

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
komm. Direktor: Professor Dr. med. A. Baethmann

**Pathogenetische Bedeutung der induzierbaren  
Stickstoffmonoxid-Synthase  
für den akuten hyperoxischen Lungenschaden**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von  
Anne-Karin Hesse, geb. Kreutz  
aus Haselünne

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. vet. F. Krombach
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. J. Behr PD Dr. med. habil. B. Heindl
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. rer. nat. M. Kiefmann
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	08.07.2004

*Alles Wissen  
geht aus einem Zweifel hervor und  
endigt in einem Glauben.*

(Marie von Ebner-Eschenbach)

Meiner lieben Familie

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>10</b>
1.1	Hyperoxischer Lungenschaden	10
1.2	Molekulare Mechanismen der Sauerstofftoxizität	12
1.3	Stickstoffmonoxid	15
1.4	Induzierbare NO-Synthase und Zytokine	17
1.5	Transkriptionsfaktoren	22
1.6	Fragestellung	25
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>26</b>
2.1	Versuchsbeschreibung	26
2.1.1	Versuchstiere	26
2.1.2	Versuchsaufbau	26
2.1.3	Versuchsprotokoll	27
2.2	Bronchoalveoläre Lavage	29
2.2.1	Zelldifferenzierung	29
2.2.2	Bestimmung der Zellvitalität	30
2.2.3	Bestimmung der Gesamtprotein-Konzentration	30
2.2.4	Bestimmung der NO-Produktion	30
2.2.5	Bestimmung der Laktatdehydrogenase-Aktivität	31
2.2.6	Bestimmung der TBARS in der BALF	31
2.2.7	Bestimmung der TNF- $\alpha$ -Konzentration	32
2.3	Entnahme von Lungengewebe	33
2.3.1	Bestimmung des Verhältnisses von Lungenfeucht- zu Lungentrockengewicht	33
2.3.2	Bestimmung der Myeloperoxidase-Aktivität	33
2.3.3	Bestimmung der TBARS im Lungengewebe	34
2.3.4	Histologie	34

2.3.5	Nachweis der Aktivität der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1	35
2.3.5.1	Extraktion des nukleären Proteins	35
2.3.5.2	Electrophoretic Mobility Shift Assay	36
2.3.6	Nachweis der iNOS- und TNF- $\alpha$ -mRNA	37
2.3.6.1	RNA-Isolierung	37
2.3.6.2	cDNA-Synthese	37
2.3.6.3	PCR	38
2.3.6.4	Detektion der PCR-Produkte	38
2.3.7	Nachweis des iNOS-Proteins	40
2.3.8	Nachweis von Nitrotyrosin	40
2.3.9	Densitometrische Auswertung	41
2.3.10	Statistik	41
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>42</b>
3.1	Körpergewicht und Allgemeinzustand der Mäuse	42
3.2	BALF-Parameter	44
3.3	Vitalität der Zellen	44
3.4	Gesamtzellzahl	46
3.5	Zelldifferenzierung	48
3.6	Gesamtprotein-Konzentration	50
3.7	Laktatdehydrogenase-Aktivität	52
3.8	TNF- $\alpha$ -Konzentration	54
3.9	Konzentration der TBARS	56
3.9.1	BALF	56
3.9.2	Lungengewebe	58
3.10	Verhältnis von Lungenfeucht- zu Lungentrockengewicht	60
3.11	Myeloperoxidase-Aktivität	62
3.12	Histologie	64
3.13	Aktivierung der Transkriptionsfaktoren	66
3.13.1	NF- $\kappa$ B	66
3.13.2	AP-1	67

3.14	iNOS- und TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression	68
3.14.1	Haushaltsgen $\beta$ -Aktin	68
3.14.2	iNOS-mRNA-Expression	69
3.14.3	TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression	71
3.15	Nachweis des iNOS-Proteins	74
3.16	NO-Konzentration in der BALF	75
3.17	Nachweis von Nitrotyrosin	75
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>77</b>
4.1	Einleitung	77
4.2	Modell der iNOS-defizienten Maus	79
4.3	Versuchsaufbau und -durchführung	82
4.4	iNOS-Induktion und NO-Produktion	83
4.5	Hyperoxie-induzierte Lungenschädigung	87
4.6	Schlussfolgerung	94
4.7	Ausblick	95
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>98</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>101</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung</b>	<b>122</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>124</b>

# Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-ethylcarbozol
AM	Alveolarmakrophage
AP-1	Aktivatorprotein -1
APS	Ammoniumpersulfat
ARDS	Adult Respiratory Distress Syndrome
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BALF	bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CaM	Calmodulin
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
cNOS	konstitutive Stickstoffmonoxid-Synthase
DTT	Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
Eos	Eosinophile Granulozyten
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinadeninmononukleotid
Gpx	Glutathion-Peroxidase
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HO-1	Hämoxygenase-1

HTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IgG	Immunglobulin G
I $\kappa$ B	Inhibitor-kappa B
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 beta
IL-8, 10, 13	Interleukin-8, -10, -13
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
Kat	Katalase
kDA	Kilodalton
KG	Körpergewicht
KO	Knockout-Mäuse
L-Arg	L-Arginin
LDH	Lactat-Dehydrogenase
L-NAME	N <sup>G</sup> -nitro-L-argininmethylester
LPS	Lipopolysaccharid
Ly	Lymphozyten
MDA	Malondialdehyd
Met-Hb	Methämoglobin
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NAC	N-Acetyl-L-cystein
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
NF- $\kappa$ B	Nuklear-Faktor-kappa B
NIL	N <sup>6</sup> -Iminoethyl-1-lysin
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphate-buffered salt solution, phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDTC	Pyrrolidin-1-dithiocarbamat
PMN	neutrophile Granulozyten

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
Seg	Segmentkernige Granulozyten
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SOD	Superoxiddismutase
TBARS	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
WT	Wildtyp-Mäuse

# 1 Einleitung

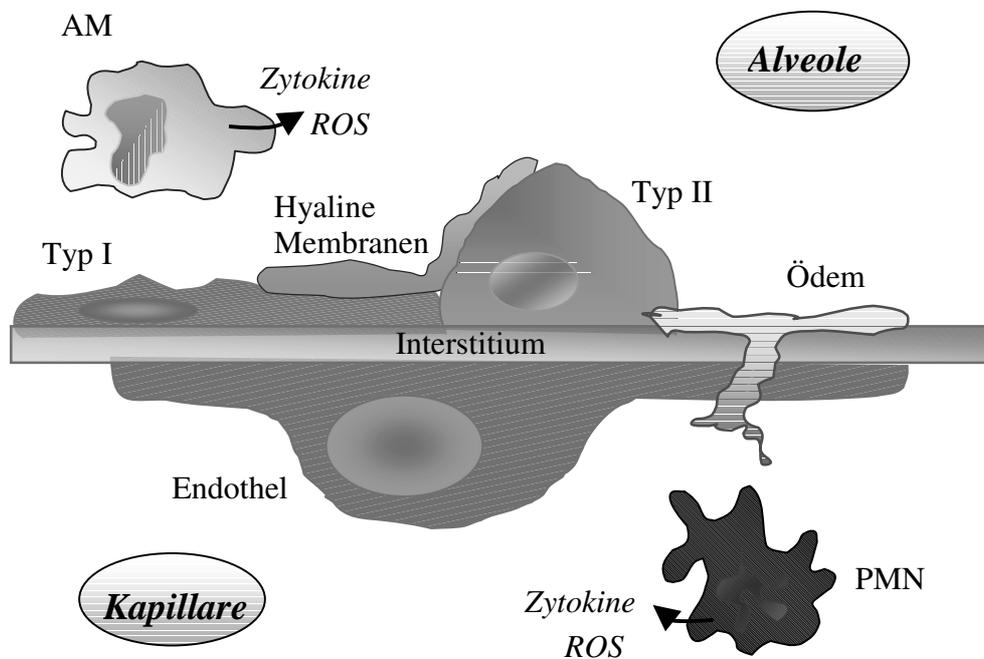
## 1.1 Hyperoxischer Lungenschaden

Die Beatmung mit erhöhten Sauerstoffkonzentrationen ist ein wesentlicher Bestandteil der Therapie respiratorisch insuffizienter Patienten. Diese therapeutische Maßnahme kann jedoch vor allem bei längerer Anwendung zu einem sogenannten hyperoxischen Lungenschaden führen. Hierbei entwickelt sich eine unspezifische Entzündungsreaktion in der Lunge.

Das Molekül Sauerstoff ( $O_2$ ) wurde 1772 von Karl Wilhelm Scheele und unabhängig davon im Jahre 1774 von Joseph Priestley entdeckt. Bereits damals vermutete Priestley, dass reiner Sauerstoff als Atemluft schädigende Effekte auf den gesunden Organismus zur Folge haben müsste: „... *for, as a candle burns out much faster in dephlogisticated than in common air, so we might, as may be said, live out too fast, and the animal powers to be too soon exhausted in this pure kind of air.*“ (Priestley, 1775). Kurze Zeit später konnte Antoine Laurent Lavoisier zeigen, dass Meerschweinchen, die reinen Sauerstoff atmeten, im Lungenödem starben (Lavoisier, 1785). Im Jahre 1899 beschrieb Lorrain-Smith erstmals die strukturellen Veränderungen des Lungengewebes unter erhöhten Sauerstoffkonzentrationen, die, bestehend aus Ödem, Atelektasen und einer Entzündungsreaktion, daher anfangs auch Lorrain-Smith-Effekt genannt wurden (Lorrain-Smith, 1899). Inzwischen weiß man, dass in Abhängigkeit von der Zeit und dem Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) eine Hyperoxie ( $F_i O_2 > 50$ ) beim Menschen zunächst zu einer Tracheobronchitis und nachfolgend zu einem akuten und chronischen hyperoxischen Lungenschaden führen kann (Griffith *et al.*, 1992).

Die Kennzeichen des akuten hyperoxischen Lungenschadens (Abb. 1.1) sind eine Rekrutierung und Aktivierung von Granulozyten (PMN) und Alveolarmakrophagen (AM), die neben proinflammatorischen Zytokinen, Leukotrienen und Proteasen auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) freisetzen. Es kommt zu einer Schädigung des Kapillarendothels und der Pneumozyten mit Ausbildung einer mikrovaskulären Permeabilitätsstörung. Dies führt zu einem vermehrten Flüssigkeitseinstrom und dadurch zu einem interstitiellen und alveolären Ödem, sowie zu hämorrhagischen Veränderungen (Capellier *et al.*, 1999; Klein, 1990). Durch Organisation dieser

proteinreichen Flüssigkeit bilden sich hyaline Membranen. Die Folge ist ein gestörter Gasaustausch, verbunden mit einer Surfactant-Dysfunktion und -Inaktivierung (Bailey *et al.*, 2002). Im Finalstadium der oxidativen Schädigung findet man im Kapillarlumen lysierte Erythrozyten und zahlreiche anhaftende Thrombozyten (Drath *et al.*, 1981). Bei einem chronischen Lungenschaden kommt es darüber hinaus zu einer Proliferation von Pneumozyten und Fibroblasten mit vermehrter Kollagenbildung, zu emphysemartigen Veränderungen und schließlich zur Fibrose des Lungengewebes (Sinkin *et al.*, 1992; Waheed *et al.*, 2002).



**Abb. 1.1:** Akuter hyperoxischer Lungenschaden: schematische Darstellung des alveolokapillären Übergangs. Während der Aktivierung von Granulozyten (PMN) und Alveolarmakrophagen (AM) kommt es zur Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Die Folge ist eine mikrovaskuläre Permeabilitätsstörung mit Ödembildung. Durch Organisation der proteinreichen Flüssigkeit bilden sich hyaline Membranen.

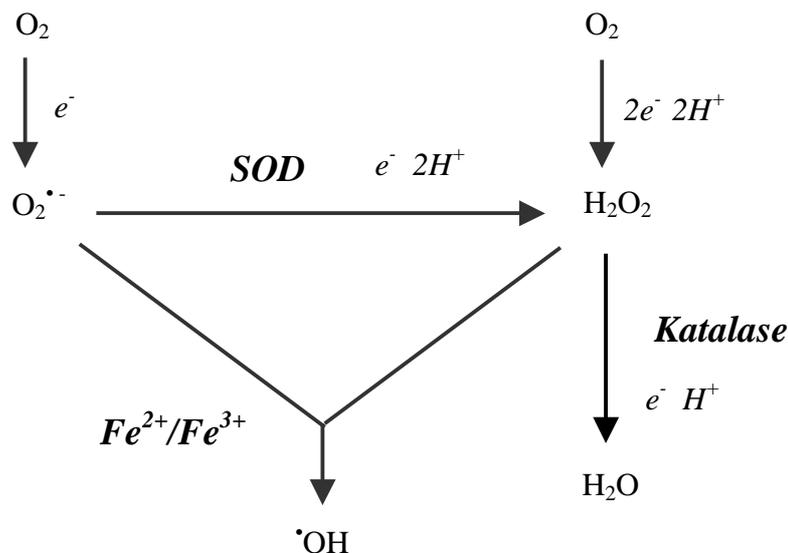
Der Pathomechanismus des hyperoxischen Lungenschadens ist bis heute noch nicht eindeutig geklärt, auch wenn sich bereits viele Studien mit der Sauerstofftoxizität beschäftigt haben. Es stellt sich die Frage, ob Sauerstoff in höheren Konzentrationen selbst toxisch ist oder ob reaktive Sauerstoffspezies zu den erkennbaren Schäden führen. Seit 1970 haben viele Arbeitsgruppen gezeigt, dass reaktive Sauerstoffspezies auf molekularer Ebene für die Sauerstofftoxizität verantwortlich sind. In der Literatur wird häufig von der „Theorie der freien Radikale“ gesprochen (Freeman und Crapo, 1982).

## 1.2 Molekulare Mechanismen der Sauerstofftoxizität

Die „Sauerstoffproblematik“ beruht im Wesentlichen darauf, dass Sauerstoff als ein für alle Aerobier lebensnotwendiges Element in seiner atmosphärischen Form nur sehr wenig reaktiv ist. Um mit anderen Biomolekülen reagieren zu können, muss er deshalb erst aktiviert werden. Bei dieser Aktivierung entstehen jedoch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die eben nicht nur in der gewünschten Form reaktiv sind, sondern darüber hinaus auch aggressiv und sogar toxisch wirken.

Eine wesentliche Quelle von Sauerstoffradikalen sind die Ein-Elektronenreduktionen. So können z.B. in der Atmungskette durch die Cytochromoxidasen, durch die membrangebundene NADPH-Oxidase der Granulozyten, oder durch die Xanthin-Oxidase Superoxidanionen ( $O_2^{\bullet-}$ ) gebildet werden. Diese Radikale werden durch das Enzym Superoxiddismutase (SOD) zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) reduziert (Chabot *et al.*, 1998; Crapo und Tierney, 1974). Verschiedene Oxidasen sind dafür bekannt, dass sie in erster Linie eine Zwei-Elektronenübertragung auf Sauerstoff zum Wasserstoffperoxid katalysieren. Als Beispiele für diesen Typ der Sauerstoffaktivierung können Aminosäureoxidasen oder auch Glukoseoxidasen genannt werden. Die permanente Wasserstoffperoxid-Entgiftung ist eine Grundlage des aeroben Metabolismus. Eine Möglichkeit, Wasserstoffperoxid effektiv zu eliminieren, bietet das Enzym Katalase. Daneben sind auch einige Peroxidasen in der Lage, Wasserstoffperoxid aus biologischen Gleichgewichten zu entfernen. Bei der metallkatalysierten Reaktion ( $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ ) von Superoxidradikalen und Wasserstoffperoxid entstehen die besonders reaktiven und

toxisch wirkenden Hydroxylradikale ( $\cdot\text{OH}$ ). Der biologische Nutzen des Sauerstoffs ist also eine Gratwanderung zwischen der Notwendigkeit der Sauerstoffaktivierung und der potentiellen Toxizität des aktivierten Sauerstoffs (Chabot *et al.*, 1998; Stogner und Payne, 1992; Abb. 1.2).



