: 307-325
105. Janiszewski M, Souza HP, Liu X, Pedro MA, Zweier JL, Laurindo FR: Overestimation of NAPH driven vascular oxidase activity due to lucegenin artifacts. *Free Radic Biol Med* 2002, 23(5): 446-53
106. Tarpey MM, White CR, Suarez E, Richardson G, Radi R, Freeman BA: Chemiluminescens detection of oxidants in vascular tissue Lucegenin but not coelenterazine enhances superoxide formation. *Circ Res* 1999, 84(10): 1203-11
107. Daiber A, Oelze M, August M, Wendt M, Sydow K, Wieboldt H, Kleschyov AL, Munzel T: Detection of superoxide and peroxynitrite in model systems and mitochondria by the luminol analogue L-012. *Free Radic* 2004, 38(3): 259-69
108. Archer SL, Nelson DP, Weir EK: Detection of activated  $O_2$  species in vitro and in rat lungs by chemiluminescence: *J Appl Physiol* 1989, 67: 1912-1921
109. Moore, W.J. bearb. U. erw. von Hummel, D.O. unter Mitw. von Trafara, G. und Holland-Moritz, K.: *Physikalische Chemie De Gryter- Verlag, Berlin, New York, 1983, 3. Auflage*
110. Weil, J.A., Bolton, J.R., Wertz, J.E.: *Electron paramagnetic resonance: elementary theory and practical applications, JOHN WILEY & SONS, INC., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, 1994, 1.Auflage*

111. Thornalley PJ: Theory and Biological Applications of the Electron Spin Resonance Technique of Spin Trapping. *Life Chemistry Reports* 1986, 4: 57-112
112. Knowles P, Marsh D, Rattle H: Magnetic resonance. In: *Magnetic resonance of biomolecules*, Verlag J. Wiley & Sons, pp. New York 1976, 189-220
113. Pou S, Cohen M, Britigan B, Rosen G: Spin-trapping and human neutrophils. *J Biol Chem* 1989, 264: 12299-12302
114. Pou S, Peric M, Halpern H, Rosen G: Use of a low-frequency ESP spectrometer: implications for spin-trapping free radicals, in situ. *Free Radic Res* 1991; 12; 39-46
115. Rosen GM, Cohen MS, Britigan BE, Pou S: Applications of spin traps to biological systems. *Free Radic Comms* 1990, 9: 187-195
116. Rosen GM, Pou S, Britigan BE, Cohen MS: Spin trapping of hydroxyl radicals in biological systems. *Methods Enzymol* 1994, 233: 105-111
117. Haken, H., Wolf, H.Ch.: *Atom- und Quantenphysik: Einführung in die experimentellen und theoretischen Grundlagen* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 6. Auflage, 1996
118. Mayer-Kuckuk, T.: *Atomphysik*, Teubner-Verlag, Stuttgart, 1977, 1. Auflage
119. Bartholome, E., Biekert, E., Hellmann, G., Ley, H., Weigert, W.M., Weise, E.: *Ullmanns Enzyklopädie der technischen Chemie*, Band 5, Verlag Chemie, Weinheim, 1980, 4. Auflage
120. Tipler, P.A.: *Physik*, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1994, 1. Auflage
121. Hoppe, W., Lohmann, W., Markl, H., Ziegler, H.: *Biophysik* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1982, 2. Auflage
122. Tarpey MM, Wink DA, Grisham MB: Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004, 286(3): R431-44
123. Buettner G: The spin trapping of superoxide and hydroxyl free radicals with DMPO: more about iron. *Free Radic Res* 1993, 19: 79-87
124. Buettner G, Mason R: Spin trapping for detecting superoxide and hydroxyl free radicals in vitro and in vivo. *Methods Enzymol* 1990, 186: 127-133
125. Pou S, Rosen G: Spin-trapping of superoxide by 5, 5-DMPO: Applications to isolated perfused organs. *Anal Biochem* 1990, 190: 321-325
126. Rosen GM, Finkelstein E, Rauckman EJ: A method for the detection of superoxide in biological systems. *Arch Biochem Biophys* 1982, 215: 367-378.
127. Evans CA: Spin Trapping. *Aldrichimica Acta* 1979, 12 (2): 23-30
128. Brubacher JL, Bols NC: Chemically de-acetylated 2, 7 dichlorodihydrofluorescein diacetate as a probe of respiratory burst activity in mononuclear phagocytes. *J Immunol Methods* 2001, 251: 81-91