**Abb. 1.2:** Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies: Durch so genannte Ein-Elektronenreduktionen entstehen aus Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ) Superoxidanionen ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), die über die Superoxiddismutase (SOD) zu Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) reduziert werden. Wasserstoffperoxid kann auch in einer Zwei-Elektronenreduktion direkt aus Sauerstoff entstehen. Die Elimination von Wasserstoffperoxid erfolgt über das Enzym Katalase. Bei der metallkatalysierten Reaktion ( $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ) von Superoxidradikalen und Wasserstoffperoxid entstehen die besonders reaktiven Hydroxylradikale ( $\cdot\text{OH}$ ).

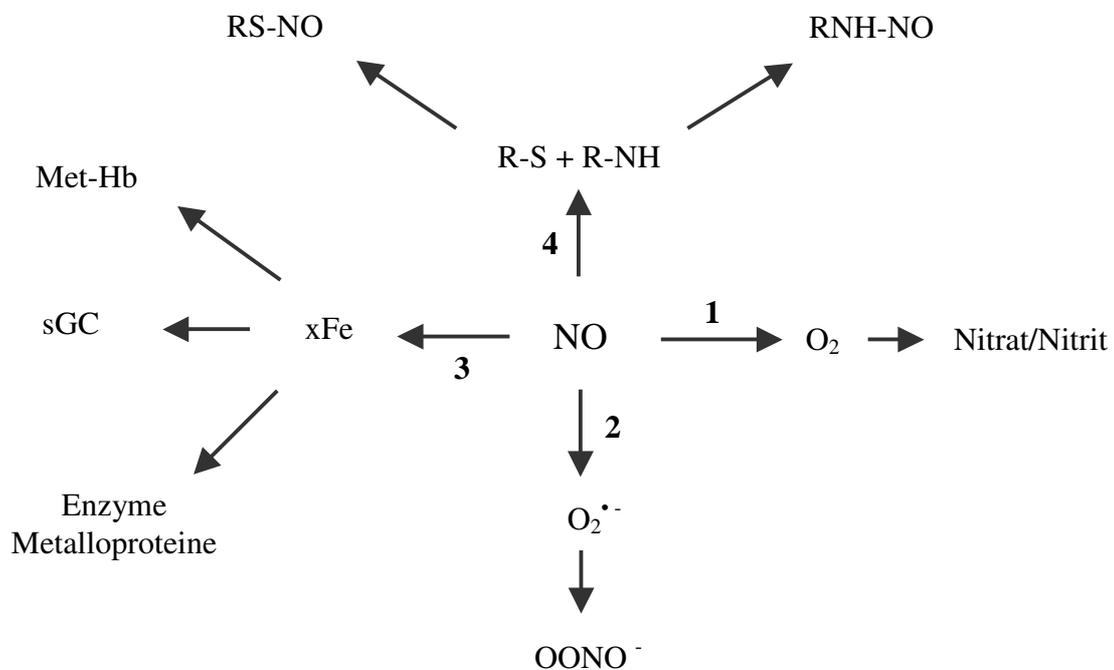
Die meisten der genannten Moleküle sind wegen ihres ungepaarten Elektronenpaares auf ihrer Außenhülle sehr reaktiv und können auf diese Weise zelluläre Strukturen wie Proteine, Lipide oder auch DNA angreifen. Die Oxidation von Schwefelgruppen kann zu Veränderungen der biologischen Aktivität von Enzymen führen oder die Funktion von Membranproteinen beeinträchtigen (Turanlahti *et al.*, 2000). Besonders gut

untersucht sind die Auswirkungen einer oxidativen Schädigung auf Membranlipide, die in einer als Lipidperoxidation bezeichneten Reaktion modifiziert werden (Feeney und Berman, 1976; Jamieson *et al.*, 1986; Turanlahti *et al.*, 2000). An der DNA führen Basenmodifikationen durch reaktive Sauerstoffspezies zu Fehlpaarungen und wirken in deren Folge mutagen. Zudem können DNA-Einzel- oder -Doppelstrangbrüche entstehen. Die daraufhin eingeleiteten Reparaturmechanismen führen zu einer Energie-depletion und damit ebenfalls zu einer Schädigung der Zelle (Sies, 1993; Vangala *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2002).

Häufig sind es mehrere Sauerstoffspezies, die gleichzeitig an einer bestimmten Stelle mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten angreifen. Um diese Zellschäden zu vermeiden, ist der Organismus mit einem ganzen Satz von Antioxidantien ausgerüstet, welche die Aufgabe besitzen, Schaden zu verhindern bzw. bereits bestehende Schäden wieder auszubessern (Comhair und Erzurum, 2002; Sies, 1993; Sies, 1997). Normalerweise besteht in der Zelle ein Gleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien, so dass physiologisch vorkommende ROS neutralisiert werden können. Besteht aber ein Ungleichgewicht zugunsten der Oxidantien, so spricht man von oxidativem Stress. Dieser ist an vielen pathophysiologischen Vorgängen beteiligt, z.B. an Entzündungsreaktionen wie Asthma, an Gewebeschäden nach Ischämie und Reperfusion oder nach physikalischen Einflüssen wie UV-Licht oder Röntgenstrahlen (van der Vliet und Cross, 2000). Auch an der Entstehung von Malignomen und dem Alterungsprozess wird eine Beteiligung der ROS angenommen (Sentman *et al.*, 2002). Ein klinisch relevantes Beispiel, bei dem oxidativer Stress induziert wird, ist, wie eingangs erwähnt, die künstliche Beatmung mit hohen Sauerstoffkonzentrationen, welche nach längerer Exposition zu einem hyperoxischen Lungenschaden führen kann (Capellier *et al.*, 1999; Chabot *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2003).

### 1.3 Stickstoffmonoxid

In den letzten Jahren wird aber nicht nur reaktiven Sauerstoffspezies, sondern auch reaktiven Stickstoffspezies (RNS) als Oxidantien eine Bedeutung an pathophysiologischen Vorgängen zugeschrieben (Duchstein *et al.*, 1999). Diese entstehen aus Stickstoffmonoxid (NO), dem kleinsten bekannten, bioaktiven Molekül (Abb. 1.3). NO ist aufgrund seiner chemischen Eigenschaften - niedriges Molekulargewicht und geringe Wasserlöslichkeit - gut diffusibel. Es kann sowohl Zytoplasma als auch Zellmembranen entlang seinem Konzentrationsgradienten schnell durchdringen (Al-Ali und Howarth, 1998; Kerwin *et al.*, 1995).



**Abb. 1.3:** Schematische Darstellung der Reaktionen von NO (modifiziert nach: Al-Ali und Howarth, 1998): Die isolierten Endprodukte von NO und Sauerstoff in wässriger Lösung sind Nitrit und Nitrat (1). Mit Superoxid-anionen ( $O_2^{\bullet-}$ ) reagiert NO zu Peroxinitrit ( $OONO^-$ ) (2). Da NO eine hohe Affinität zu eisenhaltigen Proteinen ( $xFe$ ) aufweist, wird z.B. Hämoglobin zu Methämoglobin (Met-Hb) oxidiert, die lösliche Guanylatzyklase (sGC) aktiviert und weitere Enzyme und Metalloproteine inhibiert (3). Konzentrationsabhängig reagiert NO auch mit Thiol- ( $RS-NO$ ) und Aminogruppen ( $RNH-NO$ ) von anderen Proteinen (4).

Aufgrund des ungepaarten Elektrons auf seiner Außenhülle besitzt es Radikalcharakter. In wässriger Lösung reagiert NO mit Sauerstoff zu Nitrit und Nitrat, welche u.a. an der Bildung von Nitrosaminen beteiligt sind. NO kann mit Superoxidanionen ( $O_2^{\bullet-}$ ) die stark oxidierend wirkende Substanz Peroxinitrit ( $OONO^-$ ) bilden (Pryor und Squadrito, 1995; Rubbo *et al.*, 1996; van der Vliet und Cross, 2000). Durch die hohe Affinität von NO zu eisenhaltigen Verbindungen (xFe) wird Hämoglobin, der wichtigste physiologische Scavenger von NO, zu Methämoglobin (Met-Hb) oxidiert (Kanner *et al.*, 1992). Über die Bindung an die lösliche Guanylatzyklase (sGC) vermittelt NO u.a. seine vasodilatatorischen Eigenschaften (Liaudet *et al.*, 2000). Die Inhibierung von Metalloproteinen, z.B. die Komplexe I und II der Atmungskette, wirkt zytotoxisch. Konzentrationsabhängig reagiert NO auch mit Thiol- (RS-NO) und Aminogruppen (RNH-NO) von Proteinen, was zu deren Inaktivierung führen kann (Al-Ali und Howarth, 1998; Beckman und Koppenol, 1996; Gaston *et al.*, 1994).

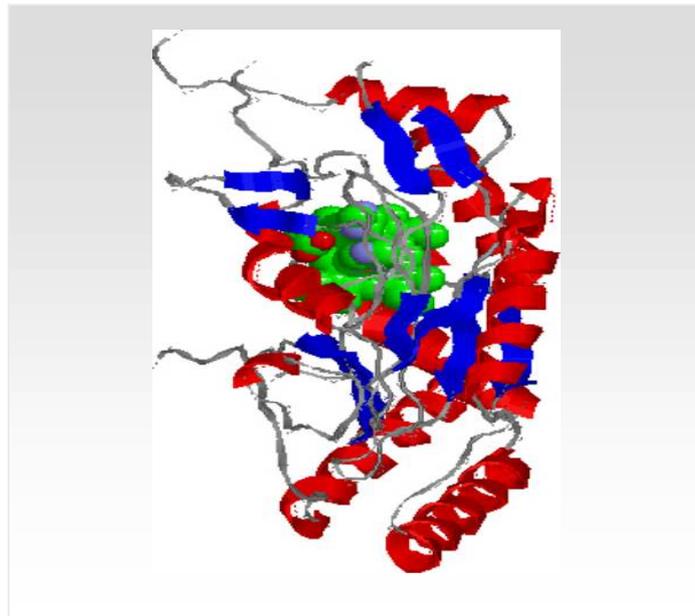
Seit der Entdeckung der NO-Produktion in Endothelzellen im Jahre 1987 als EDRF (endothelium derived relaxing factor) durch Palmer *et al.* bzw. Ignarro *et al.* hat sich ein neues und stetig wachsendes Forschungsfeld entwickelt (Duchstein *et al.*, 1999; Moncada *et al.*, 1991; Singh und Evans, 1997). Heute ist bekannt, dass NO in verschiedensten Zelltypen eine Vielzahl von Funktionen hat, z.B. in Endothelzellen für eine Vasodilatation, in Makrophagen für unspezifische immunologische Abwehrfunktionen und im Gehirn als Neurotransmitter (Kerwin *et al.*, 1995). Pathophysiologische Effekte werden dem NO in der Genese der Glomerulonephritis, des Diabetes mellitus oder der Colitis ulcerosa zugeschrieben (Nathan und Xie, 1994; Lyons, 1995). Man bezeichnet NO deswegen auch zu Recht häufig als zweischneidiges Schwert.

Die genaue Bedeutung von NO am hyperoxischen Lungenschaden ist bis heute nicht eindeutig geklärt (Gaston *et al.*, 1994; Grisham *et al.*, 1999). Alveolarmakrophagen sind eine bedeutende Quelle von NO (MacMicking *et al.*, 1997; Shellito *et al.*, 1995). Arkovitz und Kollegen zeigten, dass Ratten-AM nach 72 h hyperoxischer Exposition *in vivo* mehr NO produzierten als die AM der Kontrolltiere unter Normoxie (Arkovitz *et al.*, 1996). Auch Endothelzellen und neutrophile Granulozyten setzen NO sowie Superoxidanionen ( $O_2^{\bullet-}$ ) frei. Gefährlich ist dabei die bereits angesprochene Bildung von Peroxinitrit, welches ebenfalls an der Initiierung der Lipidperoxidation von Membranlipiden und damit auch an der oxidativen Lungenschädigung beteiligt ist

(Radi *et al.*, 1991; Saleh *et al.*, 1997; Salminen *et al.*, 2002). Eine Studie von Berg und Mitarbeitern an Ratten untersuchte die Rolle der AM in der Pathogenese der pulmonalen Sauerstoffschädigung. Eine Depletion von über 70 % der AM führte zu einer etwas längeren Überlebenszeit unter hyperoxischer Exposition verglichen mit Kontrolltieren (Berg *et al.*, 1995).

#### 1.4 Induzierbare NO-Synthase und Zytokine

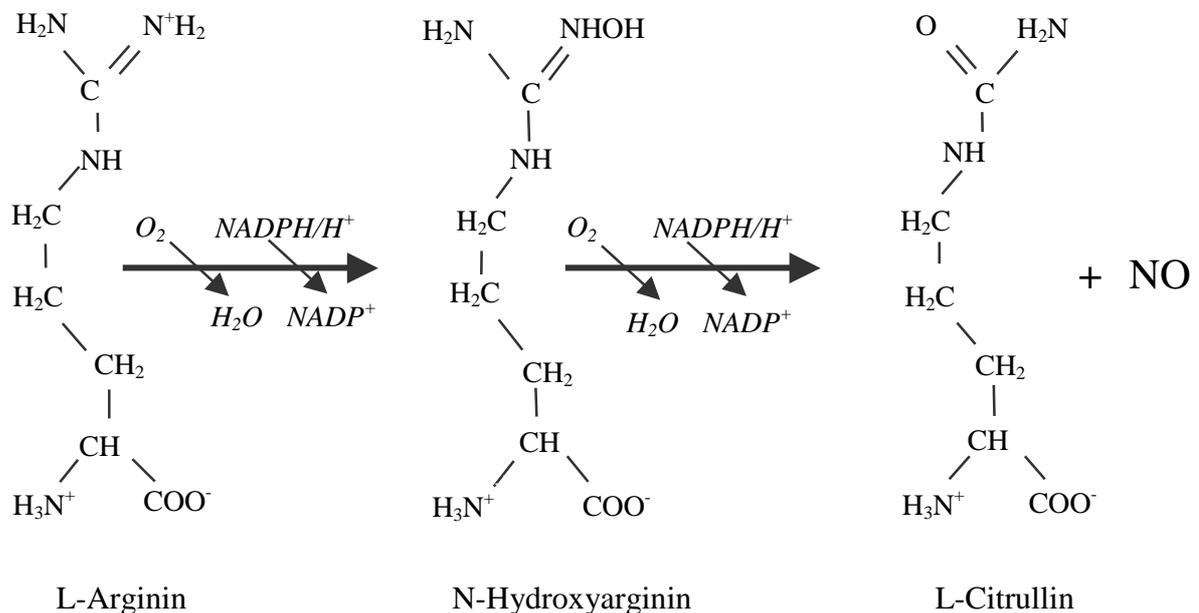
NO selbst wird durch die Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) gebildet, von denen zwei konstitutive (cNOS) und eine induzierbare Form (iNOS) bekannt sind. Die NO-Synthasen nehmen unter den eukaryontischen Enzymen eine besondere Stellung ein, da es sich bei ihnen um P-450-ähnliche Hämproteine handelt, die reduzierende und oxidierende Domänen in einem Monomer vereinigen (Oxidoreduktasen). In unserer Arbeitsgruppe interessieren wir uns besonders für die induzierbare NO-Synthase.