129. Dikalov S, Grigor'ev IA, Voinov M, Bassenge E: 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* 1998, 248: 211-215
130. Turrens JF: Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci.Rep* 1997, 17: 3-8
131. De Keulenaer GW, Alexander RW, Ushio-Fukai M, Ishizika N, Griendling KK: Tumor necrosis factor alpha activates a p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle. *Biochem J* 1998, 329: 653-657,
132. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW: Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994, 74: 1141-1148
133. Holland JA, Meyer JW, Chang MM, O'Donnell RW, Johnson DK, Ziegler LM: Thrombin stimulated reactive oxygen species production in cultured human endothelial cells. *Endothelium* 1998, 6: 113-121
134. Dang PM, Babior BM, Smith RM: NADPH dehydrogenase activity of p67PHOX, a cytosolic subunit of the leukocyte NADPH oxidase. *Biochemistry* 1999, 38(18): 5746-53
135. Dupont GP, Huecksteadt TP, Marshall BC, Ryan US. Regulation of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity and gene expression in cultured rat pulmonary endothelial cells. *J Clin Invest* 1992, 89: 197-202
136. Segal AW, Jones OT: Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes. *Nature* 1978, 276: 515-517
137. Quinn MT, Mullen ML, Jesaitis AJ: Human neutrophil cytochrome b contains multiple hemes. Evidence for heme associated with both subunits. *J Biol Chem* 1992, 267: 7303-7309
138. Rotrosen D, Yeung CL, Leto TL, Malech HL, Kwong CH: Cytochrome b558: the ferrous-binding component of the phagocyte NADPH oxidase. *Science* 1992, 256: 1459-1462
139. Segal AW, West I, Wientjes F, Nugent JH, Chavan AJ, Haley B, Garcia RC, Rosen H, Scrase G: Cytochrome b 245 is a flavocytochrome containing FAD and the NADPH-binding side of the microbicidal oxidase of phagocytes. *Biochem J* 1992, 284: 781-788
140. Clark RA, Malech HL, Gallin JI, Nuno H, Volp BD, Pearson DW, Nauseef WM, Curnutte JT: Genetic variants of chronic granulomatous disease: prevalence of deficiencies of two cytosolic components of the NADPH oxidase system. *N Engl J Med*, 1989: 647-52
141. Clark RA, Volp BD, Ledal KG, Nauseef WM: Two cytosolic components of the human neutrophil respiratory burst oxidase translocate to the plasma membrane during cell activation: *J Clin Invest* 1990, 85: 714-721
142. Meyer JW, Holland JA, Ziegler LM, Chang MM, Beebe G, Schmitt ME: Identification of a functional leukocyte-type NADPH oxidase in human endothelial cells: a potential atherogenic source of reactive oxygen species. *Endothelium* 1999, 7: 11-22

143. Pagano PJ, Ito Y, Tornheim K, Gallop PM, Tauber AI, Cohen RA: An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta. *Am J Physiol* 1995, 268: H2274-H2280
144. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M: NADPH-oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ res* 2000, 86: 494-501
145. Marshall C, Mamory AJ, Verhoeven AJ, Marshall BE: Pulmonary artery NADPH-oxidase is activated in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Resp Cell Moll Biol* 1996, 15(5): 633-44
146. Mittal M, Roth M, König P, Hofmanns S, Dong E, Goyal P, Selbitz AC, Schermuly RT, Ghofrani HA, Kwapiszewsko G, Kummer W, Klepetko W, Hoda MA, Fink L, Hänze J, Seeger W, Grimminger F, Schmidt AH, Weissmann N: Hypoxia dependent Regulation of nonphagocytic NADPH Oxidase subunit NOX4 in the pulmonary vasculature. *Circ res* 2007, 101(3): 258-67
147. Hancock JT, Jones OTG: The inhibition by diphenyleneidonium and its analogues of superoxide generation by macrophages. *Biochem J* 1987, 242: 103-107
148. Jones OTG, Donnel VB, Wood JD, Broughton JP, Hughes EJ, Jones OTG: Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am J Physiol* 1996, 271: H1626-H1634
149. Jones SA, Wood JD, Coffey MJ, Jones OTG: The functional expression of p47-phox and p67-phox may contribute to the generation of superoxide by an NADP oxidase-like system in human fibroblasts. *FEBS Lett* 1994, 355: 178-182
150. Mohazzab-H KM, Wolin MS: Sites of superoxide anion production detected by lucigenin in calf pulmonary artery smooth muscle. *Am J Physiol* 1994, 267:L815-L822
151. Harrison R: Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?. *Free Radic Biol Med* 2002, 33(6): 774-99
152. Slepneva IA, Glupov VV, Sergeeva SV, Khramtsov VV: EPR detection of reactive oxygen species in hemolymph of *Galleria mellonella* and *Dendrolimus superans sibiricus* (Lepidoptera) larvae. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 264: 212-215
153. Dikalov S, Skatchkov M, Bassenge E: Spin trapping of superoxide radicals and peroxynitrite by 1-hydroxy-3-carboxy-pyrrolidine and 1-hydroxy-2,2,6, 6-tetramethyl-4-oxo-piperidine and the stability of corresponding nitroxyl radicals towards biological reductants. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, 231: 701-704.
154. Weismann N, Winterhalder S, Nollen M, Voswinckel R, Quanz K, Ghofrani HA, Schermuly RT, Seeger W, Grimminger F: NO and reactive oxygen species are involved in biphasic hypoxic vasoconstriction of isolated rabbit lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001, 280: L638-645
155. Magnettech GmbH: MS 100: Bedienungsanleitung Magnettech GmbH, Berlin
156. Magnettech GmbH: Detection, identification and quantification of the radicals in biological systems and fluids by electron spin resonance spectroscopy, Berlin-Adlershof
157. Atkins PW: *Physikalische Chemie*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1987, 1.Auflage