**Abb. 1.4:** Dreidimensionale Struktur der iNOS: Die Abbildung zeigt die als Monomer synthetisierte iNOS mit prosthetischer Gruppe Häm, hier in grün dargestellt (Fischmann *et al.*, 1999).

Die iNOS besteht aus zwei identischen Untereinheiten mit jeweils einer N-terminalen Oxidase- und einer C-terminalen Reduktase-Domäne. Als Kofaktoren werden Calmodulin, Flavinadenindinukleotid (FAD) und Flavinadeninmononukleotid (FMN) benötigt, die an die Reduktase-Domäne binden. Das Calmodulin ist im Gegensatz zu den konstitutiven Isoformen fest gebunden und somit weitgehend unabhängig von einem zusätzlichen Kalziumeinstrom. Das iNOS-Protein wird als Monomer synthetisiert (Abb. 1.4). Durch Bindung von Häm und Tetrahydrobiopterin an die Oxidase-Domäne dimerisieren die beiden Untereinheiten zur aktiven iNOS (Fischmann *et al.*, 1999; Schulz *et al.*, 1998).

Als Kosubstrate für die NO-Produktion werden Sauerstoff, NADPH sowie H<sup>+</sup> benötigt. Dabei entstehen in einer 5-Elektronen-Oxidations-Reaktion aus L-Arginin über das Zwischenprodukt N-Hydroxyarginin die Endprodukte L-Citrullin und NO (Gaston *et al.*, 1994; Zapol *et al.*, 1994; Abb. 1.5).



**Abb. 1.5:** Mechanismus der NO-Produktion durch NO-Synthasen: Dieser Mechanismus gilt für alle drei Isoenzyme. NO entsteht dabei durch die Oxidation von L-Arginin zu L-Citrullin. Als Kosubstrate werden Sauerstoff, NADPH und H<sup>+</sup> benötigt.

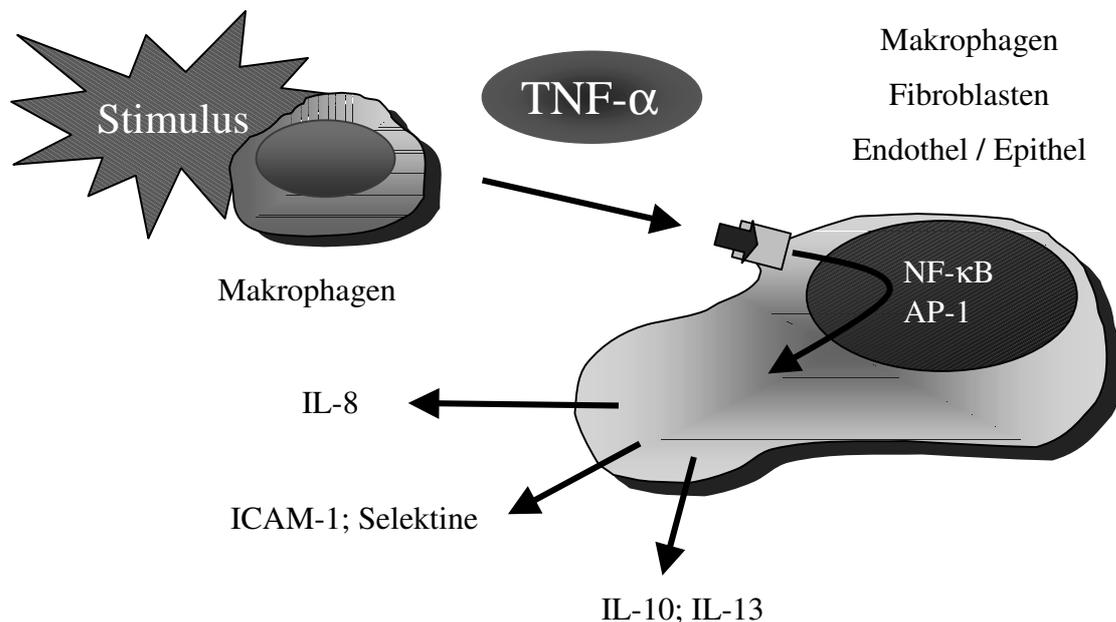
Inzwischen ist bekannt, dass viele verschiedene Zelltypen dazu in der Lage sind, die iNOS zu exprimieren, z.B. Fibroblasten (Romanska *et al.*, 2002), glatte Muskelzellen, Hepatozyten, Epithel- und Endothelzellen der Lunge, sowie Makrophagen wie Pleura-, Peritoneal- und Alveolarmakrophagen (Panaro *et al.*, 2003; Schulz *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999). Durch die iNOS werden, im Gegensatz zu den konstitutiven Isoformen, große Mengen an NO - picomolare vs. nanomolare Konzentrationen - gebildet.

Die Regulation der iNOS erfolgt auf transkriptioneller Ebene, unterliegt aber auch posttranskriptionellen Modifikationen wie Veränderungen der mRNA-Stabilität und posttranslationale Einflüsse auf das iNOS-Protein, z.B. Dimerisierung, Phosphorylierung oder Bindung von Kofaktoren (Förstermann und Kleinert, 1995; Jorens *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2003; MacMicking *et al.*, 1997; Nussler und Billiar, 1993; Pitt und Croix, 2002; Wort *et al.*, 2001). Yoshida und Xia wiesen eine Erhöhung der iNOS-Aktivität durch das endogen gebildete Hitzeschockprotein 90 über eine allosterische Protein-Protein-Interaktion nach (Yoshida und Xia, 2003). Eine weitere Möglichkeit der Aktivitätskontrolle, vor allem bei starker iNOS-Expression und NO-Freisetzung, bietet die Produktinhibition des iNOS-Proteins durch selbstgeneriertes NO (Abu-Soud *et al.*, 2001).

In ruhenden Zellen wird die iNOS nur gering oder gar nicht exprimiert. Unter adäquater Stimulation, beispielsweise Carrageenan (Cuzzocrea *et al.*, 2000), Asbest (Dörger *et al.*, 2002 a und b), hämorrhagischem Schock (Hierholzer *et al.*, 1998), Zigaretten-Rauch (Chang *et al.*, 2001) oder Hyperoxie (Cucchiari *et al.*, 1999) kommt es *in vitro* und *in vivo* zu einer Induktion der iNOS. Auch nach Verabreichung von bakteriellem Endotoxin (Lipopolysaccharide, LPS) wird die iNOS-Expression induziert (Ermert *et al.*, 2002; Hickey *et al.*, 1997; Hollenberg *et al.*, 2000).

Wie bereits erwähnt, kommt es unter Einwirkung verschiedenster Stimuli neben einer iNOS-Induktion zu einer vermehrten Expression proinflammatorischer Zytokine (griech: kytos, Zelle; kinesis, Bewegung). Diese sind körpereigene, regulatorisch wirkende, niedermolekulare Proteine oder Glykoproteine. Ihre Wirkung wird über membranständige Rezeptoren parakrin (lokale Wirkung) und autokrin (Produktzelle = Effektorzelle), teilweise auch endokrin (via Blutstrom) vermittelt. TNF- $\alpha$  und andere Zytokine stehen am Anfang der Entzündungskaskade und werden daher oft „early response cytokines“ genannt.

TNF- $\alpha$  ist ein pleiotrop wirkender Faktor mit sowohl lokaler als auch systemischer Wirkung. Er aktiviert neben weiteren Makrophagen auch Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen, die ihrerseits wieder inflammatorische Zytokine produzieren. Hierbei kommt es zu einer Freisetzung von Chemokinen, die zu einer Einwanderung von Leukozyten aus dem Blutstrom an die Entzündungsquelle führen, z.B. Interleukin-8 (IL-8). An der Akkumulation von neutrophilen Granulozyten sind neben chemotaktischen Faktoren auch Adhäsionsmoleküle auf Leukozyten und Endothelzellen beteiligt. Freigesetztes TNF- $\alpha$  führt beispielsweise zu einer Hochregulierung von Selektinen und Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 am Gefäßendothel (Fakler *et al.*, 2000; Geiser, 1999; Menard *et al.*, 1993; Zabel, 1996). Die Wirkung der „early response cytokines“ wird durch antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 und IL-13 inhibiert (Abb. 1.6).



**Abb. 1.6:** TNF- $\alpha$  und seine Wirkungen auf andere Zellen: TNF- $\alpha$  bewirkt z.B. in Makrophagen, Fibroblasten, Epithel- oder Endothelzellen eine Sekretion von Chemokinen wie IL-8 und eine Hochregulierung von Selektinen und Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1. Zusätzlich stimuliert er die Freisetzung antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 und IL-13.

Inflammatorische Zytokine spielen als Mediatoren bei entzündlichen Lungenerkrankungen eine entscheidende Rolle (Bustani und Kotecha, 2003). So konnten z.B. bei Patienten mit ARDS erhöhte TNF- $\alpha$ -Konzentrationen im Bronchialsekret nachgewiesen werden (Millar *et al.*, 1989). *In vitro*-Studien an menschlichen Alveolarmakrophagen ergaben, dass unter hyperoxischer Stimulation die LPS-induzierte TNF- $\alpha$ -Produktion gesteigert ist (O'Brien-Ladner *et al.*, 1995). Ebenso zeigt sich in diversen *in-vivo*-Studien an Ratten und Mäusen eine vermehrte TNF- $\alpha$ -Expression und -Produktion unter Hyperoxie (Barazzone *et al.*, 1996 b; Ben-Ari *et al.*, 2000; Tsan *et al.*, 1995). Durch eine intra-tracheale Instillation von anti-TNF- $\alpha$ -Antikörpern konnte das Überleben von Ratten unter hyperoxischer Exposition mit reinem Sauerstoff von drei auf bis zu sieben Tage verlängert werden (Tsan *et al.*, 1995). Diese Ergebnisse zeigen, dass die TNF- $\alpha$ -Freisetzung unter Hyperoxie gesteigert ist und deuten darauf hin, dass diese an der pulmonalen Sauerstofftoxizität beteiligt sein könnte. Eine Blockade der Makrophagen-Akkumulation unter hyperoxischer Exposition hatte einen reduzierten Chemokin-induzierten Neutrophilen-Influx und eine verminderte Proteinoxidation zur Folge (Vozzelli *et al.*, 2003). Kwon und George konnten zeigen, dass eine spezifische Kombination der Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  eine synergistische Wirkung auf die induzierte NO-Produktion ausüben (Kwon und George, 1999). Die Bedeutung einer vermehrten iNOS-Expression im Rahmen des pulmonalen Entzündungsgeschehens scheint jedoch nicht eindeutig zu sein.

## 1.5 Transkriptionsfaktoren

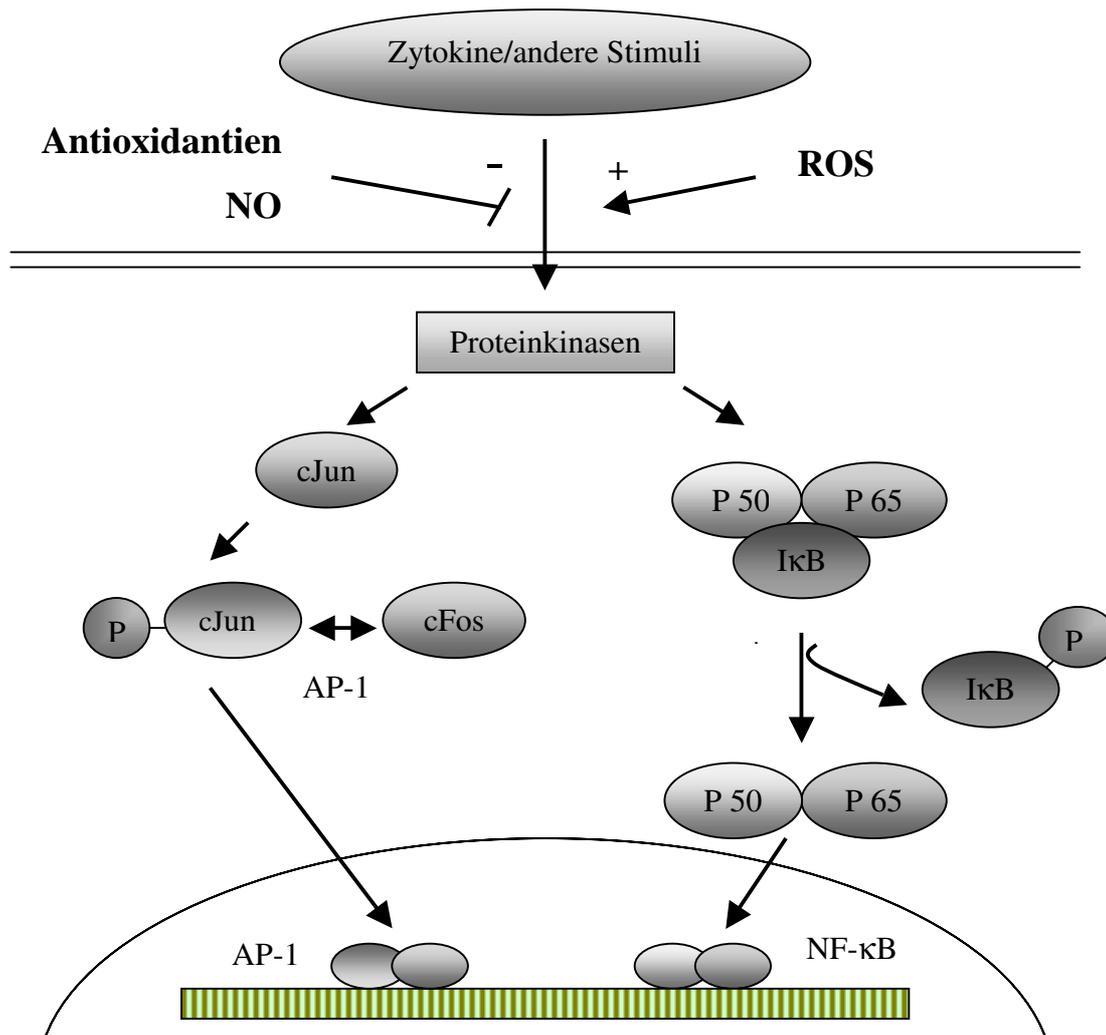
Die molekularen Mechanismen, durch welche die Expression des iNOS-Gens stimuliert oder inhibiert wird, sind noch Gegenstand der Forschung. Wie bereits unter Punkt 1.4 aufgeführt, unterliegt die iNOS im Gegensatz zu ihren konstitutiven Isoformen einer transkriptionellen Regulation. Die komplexe Struktur der Promotorregion des iNOS-Gens ist ein möglicher Hinweis darauf, dass mehrere Transkriptionsfaktoren an der Regulation der Gen-Expression unter dem Einfluss verschiedenster Stimuli beteiligt sind (Linn *et al.*, 1997).