158. Magnettech GmbH: Bedienungshinweise für das Miniscope MS100 Magnettech GmbH, Berlin
159. Magnettech GmbH: ANALYSIS: Instruction Manual Magnettech GmbH, Berlin
160. Ohya-Nishiguchi, H., Packer, L.: Bioradicals detected by ESR spectroscopy  
Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 1995, 1. Auflage
161. Dikalov S, Skatchkov M, Bassenge E: Quantification of peroxynitrite, superoxide, and peroxy radicals by a new spin trap hydroxylamine l-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-oxo-piperidine. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, 230: 54-57.
162. Dikalov S, Skatchkov M, Fink B, Bassenge E: Quantification of superoxide radicals and peroxynitrite in vascular cells using oxidation of sterically hindered hydroxylamines and electron spin resonance. *Nitric Oxide* 1997, 1: 423-431
163. Zhang H, Slutsky AS, Vincent JL: Oxygen free radicals in ARDS, septic shock and organ dysfunction. *Intensive Care Med* 2000, 26: 474-476
164. Sanders SP, Bassett DJ, Harrison SJ, Pearse D, Zweier JL, Becker PM: Measurements of free radicals in isolated, ischemic lungs and lung mitochondria. *Lung* 2000, 178: 105-118
165. Katz SA, Venkatachalam M, Crouch RK, Heffner JE, Halushka PV, Wisw WC, Cook JA: Catalase pre-treatment attenuates oleic acid-induced edema in isolated rabbit lung. *J Appl Physiol* 1988, 65: 1301-1306
166. Diakaolv SI, Wei L, Mehranpour P, Wang SS, Zofari AM: Production of extracellular Superoxide by human Lymphoblast cell lines: Comparison of Electron Spin Resonance Techniques and Cytochrome C Reduction Assay. *Biochem Pharmacol.* 2007: 1-19
167. Kadiiska MB, Burkitt MJ, Xiang QH, Mason RP: Iron supplementation generates hydroxyl radical in vivo. An ESR spin-trapping investigation. *J. Clin. Invest* 1995, 96: 1653-1657
168. Mason RP, Knecht KT: in vivo detection of radical adducts by electron spin resonance. *Methods Enzymol* 1994, 233: 112-117
169. Dikalov S, Fink B, Skatchkov M, Bassenge E: Comparison of Glyceryl Trinitrate-induced with Pentaerythrityl Tetranitrate-induced in vivo Formation of Superoxide radicals: Effect of Vitamin C. *Free Radical Biology & Medicine* 1999, 27: 170-176
170. Navarro JA, Granadillo VA, Rodriguez-Iturbe B, Garcia R, Salgado O, Romero RA: Removal of trace metals by continuous ambulatory peritoneal dialysis after desferoxamine chelation therapy. *Clin Nephrol* 1991, 35: 213-217
171. Misra HP: Reaction of copper-zinc superoxide dismutase with diethyldithiocarbamate. *J Biol Chem* 1979, 254: 11623-11628
172. Samuni A, Goldstein S, Russo A, Mitchell JB, Krishna MC, Neta P: Kinetics and mechanism of hydroxyl radical and OH-adduct radical reactions with nitroxides and with their hydroxylamines. *J Am Chem Soc* 2002, 124: 8719-8724