Die Promotor-Enhancer-Region des murinen iNOS-Gens ist inzwischen genauestens bekannt (Lowenstein *et al.*, 1993). Der Promotor des Gens enthält eine „TATA-Box“ 30 Nukleotide upstream des Startcodons der iNOS-mRNA. Zusätzlich befinden sich in diesem Bereich verschiedene Bindungsstellen für bekannte Transkriptionsfaktoren wie Interferon- $\gamma$ -Response-Element (IFN- $\gamma$ -RE), Nuklear-Faktor-IL-6 (NF-IL-6), TNF-Response-Element (TNF-RE), sowie auch für das Aktivatorprotein-1 (AP-1) und Nuklear-Faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (Lowenstein *et al.*, 1993; Spink und Evans, 1997; Xie *et al.*, 1993). In der Promotorregion des humanen iNOS-Gens sind für NF- $\kappa$ B mehrere Bindungsstellen beschrieben (Nunokawa *et al.*, 1996 und 1997; Taylor *et al.*, 1998).

Auch die Zytokin-Synthese wird durch Transkriptionsfaktoren reguliert, indem diese an definierte DNA-Bindungsstellen bestimmter Gene binden. Bei entzündlichen und immunologischen Prozessen kommt den Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 eine besondere Bedeutung zu, da über diese zusätzlich zur iNOS viele proinflammatorische Zytokine reguliert werden (Adcock, 1997; Young und Gwang, 2003; Young *et al.*, 2003).

Wenn der aus einer P 50- und P 65-Untereinheit bestehende Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B an ein inhibitorisches Protein (I $\kappa$ B) gebunden zytosolisch vorliegt, ist er inaktiv. Durch eine Reihe spezifischer Aktivatoren (z.B. IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) wird er über deren Rezeptoren aktiviert, indem bestimmte Proteinkinasen den NF- $\kappa$ B-Inhibitor phosphorylieren. Auf diese Phosphorylierung folgt die Proteolyse von I $\kappa$ B, so dass dieses die Untereinheiten P50 und P65 nicht mehr daran hindern kann, in den Zellkern zu translozieren und dort die Transkription proinflammatorischer Gene zu starten.

AP-1 ist ebenfalls ein Heterodimer. Die Proteine cFos und cJun, welche durch die „immediate early genes“ c-fos und c-jun aus der Gruppe der Protoonkogene codiert werden, dimerisieren im Zytosol und binden als Transkriptionsfaktor AP-1 an Konsensussequenzen verschiedener Gene (Chen *et al*, 1999; Christman *et al.*, 2000; Rahman und MacNee, 1998; Whitsett, 2002; Abb. 1.7).



**Abb. 1.7:** Modell zur Aktivierung von NF-κB und AP-1: AP-1 ist ein Heterodimer aus den Proteinen cFos und cJun. NF-κB ist ebenfalls ein Heterodimer und liegt zytosolisch an ein inhibitorisches Protein (IκB) gebunden vor. Nach Stimulation wird IκB phosphoryliert und die beiden Untereinheiten P 50 und P 65 können in den Zellkern translozieren. ROS stimulieren die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren, Antioxidantien und NO hemmen ihre Aktivierung.

Inzwischen konnte auch eine synergistische Funktion zwischen NF- $\kappa$ B und AP-1 nachgewiesen werden. So interagieren die Untereinheiten der beiden Transkriptionsfaktoren, potenzieren dadurch ihre DNA-Bindungsaktivität und folglich auch ihre biologische Funktion (Fan *et al.*, 2001).

In den letzten Jahren mehren sich die Hinweise darauf, dass NF- $\kappa$ B und AP-1 zu den redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren gehören (Bowie und O'Neill, 2000). Bereits Schulze-Osthoff und Mitarbeiter konnten in einem Experiment zeigen, dass ROS die Expression redoxsensitiver Transkriptionsfaktoren als bedeutende Induktoren beeinflussen (Schulze-Osthoff *et al.*, 1995). Diese Interaktionen zwischen ROS und Transkriptionsfaktoren können teilweise auf den stimulatorischen Effekt der ROS auf intrazelluläre Kinasen oder Phosphatasen zurückzuführen sein, welche die Phosphorylierung und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren regulieren (D'Angio und Finkelstein, 2000; Li und Karin, 1999). Durch die Applikation von Antioxidantien wie N-Acetyl-L-cystein (NAC) und Pyrrolidin-1-dithiocarbamat (PDTC) war es möglich, sowohl die iNOS-Expression als auch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und AP-1 zu inhibieren (Pepperl *et al.*, 2001). Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass reaktive Stickstoffspezies (RNS) ebenfalls an der Aktivierung redoxsensitiver Transkriptionsfaktoren beteiligt sind (Haddad, 2002).

Demgegenüber ist von NO bekannt, dass es die Expression von NF- $\kappa$ B inhibiert (Chen *et al.*, 1999; Mathews *et al.*, 1996). Diese Inhibition kann auf eine direkte Nitrosylierung von NF- $\kappa$ B zurückzuführen sein. Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass NO stabilisierend auf den Inhibitor I $\kappa$ B wirkt und/oder die Synthese des Inhibitors fördert. Eine weitere Möglichkeit könnte sein, dass NO antioxidierend und als Radikalfänger wirkt und so die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch ROS verhindert.

Die genaue Bedeutung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffmetaboliten für die Initiierung und Regulation der Gen-Expression via Transkriptionsfaktoren wird immer noch kontrovers diskutiert, denn die Effekte der Oxidantien variieren von Zelltyp zu Zelltyp und sind abhängig von der Art des oxidativen Stresses (D'Angio und Finkelstein, 2000).

## 1.6 Fragestellung

Es gibt bereits diverse Studien, die unter Einwirkung verschiedenster Stimuli den Zusammenhang zwischen iNOS-Induktion und akutem Lungenschaden *in vivo* untersucht haben. Hierbei ergaben sich jedoch kontroverse Ergebnisse, die einerseits auf proinflammatorische Eigenschaften der iNOS hindeuten, andererseits aber darauf schließen lassen, dass antiinflammatorische Eigenschaften der iNOS ebenfalls eine Rolle spielen. Bisher gibt es aber erst wenige Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen der iNOS-Induktion und einer hyperoxischen Lungenschädigung.

Um die spezifische Bedeutung des iNOS-Gens am Lungenschaden *in vivo* zu untersuchen, wird neben der Applikation unspezifischer und spezifischer iNOS-Inhibitoren in jüngster Zeit das Modell der iNOS-defizienten Maus verwendet. Ziel dieser Studie war, die mögliche Auswirkung einer iNOS-Defizienz auf den akuten hyperoxischen Lungenschaden zu erfassen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher in einem tierexperimentellen Ansatz folgende Punkte analysiert werden:

- Bewirkt die Abwesenheit des iNOS-Gens eine Änderung der Hyperoxie-induzierten inflammatorischen Reaktion und
- wird dadurch konsekutiv das Ausmaß der oxidativen Lungenschädigung beeinflusst?
- Hat die iNOS-Defizienz einen Einfluss auf die Hyperoxie-induzierte Aktivierung von redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren?

## 2 Material und Methoden

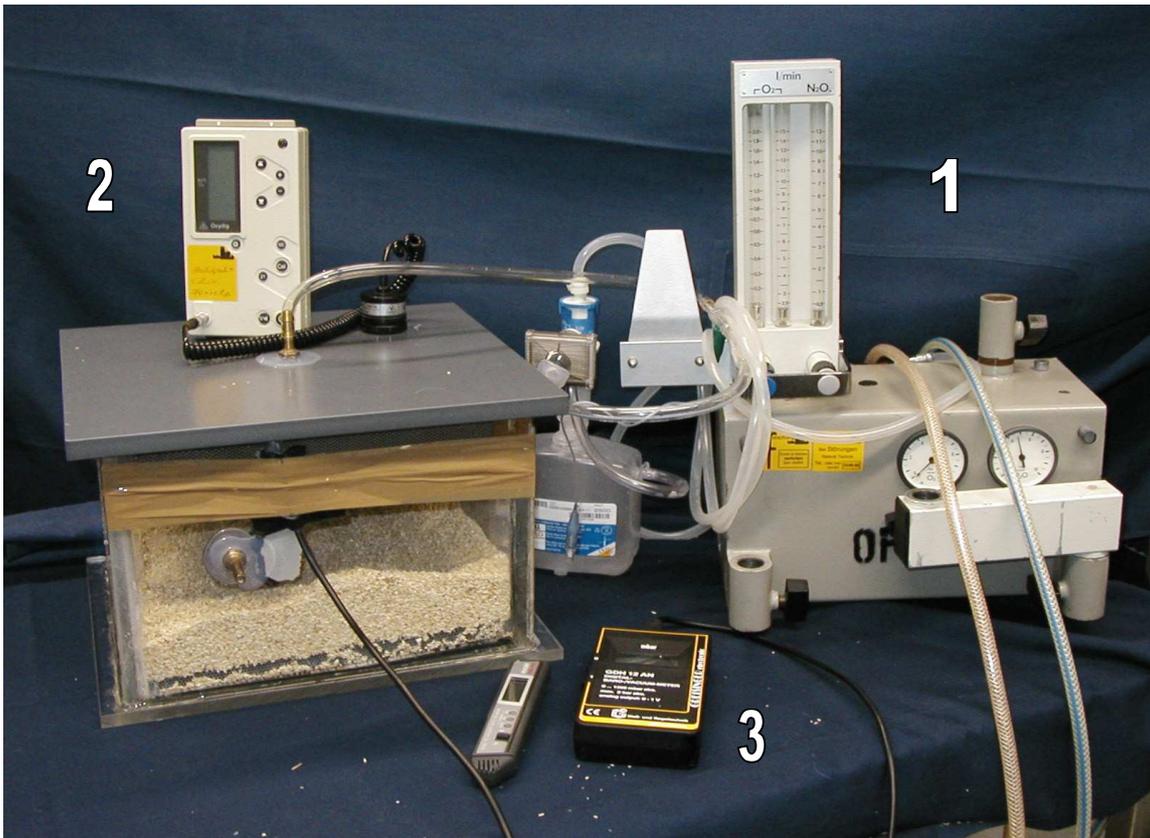
### 2.1 Versuchsbeschreibung

#### 2.1.1 Versuchstiere

Die Tierversuche wurden im Zeitraum von 2001 bis 2002 am Institut für Chirurgische Forschung der Universität München durchgeführt. Der Regierung von Oberbayern lag ein genehmigter Tierversuchsantrag (Aktenzeichen: 211-2531-67/98) gemäß § 8 Abs.1 Satz 2 Nr. 4 des Tierschutzgesetzes vor. Für alle Untersuchungen wurden männliche iNOS-defiziente Mäuse und deren genetischer Hintergrund (C57BL/6J x 129/SvEv, am Institut gezüchtet) mit einem Alter von 12 bis 16 Wochen verwendet. Die Tiere wurden vor der Exposition in Makrolon-Käfigen Typ II gehalten und erhielten Wasser *ad libitum*, sowie Standard-Nagerfutter (ssniff, Soest).

#### 2.1.2 Versuchsaufbau

Die Exposition der Mäuse erfolgte in einer von der Hauswerkstatt des Instituts hergestellten Plexiglaskammer ( $27 \times 27 \times 20 \text{ cm}^3$ ), die bis auf zwei Öffnungen luftdicht abgeschlossen ist (Abb. 2.1). In der Mitte des Kammerdeckels befindet sich ein Zulauf für das einströmende Luftgemisch bzw. den reinen Sauerstoff; vorne in der Kammerwand ist ein Metallrohr eingelassen, über welches die Luft wieder entweichen kann, um in der Kammer einen Volumenfluss zu gewährleisten. Zur Absorption von  $\text{CO}_2$  und Feuchtigkeit wurde Natronkalk (Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland) verwendet. Die gewünschte Sauerstoffkonzentration wurde über einen Gasmischer für  $\text{O}_2$  und  $\text{N}_2\text{O}$  (Anästhesiewerkstatt, Klinikum Großhadern), der zu einem Gasmischer für  $\text{O}_2$  und Druckluft umfunktioniert wurde, eingestellt, über ein Wasserreservoir angefeuchtet und in die Plexiglaskammer geleitet. Die Tiere in der Kammer erhielten ebenfalls Standard-Nagerfutter und Wasser *ad libitum*.



**Abb. 2.1:** Die Abbildung zeigt die von der Hauswerkstatt des Instituts hergestellte Kammer mit Gasmischer (1), Oxydig (2), Hygrometer und Digital-Baro-/Vakuum-Meter (3)

### 2.1.3 Versuchsprotokoll

Der Volumenfluss in der Kammer wurde auf 6 l/min eingestellt. Dabei wurden die Tiere Sauerstoffkonzentrationen von 21 %, 60 % und 100 % ausgesetzt. Dies wurde regelmäßig mit einem Oxydig (Drägerwerk AG, Lübeck) überprüft. Der Hell-Dunkel-Rhythmus im Raum betrug 12 h. Als Expositionsbedingungen in der Kammer ergaben sich eine Temperatur von  $24^{\circ}\text{C} \pm 1,5$ , eine Luftfeuchtigkeit von  $73 \% \pm 13$  (Thermo-Hygrometer, Huger Electronics GmbH, Villingen-Schwenningen) und ein Luftdruck von  $947 \text{ mbar} \pm 5$  (Digital-Baro-/Vakuum-Meter, GDH 12 AN, Greisinger Electronic, Regenstauf). In Abbildung 2.2 ist das Versuchsprotokoll schematisch zusammengefasst. Die Gruppengröße ist auf  $n = 7$  festgelegt worden; die 21 %-Sauerstoff-Gruppe diente als Kontrollgruppe. Nach 24 bzw. 72 h wurde in tiefer



## 2.2 Bronchoalveoläre Lavage

Die Mäuse wurden durch eine intraperitoneale Injektion von 10 mg/kg KG Pentobarbital-Natrium (Narcoren<sup>®</sup>, Merial, Hallbergmoos) narkotisiert und in Rückenlage fixiert. Die Trachea wurde freigelegt, inzidiert und kanüliert (Abbocath<sup>®</sup>-T, 20 G x 32 mm (1¼''), Venisystems, Sligo, Irland). Nach medianer Eröffnung des Abdomens und des Thorax wurden zwei Entlastungsschnitte seitlich in die Bauchwand gelegt und das Zwerchfell von der Thoraxwand gelöst. Die bronchoalveoläre Lavage (BAL) erfolgte *in situ* in 5 Schritten, wobei jeweils mit 1 ml steriler, phosphatgepufferter 0,81 %iger Kochsalzlösung (PBS, Apotheke Klinikum Innenstadt, München) gespült wurde. Das Volumen (recovery) der gewonnenen BAL-Flüssigkeit (BALF) wurde in Mess-zylindern gesammelt, für 10 Minuten bei 300 x g (Hettich Rotanda/S Zentrifuge, Wagner & Munz, München) zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und für spätere Untersuchungen bei -20°C bzw. bei -80°C eingefroren. Das Zellpellet wurde mit 5 ml PBS gewaschen, abzentrifugiert und mit 500 µl PBS resuspendiert. Die Gesamtzellzahl wurde mit Hilfe eines Coulter Counters (Coulter Ac T 8, Coulter Electronics, Krefeld) ermittelt und als Zellzahl x 10<sup>6</sup>/ml angegeben.

### 2.2.1 Zelldifferenzierung

Zur Differenzierung der einzelnen Zellpopulationen wurden Zytopräparate angefertigt. Zuerst wurden 200 µl der Zellsuspension 10 min bei 400 x g (Cytospin 2, Shandon Labortechnik GmbH, Frankfurt) auf Objektträger zentrifugiert und luftgetrocknet. Anschließend wurden diese in einem Färbeautomaten (Varistain 4, Shandon Labortechnik GmbH, Frankfurt) mit May-Grünwald-Giemsa (Merck, Darmstadt) nach Pappenheim (5 min May-Grünwald-Lösung, 2 min Waschen, 15 min 12,5 %ige Giemsa-Lösung, 2 min Waschen) gefärbt. Die Differenzierung der einzelnen Zellen nach morphologischen Kriterien erfolgte lichtmikroskopisch (Lichtmikroskop, Zeiss 473011-9901, Oberkochen), wobei jeweils 2 x 100 Zellen pro Präparat ausgezählt wurden.

### **2.2.2 Bestimmung der Zellvitalität**

Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte durch das Trypanblau-Ausschlußverfahren. Hierzu wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit einem Aliquot isotonischer 1 %iger Trypanblau-Lösung (Fluka AG, Neu Ulm) gemischt, anschließend lichtmikroskopisch (Lichtmikroskop, Zeiss 473011-9901) 100 Zellen pro Präparat ausgezählt, sowie der Anteil der ungefärbten und somit vitalen Zellen ermittelt.

### **2.2.3 Bestimmung der Gesamtprotein-Konzentration**

Die Gesamtproteinkonzentration in der BALF wurde mittels eines nach Lowry modifizierten Bicinchoninsäure (BCA)-Assay bestimmt (Smith *et al.*, 1985). Diese Messung basiert auf der Biuret-Reaktion, bei der Proteine im alkalischen System mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen einen farbigen Komplex bilden, der durch BCA verstärkt wird. Dieser tiefviolette Farbkomplex kann bei 562 nm photometrisch quantifiziert werden. Zur Durchführung wurden jeweils 20  $\mu\text{l}$  der BALF-Probenlösung mit 200  $\mu\text{l}$  der Reaktionslösung, bestehend aus 49 Teilen Lösung A (1 % BCA, 2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,16 % Natriumtartrat, 0,4 % NaOH und 0,95 %  $\text{NaHCO}_3$  in wässriger Lösung, pH 11,25) und einem Teil Lösung B (4 %  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  in wässriger Lösung) versetzt, 30 min bei 37°C inkubiert und die Extinktion bei 562 nm im Mikrotiterplatten-Reader (EAR 400 AT, SLT, Salzburg, Österreich) gemessen. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bis 1  $\text{mg}/\text{ml}$  bovinem Serumalbumin (BSA, PAA Laboratories, Linz, Österreich). Alle Messungen wurden als Doppelbestimmungen vorgenommen.

### **2.2.4 Bestimmung der NO-Produktion**

Die NO-Freisetzung wurde indirekt durch die Bestimmung der Oxidationsprodukte Nitrat und Nitrit mittels der Griess-Reaktion nach einer Methode von Ding (Ding *et al.*, 1988) ermittelt. Dabei bildet das stabile Oxidationsprodukt Nitrit mit den

aromatischen Aminen des Griess-Reagenz (1 % Sulfanilamid, 0,1 % N-1-Naphthyl-ethylendiamindihydrochlorid (beides Sigma Chemie, Deisenhofen) in 2,5 %iger Phosphorsäure) einen dunkel-violetten Farbkomplex, der photometrisch erfasst werden kann. Dazu wurden jeweils 50 µl der Probenlösung in eine Mikrotiterplatte pipettiert, 50 µl Griess-Reagenz zugegeben, 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und anschließend bei 550 nm im Mikrotiterplatten-Reader (EAR 400 AT, SLT) gemessen. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe mit NaNO<sub>2</sub> (linearer Bereich von 0-100 µmol/l). Alle Messungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

### **2.2.5 Bestimmung der Laktatdehydrogenase-Aktivität**

Die Laktatdehydrogenase-Aktivität in der BALF wurde mit einem Testkit (LDH Optimiert, Roche Diagnostics, Mannheim) bestimmt, welcher auf der Reduktion von Pyruvat zu Laktat beruht. Diese Reaktion wird durch die Laktatdehydrogenase katalysiert. Dazu wurden 20 µl Probe mit 500 µl Testlösung versetzt und bei einer Messtemperatur von 25°C nach 0, 1, 2 und 3 min die Extinktion photometrisch (DU 7500, Beckmann Photometer, Fullerton, USA) bei 340 nm ermittelt. Die Berechnung der LDH-Aktivität erfolgte nach der Formel:

$$\text{Aktivität in U/l} = 4921 \times \Delta E/\text{min} \quad (\text{Extinktionskoeffizient: } \epsilon = 4921; \\ \text{Angabe des Herstellers})$$

Als Kontrollserum diente Precinorm U (Roche Diagnostics, Mannheim).

### **2.2.6 Bestimmung der TBARS in der BALF**

Als Ausdruck einer vermehrten Oxidantien-Produktion wurden in der BALF die Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS) nach einer modifizierten Methode nach Thiery gemessen (Thiery *et al.*, 1996). Zur Proteindenaturierung wurden die Proben mit 50 %iger Trichloressigsäure versetzt, 2 - 3 min lang geschüttelt und das ausgefallene Protein abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß

überführt und 75 µl einer 1,3 %igen Thiobarbitursäurelösung (Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen) in 0,3 % NaOH dazugegeben. Nach der Inkubation für 60 min bei 90°C wurden die Proben kurz auf Eis gestellt und dann für 6 min bei maximaler Geschwindigkeit in einer Eppendorffzentrifuge (Eppendorff Centrifuge 5415, Eppendorff, Hamburg) zentrifugiert. Nun wurden 200 µl Probe bei 530 nm im Photometer (Dynex MRX TC II, Dynex Technologies, Denkendorf) gemessen. Zur Berechnung der Lipidperoxidation diente eine Standardkurve mit Malondialdehyd (MDA, Sigma Chemie), wobei der lineare Messbereich zwischen 0,3 und 4,8 µM lag. Die Ergebnisse wurden als nmol TBARS/ml angegeben.

### **2.2.7 Bestimmung der TNF- $\alpha$ -Konzentration**

Die Bestimmung der TNF- $\alpha$ -Konzentration in der BALF erfolgte mittels eines TNF- $\alpha$ -ELISA-Testkits (EM-TNFA, Endogen, Woburn, Massachusetts, USA). Dieser Test basiert auf dem Prinzip der Sandwichtechnik. Es wurden 50 µl der zellfreien BALF/well auf der ELISA-Platte vorgelegt und mit 50 µl biotinyliertem Antikörper-Reagenz versetzt. Nach zwei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte 10 Mal mit einem Wasch-Puffer gewaschen (Nunc Immunowash I2, Dänemark). Anschließend wurden für 30 min 100 µl/well Streptavidin-HRP („horseradish-peroxidase“-konjugierte TNF- $\alpha$ -Antikörper zugegeben. Nach erneutem Waschen wurden die einzelnen Probenlösungen mit je 100 µl TMB-Reaktionslösung (5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 25% Tetramethylbenzidin in Methanol, 1 % DMSO, 7,5 % Glycerol) versetzt und im Dunkeln entwickelt. 30 min später wurde die Reaktion mittels der Stopplösung (1 Mol Schwefelsäure) beendet und die Absorption bei 450 nm im ELISA-Reader (EAR 400 AT, SLT) gemessen. Als Standardkurve diente folgende Verdünnungsreihe: 0 pg/ml, 50 pg/ml, 100 pg/ml, 200 pg/ml, 300 pg/ml, 400 pg/ml und 500 pg/ml.

## **2.3 Entnahme von Lungengewebe**

Die Tiere wurden durch eine intraperitoneale Injektion von 60 mg/kg KG Ketamin (Ketavet<sup>®</sup>, Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen) und 7,5 mg/kg KG Xylazin 2 % (Rompun<sup>®</sup>, BayerVital, Leverkusen) narkotisiert. Nach Fixierung der Tiere in Rückenlage wurden das Abdomen und der Thorax median eröffnet. Die Lungen wurden mobilisiert, entnommen, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80°C gelagert.

### **2.3.1 Bestimmung des Verhältnisses von Lungenfeucht- zu Lungentrockengewicht**

Zur Bestimmung der Wet-Dry-Ratio (Verhältnis von Lungenfeucht- zu Lungentrockengewicht) wurde das Lungengewebe sofort nach Entnahme in feuchtem Zustand, sowie nach Trocknen bei 80°C für 24 h (Trockenschrank Memmert, Schwabach) gewogen (Mettler Toledo, AG 245, Nänikon, Schweiz) und der Quotient aus Lungenfeucht- und Lungentrockengewicht ermittelt.

### **2.3.2 Bestimmung der Myeloperoxidase-Aktivität**

Die Messung der Myeloperoxidase-Aktivität im Lungengewebe erfolgte mittels eines modifizierten Assays nach Kübler (Kübler *et al.*, 1996). Die gefrorenen Gewebestücke wurden gewogen (Mettler Toledo, AG 245), in Pottergefäße überführt und mit 2 ml einer 0,02 M Kaliumphosphatpufferlösung (pH 7,4) versetzt. Das Gewebe wurde sofort auf Eis homogenisiert (Potter, Typ 853203, Braun-Melsungen AG, Melsungen), dann 15 min lang bei 4°C in einer Ultrazentrifuge (Sorvall<sup>®</sup> Instruments, RC5C, Du Pont Company, Newton, USA) mit 20000 U/min ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet für 2 h im Wasserbad bei 60°C inkubiert. Im Folgenden wurde das Pellet mit 1 ml 0,5 %iger HTAB-Lösung (Hexadecyltrimethylammoniumbromid) resuspendiert, für 15 min im Ultraschallbad

(Sonorex, RK514M, Bandelin Electronic, Berlin) behandelt, 3 x bei - 80°C eingefroren und wieder aufgetaut, sowie erneut im Ultraschallbad behandelt. Die Suspension wurde wiederum für 15 min bei 4°C mit 20000 U/min ultrazentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und die Bestimmung der MPO-Aktivität durchgeführt. Dieser Assay beruht auf der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-abhängigen Oxidation von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen), bei der das ursprünglich farblose TMB im oxidierten Zustand eine blau-grüne Farbe annimmt. Dabei wurden 150 µl einer 6,4 mM TMB-Lösung (Endkonzentration: 1,6 mM) und 150 µl einer 2,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (Endkonzentration: 0,6 mM) in eine Mikroküvette pipettiert und die Reaktion durch Zugabe von 300 µl Probelösung gestartet. Bei einer Messtemperatur von 25°C wurde die Extinktionsänderung bei 691 nm über 20 min in einem Photometer (DU, Beckmann Photometer) registriert.

### **2.3.3 Bestimmung der TBARS im Lungengewebe**

Im Lungengewebe wurden die Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen nach einer modifizierten Methode von Thiery (Thiery *et al.*, 1996) detektiert, die Gewebhomogenisierung erfolgte nach Okhawa *et al.* (1978 und 1979). Dabei wird das Lungengewebe mit 1.15 %iger KCl-Lösung (1:10) versetzt und homogenisiert. Die weitere Vorgehensweise wurde unter 2.2.6 beschrieben. Hier wurde ebenfalls die Standardkurve mit MDA zur Berechnung herangezogen. Das Ergebnis wurde als nmol TBARS/g Feuchtwicht angegeben.

### **2.3.4 Histologie**

Das Lungengewebe wurde mit einer 4 %igen wässrigen Lösung von neutralem Formalin (Apotheke, Klinikum Innenstadt, München) gehärtet und fixiert. Das Gewebe wurde in Paraffin eingebettet, um eine schneidbare Konsistenz zu erreichen. Anschließend wurden 3 µm dünne Schnitte auf einem Mikrotom (Hn 40, Reichert und

Jung, Leica, Bensheim) angefertigt. Nachdem die Gewebeschnitte entparaffiniert worden waren, konnten die histologischen Präparate mit dem Standardfärbeverfahren der Hämatoxylin-Eosin-Färbung gefärbt und lichtmikroskopisch (Lichtmikroskop, Zeiss 473011-9901) ausgewertet werden.

## **2.3.5 Nachweis der Aktivität der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1**

### **2.3.5.1 Extraktion des nukleären Proteins**

Um die nukleären Transkriptionsfaktoren Nuclear-Factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) und Aktivatorprotein-1 (AP-1) bestimmen zu können, muss zunächst das nukleäre Protein vom zytoplasmatischen Protein getrennt werden. Dazu diente die Methode nach Dignam *et al.* (1983). Die Gewebeprobe (- 80°C) wurden mit 4  $\mu$ l Lösung A versetzt (0,6 % Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 10 mM HEPES, 1 mM EDTA und 4 % Proteinasein-hibitoren Cocktail) und 60 sec bei 1200 U/min und 30 sec bei 1400 U/min homogenisiert (Potter, Typ 853202, Braun-Melsungen AG). Das Homogenisat wurde in 12-ml-Röhrchen überführt und die zellunlöslichen Bestandteile bei 2000 U/min für 30-60 sec abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, für 5 min auf Eis gestellt und nochmals für 10 min bei 5000 U/min (Hettich Rotanda/S Zentrifuge, Wagner & Munz) zentrifugiert. Der Überstand mit der zytoplasmatischen Proteinfraction wurde verworfen, das Pellet in 300  $\mu$ l Puffer (25 % Glycerol, 20 mM HEPES, 420 mM NaCl, 1,2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT) resuspendiert, 30 min auf Eis gestellt und anschließend für 1 min bei 4°C mit maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge, 5415 R). Der nun gewonnene Überstand mit der nukleären Proteinfraction wurde abgenommen und eine BCA-Proteinbestimmung durchgeführt (siehe Punkt 2.2.3).

### 2.3.5.2 Electrophoretic Mobility Shift Assay

Die aktivierten Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 können, wie in Kuppatt *et al.* (1997) beschrieben, im Kern detektiert werden. Für die Anlagerung wurden die Oligonukleotide (Tabelle 2.1) zum Nachweis der Transkriptionsfaktoren erst in einem 1:10 verdünntem Bindungspuffer (0,04 M Tris, 0,2 M NaCl, 2 mM EDTA, 8 % Glycerin, 2  $\mu$ l Ficoll 400, 0,2 mM PMSF, 4 mM DTT) für 5 min auf 95°C erhitzt und dann langsam abgekühlt. Zur Markierung der Oligonukleotide wurde eine Lösung aus 11  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 2  $\mu$ l Phosphorylierungspuffer, 5  $\mu$ l <sup>32</sup>Phosphor- $\gamma$ -ATP, sowie 1  $\mu$ l PN-Kinase und 1  $\mu$ l der Oligonukleotide für 1 h bei 37°C inkubiert. Über eine NUC-Trap-Säule (Stratagene, Heidelberg) wurde freies <sup>32</sup>Phosphor entfernt. Als nächstes wurden 10  $\mu$ g nukleäres Protein mit 2  $\mu$ l <sup>32</sup>Phosphor-markierten Oligonukleotiden (MWG Biotech, Ebersberg) 30 min auf Eis inkubiert. Um die spezifische Bindung der Oligonukleotide zu überprüfen, wurden 10 min vor der Inkubation mit den markierten Oligonukleotiden spezifische und unspezifische kalte, d.h. nicht mit <sup>32</sup>Phosphor markierte Oligonukleotide im Überschuss zugegeben. Die Auftrennung erfolgte über 2 h bei 250 V in einem 6 %igen PAA-Gel (75 % H<sub>2</sub>O, 45 mM Tris, 45 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8,0, 6 % APS und 60  $\mu$ l TEMED als Katalysator) mit Laufpuffer (45 mM Tris, 45 mM Borsäure, 1 mM EDTA, in H<sub>2</sub>O gelöst, pH 8,0).