173. Ishikawa M: Oxygen radicals-superoxide dismutase system and reproduction medicine. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 1993, 45: 842-848
174. Vig E, Gabrielak T, Leyko W, Nemcsok J, Matkovics B: Purification and characterization of Cu, Zn-superoxide dismutase from common carp liver. *Comp Biochem Physiol B* 1989, 94: 395-397
175. Paky A, Michael JR, Burke-Wolin TM, Wolin MS, Gurtner GH: Endogenous production of superoxide by rabbit lungs: effects of hypoxia or metabolic inhibitors. *J Appl Physiol* 1993, 74: 2868-2874
176. Savineau JP, Marthan R: Modulation of the calcium sensitivity of the smooth muscle contractile apparatus: molecular mechanisms, pharmacological and pathophysiological implications. *Fundam Clin Pharmacol* 1997, 11: 289-299
177. Zhang AY, Yi F, Tegatz EG, Zou AP, Li PL: Enhanced production and action of cyclic ADP-ribose during oxidative stress in small bovine coronary arterial smooth muscle. *Microvasc Res* 2004, 67: 159-67
178. Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S: Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986, 320: 454-456
179. Bailey SR, Mitra S, Flavahan S, Flavahan NA: Reactive oxygen species from smooth muscle mitochondria initiate cold-induced constriction of cutaneous arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005, 289(1): H243-50
180. Archer SL, Reeve HL, Michelakis E, Puttagunta L, Waite R, Nelson DP, Dinauer MC, Weir EK: O<sub>2</sub> sensing is preserved in mice lacking the gp91 phox subunit of NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96(14): 7944-79
181. Rueckschloss U, Quinn MT, Holtz J, Morawietz H: Dose-dependent regulation of NADPH oxidase expression by angiotensin II in human endothelial cells: protective effect of angiotensin II type 1 receptor blockade in patients with coronary disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002, 22: 1845-1851
182. Voelkel NF, Allard JD, Anderson SM, Burke TJ: cGMP and cAMP cause pulmonary vasoconstriction in the presence of hemolysate. *J Appl Physiol* 1999, 86(5): 1715-1720
183. Schafer M, Schafer C, Ewald N, Piper HM, Noll T: Role of redox signaling in the autonomous proliferative response of endothelial cells to hypoxia. *Circ Res* 2003, 92(9): 1010-1015

## 9. Publikationsverzeichnis

Weissmann N, Kuzkaya N, Fuchs B, Tiyerili V, Schäfer RU, Schütte H, Ghofrani HA, Schermuly RT, Schudt C, Sydykov A, Egemnazarow B, Seeger W, Grimminger F: Detection of reactive oxygen species in isolated, perfused lungs by electron spin resonance spectroscopy. *Respiratory Research* 2005, 86 (6)

## 10. Danksagung

Ich möchte meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. Norbert Weißmann für das entgegengebrachte Vertrauen und die Möglichkeiten danken, die mir seine Forschungsgruppe für wissenschaftliche Tätigkeit eröffnet hat. Seine fachliche und insbesondere menschliche Kompetenz sind mir ein Vorbild.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. med. Hartwig Schütte, Frau Dr. hum. biol. Beate Fuchs und Frau Dr. med. Nermin Kuzkaya, deren wissenschaftliche und technische Unterstützung mir vom besonderen Wert waren.

Besonders danke ich Karin Quanz für ihre Hilfsbereitschaft und kompetente Unterstützung während meiner Zeit im Labor.

Ganz besonders danke ich Frau Dr. med. Christiane Inholte für die sprachliche Unterstützung bei der Verfassung der Doktorarbeit.

Allen Kollegen und Kommilitonen, die mich während dieser Zeit in vielfältiger Weise unterstützt haben, danke ich ebenso auf diesem Wege.

Meinen lieben Eltern danke ich sehr für ihre Unterstützung, ohne die ein erfolgreiches Studium und vor allem die vorliegende Arbeit sehr viel schwieriger zu realisieren gewesen wäre.

# 11. Lebenslauf

Name	Vedat Tiyerili	
Geburtsdatum	21. Juli 1977	
Geburtsort	Duisburg	
Eltern	Haci Mehmet Tiyerili Atiye Tiyerili, geb. Yilmaz	
Schule	1983-1987	Grundschule Hebbelstrasse, Duisburg
	1987-1989	Hauptschule Geneisenaustrasse, Duisburg
	1989-1993	Realschule Duisburg-Süd
	1993-1997	Mercator Gymnasium, Duisburg
	Juni 1997	Abitur in Duisburg
Studium	WS 1997/98-SS 98	Studium der Diplom-Biologie in Marburg
	WS 1998/99	Studium der Biologie (Lehramt) in Essen
	SS 1999-2005	Studium der Humanmedizin in Giessen
Beruf	seit Januar 2006	Assistenzarzt an der Universitätsklinik Bonn Klinik für Kardiologie und Pneumologie