**Tabelle 2.1:** Oligonukleotidsequenzen

Transkriptionsfaktor	Oligonukleotidsequenz
NF- $\kappa$ B	5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3'
	5'-GCC TGG GAA AGT CCC CTC AAC T-3'
AP-1	5'-CGC TTG ATG AGT CAG CCG GAA-3'
	5'-TTC CGG CTG ACT CAT CAA GCG-3'

### **2.3.6 Nachweis der iNOS- und TNF- $\alpha$ -mRNA**

Die Methode der Reversen Transkriptase-Polymerasenkettenreaktion (RT-PCR) macht es möglich, RNA als Ausgangsmaterial zu verwenden. Dabei wird isolierte RNA zunächst mit der reversen Transkriptase in die komplementäre copy DNA (cDNA) umgeschrieben, die dann als Ausgangsmatrize für die Amplifikation dient.

#### **2.3.6.1 RNA-Isolierung**

Um vor Kontamination zu schützen, wurden die folgenden Schritte an einem RNase-freien Arbeitsplatz durchgeführt. Zuerst erfolgte die Isolierung der gesamten RNA aus dem Lungengewebe mit Hilfe eines RNeasy Mini Kit (Quiagen, Hilden). Dazu wurden die einzelnen Gewebestücke in 350  $\mu$ l RLT-Puffer lysiert, homogenisiert (Omni 2000, Waterbury, USA) und mit 350  $\mu$ l 70 %igem Ethanol versetzt. Die Lösung wurde auf eine RNeasy-Säule pipettiert und bei  $> 8000 \times g$  zentrifugiert (5415 R, Eppendorf Zentrifuge). Nun wurden die Säulen mit 700  $\mu$ l RW1-Puffer gewaschen, 15 sec bei  $> 8000 \times g$  zentrifugiert, dann mit je 500  $\mu$ l RPE-Puffer gewaschen, wieder für 15 sec zentrifugiert, noch einmal mit 500  $\mu$ l RPE-Puffer gewaschen und zuletzt, um die Säulenmembran zu trocknen, für 2 min zentrifugiert. Um die RNA zu eluieren, wurden 30  $\mu$ l RNase-freies Wasser direkt auf die Membran aufgebracht und 1 min bei  $> 8000 \times g$  zentrifugiert. Der RNA-Gehalt des Eluats wurde photometrisch (DU, Beckmann Photometer) bei 260 nm gemessen. Zuletzt erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der RNA, um die Qualität der Isolierung zu überprüfen, wobei sich das RNA-typische Doppelbandenmuster zeigen sollte.

#### **2.3.6.2 cDNA-Synthese**

Zur Synthese der cDNA wurden 2  $\mu$ g RNA mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 15,7  $\mu$ l verdünnt und dann für 3 min bei 75°C in einem Thermocycler (Perkin Elmer, Cetus Corporation, Norwalk, CT, USA) inkubiert. Nun wurden jeweils

14,3 µl cDNA-Synthese-Mix, bestehend aus 1,5 µM Oligo-p(dT)<sub>15</sub>-Primer (Roche Diagnostics, Mannheim), 0,1 M DTT (Dithioereitol) (Gibco BRL<sup>®</sup>), 5 x First-Strand-Buffer (Gibco BRL<sup>®</sup>), 10 mM dNTP-Mix (Eppendorf, Hamburg), 40 U/µl RNase-Inhibitor (Roche Diagnostics, Mannheim) und 200 U/µl reverse Transkriptase des Maus-Moloney-Leukämievirus (Gibco BRL<sup>®</sup>) in das Reaktionsgefäß (Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf) dazupipettiert. Es folgte die Inkubation für 1 h im Thermocycler bei 37°C, 10 min Hitzeinaktivierung bei 95°C und anschließend die Abkühlung auf 4°C. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei - 80°C.

### **2.3.6.3 PCR**

In einem PCR-Reaktionsgefäß (Biozym Diagnostik) wurden 3 µl der cDNA mit jeweils 47 µl des DNA-Synthese-Mixes (5 µl 10 x PCR-reaction-buffer (Roche Diagnostics, Mannheim), 1 µl dNTP-Mix (10 mM, Eppendorf), 1 µl von jedem Primer (sense und antisense), 38,8 µl RNase freies Wasser und 0,2 µl Taq DNA-Polymerase 1 U/µl (Roche Diagnostics, Mannheim)) versetzt und mit einem Tropfen leichtem Mineralöl (Sigma, Taufkirchen) bedeckt. Die PCR wurde in einem Thermocycler (RoboCycler Gradient 40, Stratagene, Heidelberg) durchgeführt. Zuerst wurde 1 min lang bei 95°C prädenaturiert, dann wurde für 27 bzw. 30 und 35 Zyklen amplifiziert (Denaturierung bei 95°C für 45 sec, Anlagerung (Annealing) der Primer für 45 sec, Elongation bei 72°C für 1 min). Als Negativkontrolle diente RNA anstelle der cDNA. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotid-Primer (MWG-Biotech, Ebersberg) sind in Tabelle 2.2 aufgelistet. Als Haushaltsgen diente β-Aktin.

### **2.3.6.4 Detektion der PCR-Produkte**

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in 1 %igem Agarose-Gel versetzt mit 25 µg/ml Ethidiumbromid in einer Elektrophorese-Kammer (Blue Marine 100, Serva, Heidelberg) gefüllt mit PCR-Laufpuffer (10 mM Tris, 0,35 % Eisessig, 1 mM

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)). Die PCR-Produkte (4 µl) wurden mit 2 µl Puffer (6 x Loading Dye, MBI Fermentas) versetzt und aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte über 30 min bei 100 V und 70 mA. Anschließend wurde das Gel auf einer UV-Lampe (FluoLink, Bachofer, Reutlingen) mit einem CCD Video Modul (Kaiser) aufgenommen und über BioCapt Software (Version 97.015e) digitalisiert.

**Tabelle 2.2:** Oligonukleotidsequenzen, Produktgröße und Anlagerungstemperatur der verwendeten Primer

PCR-Produkt	Sequenz in Sense und Antisense	Produktgröße in Basenpaare	Anlagerungstemperatur in °C
β-Actin	Sense 5'-GGA CTC CTA TGT GGG TGA CGA GG-3' Antisense 5'-GGG AGA GCA TAG CCC TCG TAG AT-3'	370 bp	64°C
iNOS	Sense 5'-CAC AAG GCC ACA TCG GAT TTC-3' Antisense 5'-TGC ATA CCA CTT CAA CCC AG-3'	741 bp	55°C
TNF-α	Sense 5'-GTG CCT ATG TCT CAG CCT CT-3' Antisense 5'-GCA AAT CGG CTG ACG GTG TG-3'	399 bp	58°C

### **2.3.7 Nachweis des iNOS-Proteins**

Der immunhistochemische Nachweis der iNOS im Lungengewebe wurde an in Paraffin eingebetteten Lungenschnitten vorgenommen. Nach Entparaffinierung der Schnitte wurde zuerst die endogene Peroxidase blockiert (1 ml 30 %iges Wasserstoffperoxid in 60 ml Methanol), dann wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer mit einem polyklonalen Kaninchen-Anti-Maus-iNOS-Antikörper (1:500, Dianova, Hamburg) inkubiert. Anschließend folgte die Detektion der spezifischen Antikörperbindung mittels eines Peroxidase konjugierten Kaninchen-IgG (1:50, Pharmingen, San Diego, Kalifornien, USA) und die Anfärbung mit 3-Amino-9-ethylcarbozol (AEC, Sigma) als Substrat. Zum Nachweis von unspezifischen Bindungen wurden Kontrollanfärbungen entweder ohne 1. Antikörper oder mit normalem Kaninchenserum (DAKO, Glostrup, Dänemark) durchgeführt.

### **2.3.8 Nachweis von Nitrotyrosin**

Der Nachweis von nitrotyrosiliertem Protein im Lungengewebe erfolgte an in Paraffin eingebetteten Lungenschnitten. Nach Entparaffinierung der Schnitte und Blockade der endogenen Peroxidase (siehe Punkt 2.3.7) wurde bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer mit einem polyklonalen Kaninchen-Anti-Nitrotyrosin-Antikörper (1:10, Upstate Biotechnology, Lake Placid, New York, USA) inkubiert. Danach wurde die spezifische Antikörperbindung mittels eines Peroxidase-konjugierten Kaninchen-IgG (1:50, Pharmingen) mit nachfolgender Anfärbung mit ACE als Substrat detektiert. Zum Nachweis von unspezifischen Antikörperbindungen wurden Kontrollfärbungen entweder ohne 1. Antikörper oder mit normalem Kaninchenserum (DAKO) durchgeführt.

### **2.3.9 Densitometrische Auswertung**

Zur Auswertung der PCR-Ergebnisse wurde die Software BIO-1D V.96 (Vilber Lourmat, Marne La Vallée, Frankreich) verwendet. Die Ergebnisse sind als Verhältnis zwischen iNOS und  $\beta$ -Aktin dargestellt.

### **2.3.10 Statistik**

Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) angegeben. Für die statistische Analyse der Unterschiede zwischen den einzelnen Sauerstoffkonzentrationen (21 % O<sub>2</sub>; 60 % O<sub>2</sub>; 100 % O<sub>2</sub>) wurden die Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis und der Mann-Whitney Rangsummentest verwendet, gefolgt von der Korrektur nach Bonferroni. Der Vergleich der Daten von WT- und KO-Gruppen erfolgte mittels Mann-Whitney Rangsummentest. Das Signifikanzniveau lag bei  $p < 0,05$ .

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Körpergewicht und Allgemeinzustand der Mäuse

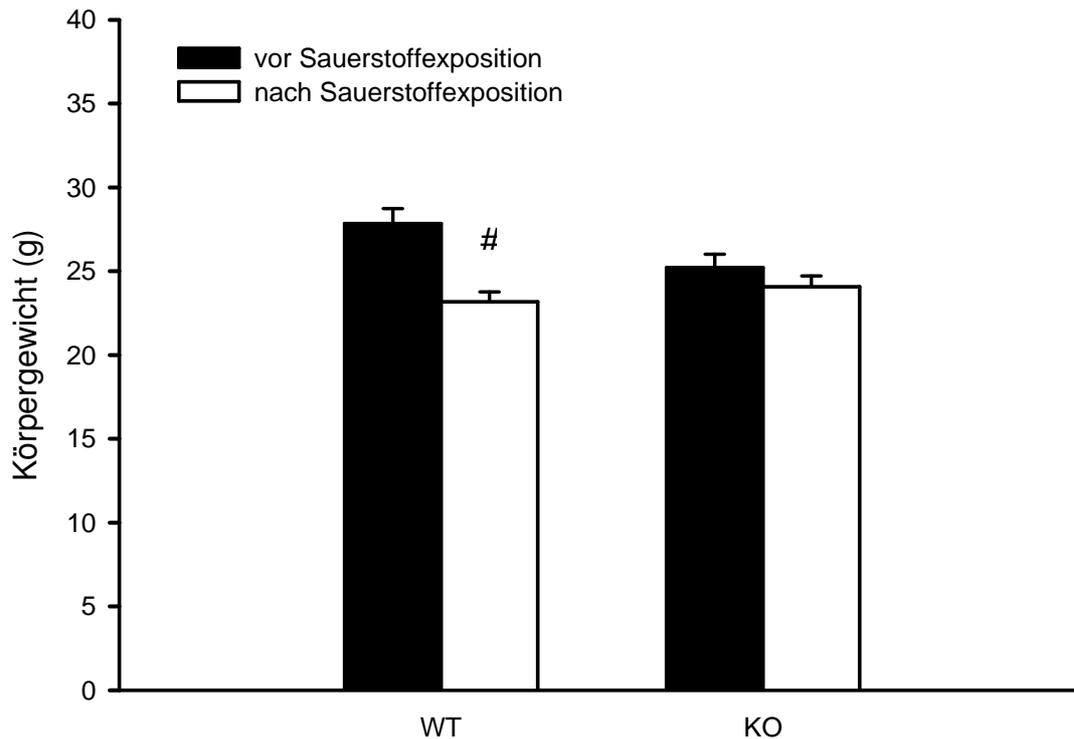
Um zu überprüfen, ob die Exposition mit erhöhten Sauerstoffkonzentrationen einen Einfluss auf das Körpergewicht hat, wurden alle Tiere vor und nach der jeweiligen Exposition gewogen. Im Durchschnitt lag das Körpergewicht der WT-Mäuse, sowie das Körpergewicht der KO-Mäuse unter Kontrollbedingungen vor und nach Exposition (21 % O<sub>2</sub>: 24 und 72 h; n = 14) bei Werten zwischen 26,1 und 27,3 g (Tabelle 3.1).

**Tabelle 3.1:** Körpergewicht der Mäuse unter Kontrollbedingungen (21 % O<sub>2</sub>)

	<i>WT</i>	<i>KO</i>
<i>Vor Exposition (g)</i>	27,3 ± 0,8	26,1 ± 0,5
<i>Nach Exposition (g)</i>	26,9 ± 1,1	27,2 ± 0,5

n = 14 ; Mittelwerte ± SEM

Auch die Exposition mit Sauerstoffkonzentrationen von 60 % bzw. 100 % ergab nach 24 h keine signifikanten Unterschiede, ebenso wie die Exposition unter 60 % nach 72 h (nicht gezeigt). Deutliche Ergebnisse ergaben sich nach 72 h unter 100 % O<sub>2</sub>. Während in der Gruppe der KO-Mäuse keine Änderung des Körpergewichtes zu erkennen war (vor Exposition: 25,2 ± 0,9 g; nach Exposition: 24,1 ± 0,7 g), zeigte sich bei den WT-Mäusen eine signifikante Gewichtsabnahme nach 72 h unter 100 % Sauerstoffexposition (vor Exposition: 27,8 ± 0,9 g; nach Exposition: 23,2 ± 0,6 g). Das Gewicht von WT-Mäusen und KO-Mäusen unterschied sich hierbei ebenfalls nicht signifikant voneinander (Abb. 3.1).



**Abb. 3.1:** Körpergewicht der WT- und KO-Mäuse vor und nach Exposition mit 100 % O<sub>2</sub> für 72 h (n = 7, Mittelwerte ± SEM; <sup>#</sup>p < 0,05 vs. vor Sauerstoffexposition)

Die Beobachtung des Allgemeinzustandes der Tiere ergab vor und nach einer Expositionszeit von 24 h unter allen drei Sauerstoffkonzentrationen, ebenso wie vor und nach einer Expositionszeit von 72 h unter Kontrollbedingungen und 60 % O<sub>2</sub> keine Auffälligkeiten. Im Einklang mit den Ergebnissen der Messung des Körpergewichts vor und nach Exposition befanden sich die Mäuse, vor allem die WT-Mäuse, nach einer Expositionsdauer von 72 h unter 100 % O<sub>2</sub> in einem deutlich reduzierten Allgemeinzustand. Sie zeigten sich lethargisch und reaktionsgemindert, tachy- und dyspnoeisch, die Augen waren matt und glanzlos, das Fell struppig und ungepflegt.

### 3.2 BALF-Parameter

Um zu prüfen, ob sich WT- und KO-Mäuse bereits unter Kontrollbedingungen unterscheiden, wurden exemplarisch folgende BALF-Parameter aller Kontrollgruppen (21 % O<sub>2</sub> für 24 und 72 h; n = 14) ausgewertet: das Volumen der zurückgewonnenen Lavageflüssigkeit (Recovery), die Zellvitalität sowie die Gesamtzellzahl in der BALF (Tabelle 3.2).

**Tabelle 3.2:** BALF-Parameter

	<i>WT</i>	<i>KO</i>
<i>Recovery (ml)</i>	4,7 ± 0,3	4,8 ± 0,1
<i>Vitalität (%)</i>	92,9 ± 0,6	91,8 ± 1,0
<i>Zellzahl (x 10<sup>6</sup>/ml)</i>	0,18 ± 0,02	0,15 ± 0,02

n = 14; Mittelwerte ± SEM

Die Daten belegen, dass sich unter Kontrollbedingungen bei den WT- und KO-Mäusen ähnliche Ausgangswerte bezüglich der Recovery, der Zellvitalität und Gesamtzellzahl in der BALF ergeben und sich somit die einzelnen Ergebnisse unter den jeweiligen Expositionsbedingungen vergleichen lassen.

### 3.3 Vitalität der Zellen

Die Bestimmung der Zellvitalität mittels Trypanblau-Ausschlußverfahren ergab für die WT-Mäuse nach 24 h eine signifikante Senkung der Vitalität unter 100 % O<sub>2</sub>-Exposition im Vergleich zu 21 % O<sub>2</sub> und 60 % O<sub>2</sub>, signifikant auch im Vergleich zur Gruppe der KO-Mäuse. Bei den KO-Mäusen war eine deutliche, aber nicht signifikante Änderung der Zellvitalität nach 24-stündiger Exposition unter allen drei Sauerstoffkonzentrationen nachweisbar. Nach 72 h zeigte sich sowohl bei den WT-Mäusen,

als auch bei den KO-Mäusen eine signifikante Abnahme der Vitalität unter 100 % O<sub>2</sub>-Exposition, während die Vitalität unter Normoxie und unter 60 % O<sub>2</sub> annähernd gleich blieb (Tabelle 3.3).

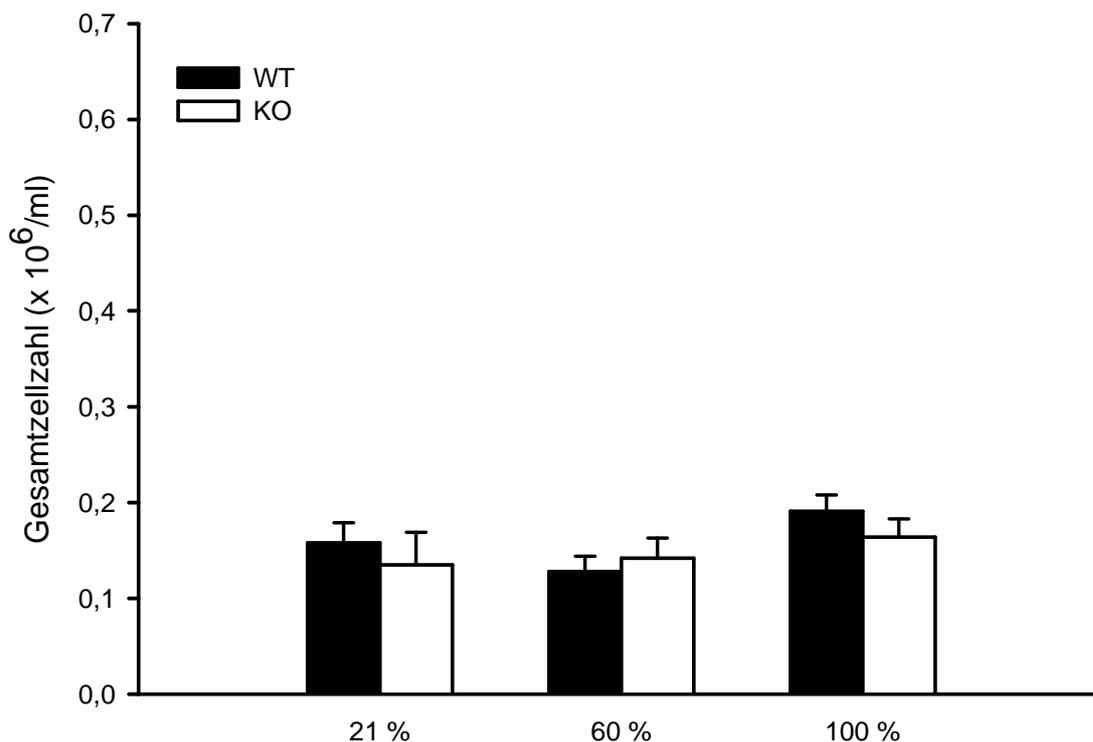
**Tabelle 3.3:** Vitalität der Zellen (%) in der BALF

		<i>WT</i>	<i>KO</i>
<i>21 % O<sub>2</sub></i>	<i>24 h</i>	92,9 ± 0,9	91,0 ± 1,1
	<i>72 h</i>	93,0 ± 1,0	93,9 ± 0,7
<i>60 % O<sub>2</sub></i>	<i>24 h</i>	93,1 ± 1,2	93,6 ± 0,7
	<i>72 h</i>	93,9 ± 1,0	93,9 ± 0,8
<i>100 % O<sub>2</sub></i>	<i>24 h</i>	77,3 ± 1,2 <sup>#*§</sup>	85,6 ± 3,2
	<i>72 h</i>	77,5 ± 2,2 <sup>#*</sup>	82,7 ± 2,4 <sup>#*</sup>

n = 7; Mittelwerte ± SEM; <sup>#</sup>p < 0,05 vs. 21 % O<sub>2</sub>; <sup>\*</sup>p < 0,05 vs. 60 % O<sub>2</sub>; <sup>§</sup>p < 0,05 vs. KO

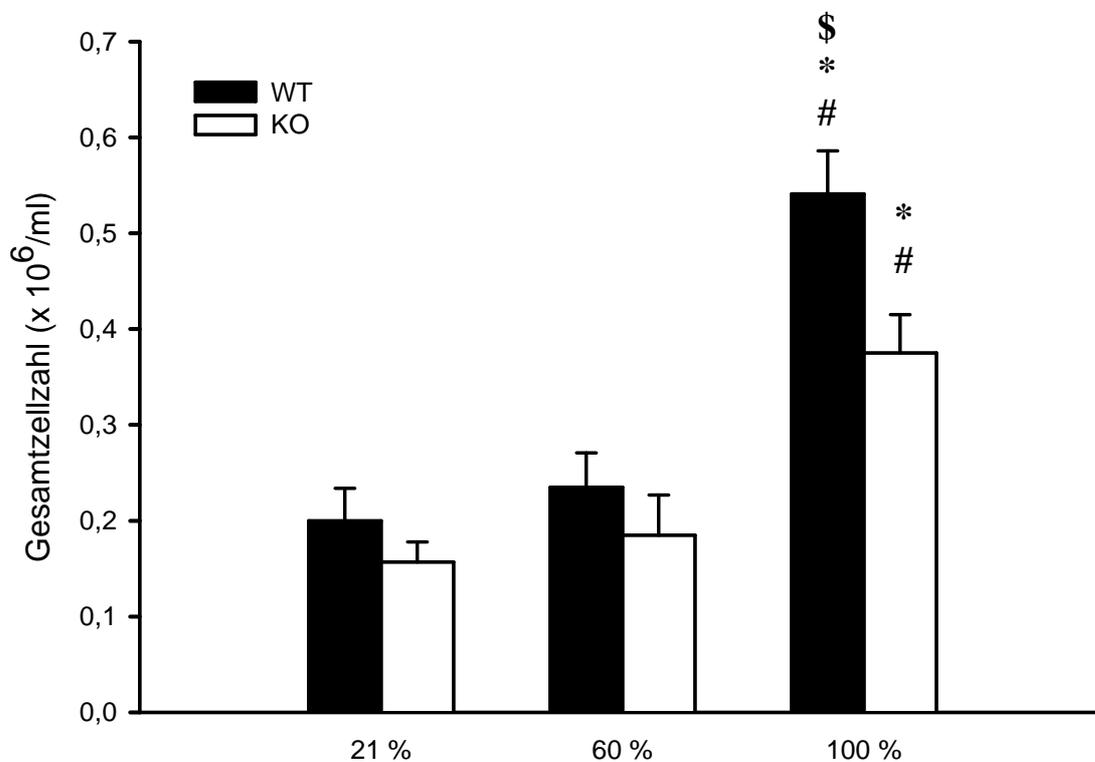
### 3.4 Gesamtzellzahl

Um den Einfluss der Hyperoxie auf die Gesamtzellzahl in der BALF zu untersuchen, wurde diese als Ausdruck einer inflammatorischen Reaktion und einer erhöhten Kapillarpermeabilität mit Hilfe eines Coulter Counters ermittelt und als Zellzahl  $\times 10^6/\text{ml}$  BALF angegeben. Die Ergebnisse der Gesamtzellzahl in der BALF ergaben nach 24 h Expositionsdauer keinen Anstieg unter 100 %  $\text{O}_2$  im Vergleich zur Normoxie sowie zu 60 %iger  $\text{O}_2$ -Exposition. Dies gilt sowohl für die WT-Gruppe (21 %  $\text{O}_2$ :  $0,16 \pm 0,02 \times 10^6/\text{ml}$ ; 60 %  $\text{O}_2$ :  $0,13 \pm 0,02 \times 10^6/\text{ml}$ ; 100 %  $\text{O}_2$ :  $0,19 \pm 0,02 \times 10^6/\text{ml}$ ), als auch für die Gruppe der KO-Mäuse (21 %  $\text{O}_2$ :  $0,14 \pm 0,03 \times 10^6/\text{ml}$ ; 60 %  $\text{O}_2$ :  $0,14 \pm 0,02 \times 10^6/\text{ml}$ ; 100 %  $\text{O}_2$ :  $0,16 \pm 0,02 \times 10^6/\text{ml}$ ; Abb. 3.2).



**Abb. 3.2:** Gesamtzellzahl in der BALF der WT- und KO-Mäuse unter Exposition mit 21 %  $\text{O}_2$ , 60 %  $\text{O}_2$  und 100 %  $\text{O}_2$  für 24 h (n = 7; Mittelwerte  $\pm$  SEM)

Nach 72 h ließ sich unter 60 %iger Exposition bei den WT-Mäusen mit  $0,24 \pm 0,04 \times 10^6/\text{ml}$  kein signifikanter Anstieg der Gesamtzellzahl im Vergleich zur Normoxie nachweisen (21 %  $\text{O}_2$ :  $0,20 \pm 0,03 \times 10^6/\text{ml}$ ). Unter 100 %  $\text{O}_2$  kam es zu einer signifikanten Zunahme der Gesamtzellzahl (100 %  $\text{O}_2$ :  $0,54 \pm 0,05 \times 10^6/\text{ml}$ ). Ähnlich verhielten sich auch die Ergebnisse in der KO-Gruppe: 21 %  $\text{O}_2$ :  $0,16 \pm 0,02 \times 10^6/\text{ml}$ ; 60 %  $\text{O}_2$ :  $0,19 \pm 0,04 \times 10^6/\text{ml}$ ; 100 %  $\text{O}_2$ :  $0,38 \pm 0,04 \times 10^6/\text{ml}$ . Der Anstieg der Gesamtzellzahl in der BALF fiel in der Gruppe der WT-Mäuse signifikant höher aus als in der KO-Gruppe (Abb. 3.3).



**Abb. 3.3:** Gesamtzellzahl in der BALF der WT- und KO-Mäuse unter Exposition mit 21 %  $\text{O}_2$ , 60 %  $\text{O}_2$  und 100 %  $\text{O}_2$  für 72 h (n = 7; Mittelwerte  $\pm$  SEM; #p < 0,05 vs. 21 %  $\text{O}_2$ ; \*p < 0,05 vs. 60 %  $\text{O}_2$ ; \$p < 0,05 vs. KO)

### 3.5 Zelldifferenzierung

Die Zelldifferenzierung in der BALF dient zur Erfassung einer Hyperoxie-induzierten inflammatorischen Reaktion. Eine Auswertung der Zytopräparate ergab für die WT-Mäuse eine signifikante Abnahme der Alveolarmakrophagen zugunsten der Lymphozytenpopulation unter 60 % O<sub>2</sub> bzw. 100 % O<sub>2</sub> nach 24 h. Das Zelldifferential der KO-Mäuse zeigte nach 24 h in allen drei Sauerstoffkonzentrationen keine Änderung. Der Anteil der segmentkernigen Granulozyten und der Lymphozyten blieb in beiden Gruppen unter allen drei Sauerstoffkonzentrationen gering, ebenso lag der Anteil der eosinophilen Granulozyten am Gesamtdifferential konstant unter 1 % (Tabelle 3.4).

**Tabelle 3.4:** BALF-Zelldifferential nach 24 h

	<i>WT (24 h)</i>			<i>KO (24 h)</i>		
	<i>21 %</i>	<i>60 %</i>	<i>100 %</i>	<i>21 %</i>	<i>60 %</i>	<i>100 %</i>
<i>AM (%)</i>	97,7 ± 0,6	95,3 ± 1,2 <sup>#</sup>	91,3 ± 1,1 <sup>#</sup>	94,5 ± 11,4	93,3 ± 1,6	90,2 ± 1,2
<i>Ly (%)</i>	1,9 ± 0,4	3,1 ± 1,1 <sup>#</sup>	6,3 ± 0,9 <sup>#</sup>	3,8 ± 1,1	4,8 ± 1,2	8,2 ± 1,4
<i>Seg (%)</i>	0,4 ± 0,2	1,4 ± 0,3	1,9 ± 0,3 <sup>#</sup>	1,3 ± 0,8	1,8 ± 0,7	1,6 ± 0,7
<i>Eos (%)</i>	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,2	0,5 ± 0,3	0,4 ± 0,4	0,1 ± 0,2	0,0 ± 0,0

n = 7; Mittelwerte ± SEM; <sup>#</sup>p < 0,05 vs. 21 % O<sub>2</sub>

Nach einer Expositionszeit von drei Tagen kam es sowohl bei den WT-, als auch bei den KO-Mäusen erst unter 100 % Sauerstoff zu einer signifikanten Abnahme des Anteils der Alveolarmakrophagen verglichen mit den Werten unter Normoxie und unter 60 % O<sub>2</sub>. Verbunden damit stiegen unter 100 % O<sub>2</sub> die Anteile der Lymphozyten und der segmentkernigen Granulozyten signifikant an. Der Vergleich zwischen WT-

und KO-Mäusen machte auch nach 72 Stunden keine deutliche Änderung in der Zellzusammensetzung sichtbar (Tabelle 3.5).

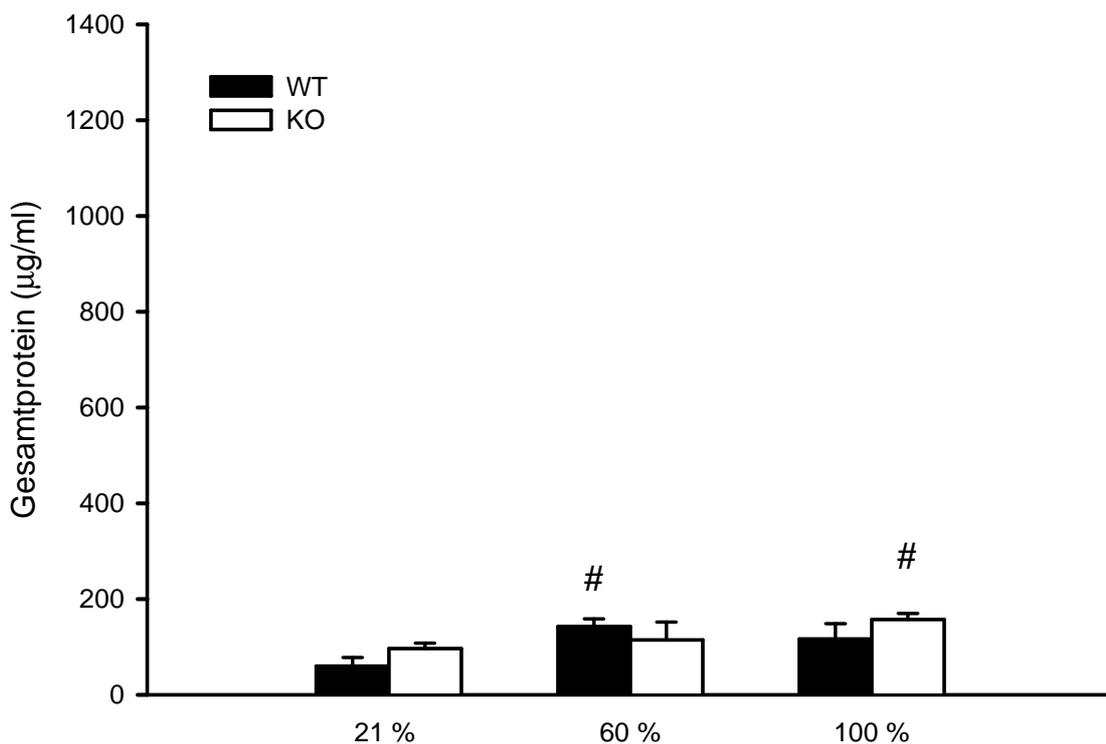
**Tabelle 3.5:** BALF-Zelldifferential nach 72 h

	<i>WT (72 h)</i>			<i>KO (72 h)</i>		
	<i>21 %</i>	<i>60 %</i>	<i>100 %</i>	<i>21 %</i>	<i>60 %</i>	<i>100 %</i>
<i>AM (%)</i>	98,8 ± 0,5	97,7 ± 1,0	86,2 ± 1,8 <sup>#*</sup>	99,0 ± 0,4	98,9 ± 0,5	85,1 ± 2,0 <sup>#*</sup>
<i>Ly (%)</i>	1,2 ± 0,5	2,0 ± 1,0	9,2 ± 0,9 <sup>#*</sup>	0,3 ± 0,2	0,7 ± 0,4	10,0 ± 1,2 <sup>#*</sup>
<i>Seg (%)</i>	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,2	4,6 ± 1,0 <sup>#*</sup>	0,7 ± 0,2	0,4 ± 0,3	4,9 ± 1,3 <sup>#*</sup>
<i>Eos (%)</i>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

n = 7; Mittelwerte ± SEM; <sup>#</sup>p < 0,05 vs. 21 % O<sub>2</sub>; \*p < 0,05 vs. 60 % O<sub>2</sub>

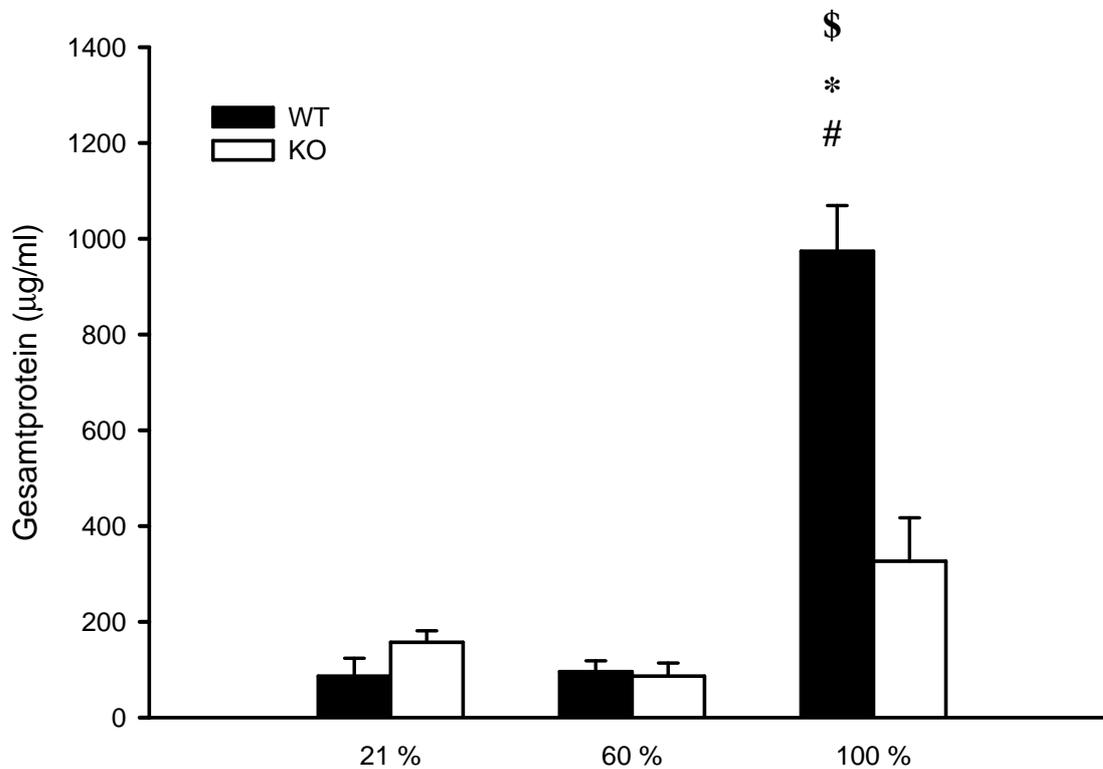
### 3.6 Gesamtprotein-Konzentration

Zur Beurteilung einer Zell- bzw. Gewebeschädigung im Sinne einer mikrovaskulären Permeabilitätsstörung wurde die Gesamtprotein-Konzentration in der BALF bestimmt. Unter hyperoxischer Exposition ließ sich nach 24 h in der WT-Gruppe im Vergleich zur Normoxie (21 % O<sub>2</sub>: 60,0 ± 17,9 µg/ml) ein signifikanter Anstieg der Gesamtprotein-Konzentration induzieren (60 % O<sub>2</sub>: 142,6 ± 15,7 µg/ml; 100 % O<sub>2</sub>: 116,1 ± 32,3 µg/ml). In der KO-Gruppe konnte nach 24 h ebenfalls ein signifikanter Anstieg der Gesamtprotein-Konzentration, verglichen mit normoxischen Bedingungen, verzeichnet werden (21 % O<sub>2</sub>: 96,3 ± 11,1 µg/ml; 60 % O<sub>2</sub>: 114,7 ± 37,2 µg/ml; 100 % O<sub>2</sub>: 157,2 ± 12,5 µg/ml). Es zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich von WT- und KO-Mäusen (Abb. 3.8).



**Abb. 3.8:** Gesamtprotein-Konzentration in der BALF unter 21 % O<sub>2</sub>, 60 % O<sub>2</sub> und 100 % O<sub>2</sub> für 24 h (n = 7; Mittelwerte ± SEM; # p < 0,05 vs. 21 % O<sub>2</sub>)

Nach 72 h kam es unter Kontrollbedingungen sowie auch unter 60 %iger Hyperoxie weder in der WT-Gruppe (21 % O<sub>2</sub>: 86,4 ± 37,3 µg/ml; 60 % O<sub>2</sub>: 95,5 ± 22,8 µg/ml) noch in der KO-Gruppe (21 % O<sub>2</sub>: 157,1 ± 23,7 µg/ml; 60 % O<sub>2</sub>: 86,0 ± 26,6 µg/ml) zu einer signifikanten Änderung der Gesamtprotein-Konzentration.

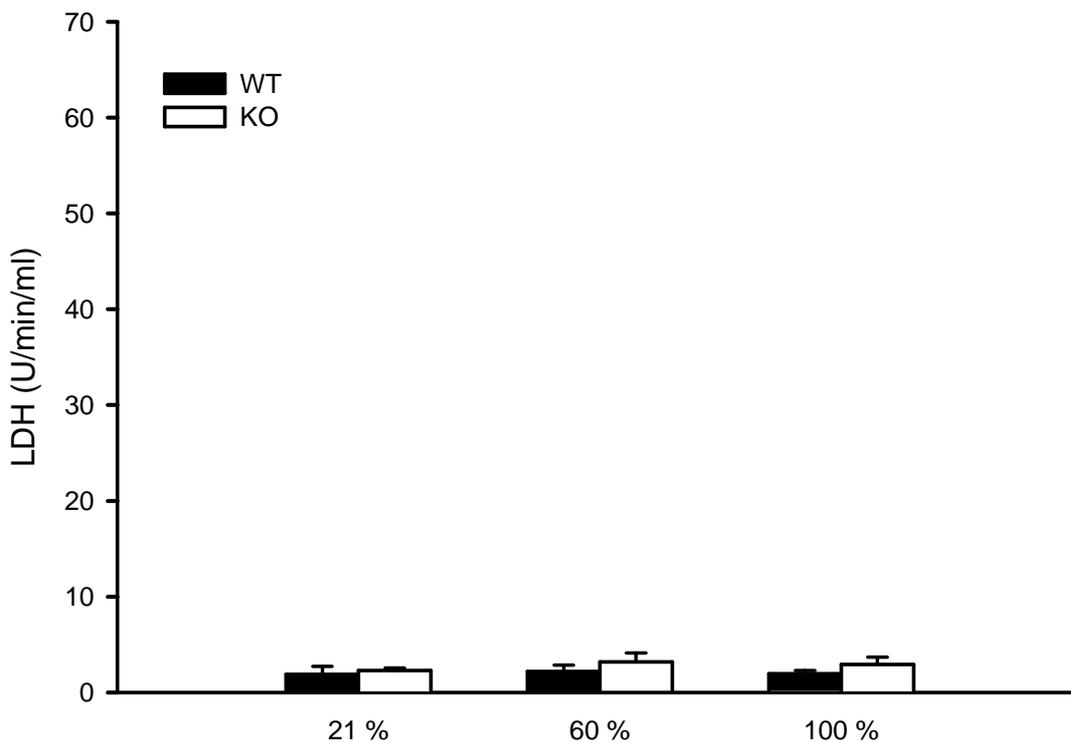


**Abb. 3.9:** Gesamtprotein-Konzentration in der BALF unter 21 % O<sub>2</sub>, 60 % O<sub>2</sub> und 100 % O<sub>2</sub> für 72 h (n = 7; Mittelwerte ± SEM; #p < 0,05 vs. 21 % O<sub>2</sub>; \*p < 0,05 vs. 60 % O<sub>2</sub>; \$p < 0,05 vs. KO)

Dagegen zeigte sich unter 100 % O<sub>2</sub> ein starker Anstieg der Gesamtprotein-Konzentration in beiden Gruppen (WT 100 % O<sub>2</sub>: 973,8 ± 95,7 µg/ml; KO 100 % O<sub>2</sub>: 326,8 ± 90,4 µg/ml). Dieser Anstieg fiel bei den WT-Mäusen signifikant höher aus als bei den KO-Mäusen (Abb. 3.9).

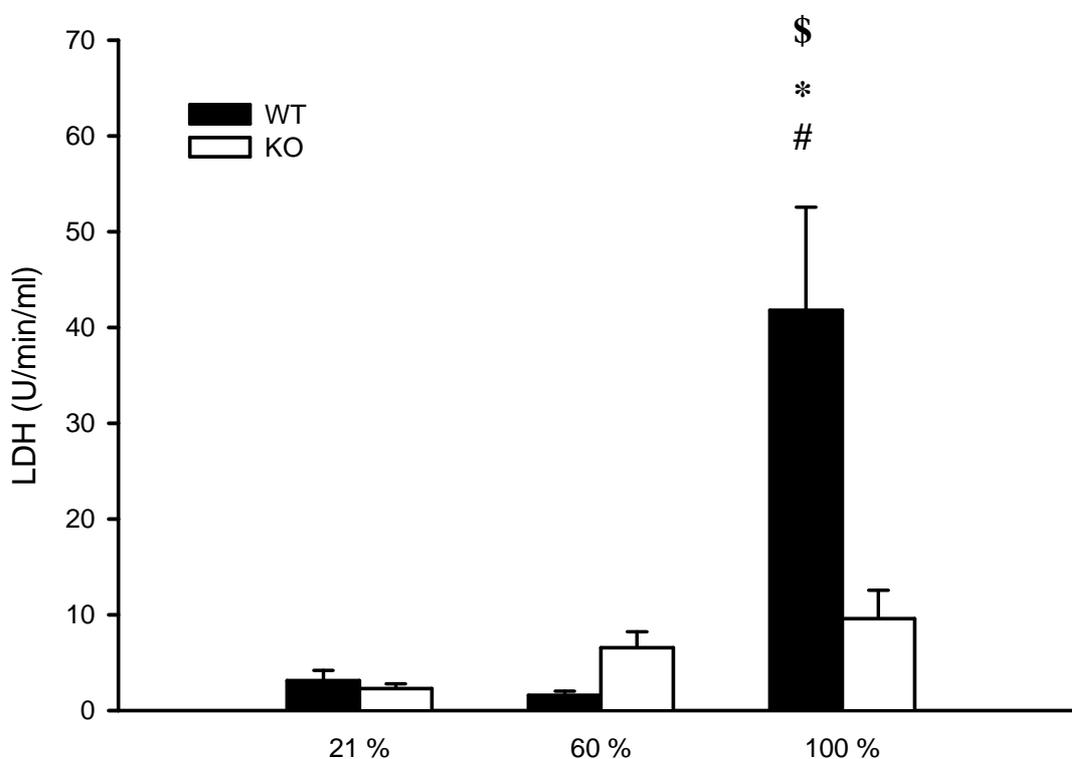
### 3.7 Laktatdehydrogenase-Aktivität

Ein Maß für die Schädigung der Zellen in der BALF und für eine gesteigerte Membranpermeabilität bietet die Messung der LDH-Aktivität. Die LDH-Aktivität in der BALF von WT- und KO-Mäusen war unter Kontrollbedingungen nach 24 h nahezu vergleichbar: WT 21 % O<sub>2</sub>: 1,9 ± 0,8 U/min/ml; KO 21 % O<sub>2</sub>: 2,3 ± 0,3 U/min/ml. Durch die Exposition mit erhöhten Sauerstoffkonzentrationen konnte in der WT-Gruppe keine wesentliche Änderung der LDH-Aktivität induziert werden (60 % O<sub>2</sub>: 2,2 ± 0,7 U/min/ml; 100 % O<sub>2</sub>: 2,0 ± 0,3 U/min/ml). Ebenso konnten in der KO-Gruppe weder unter 60 % O<sub>2</sub> (60 % O<sub>2</sub>: 3,2 ± 0,9 U/min/ml) noch unter 100 % O<sub>2</sub> (100 % O<sub>2</sub>: 2,9 ± 0,8 U/min/ml) deutliche Unterschiede im Vergleich zur Normoxie festgestellt werden (Abb. 3.10).



**Abb. 3.10:** LDH-Aktivität in der BALF unter 21 % O<sub>2</sub>, 60 % O<sub>2</sub> und 100 % O<sub>2</sub> für 24 h (n = 7; Mittelwerte ± SEM)

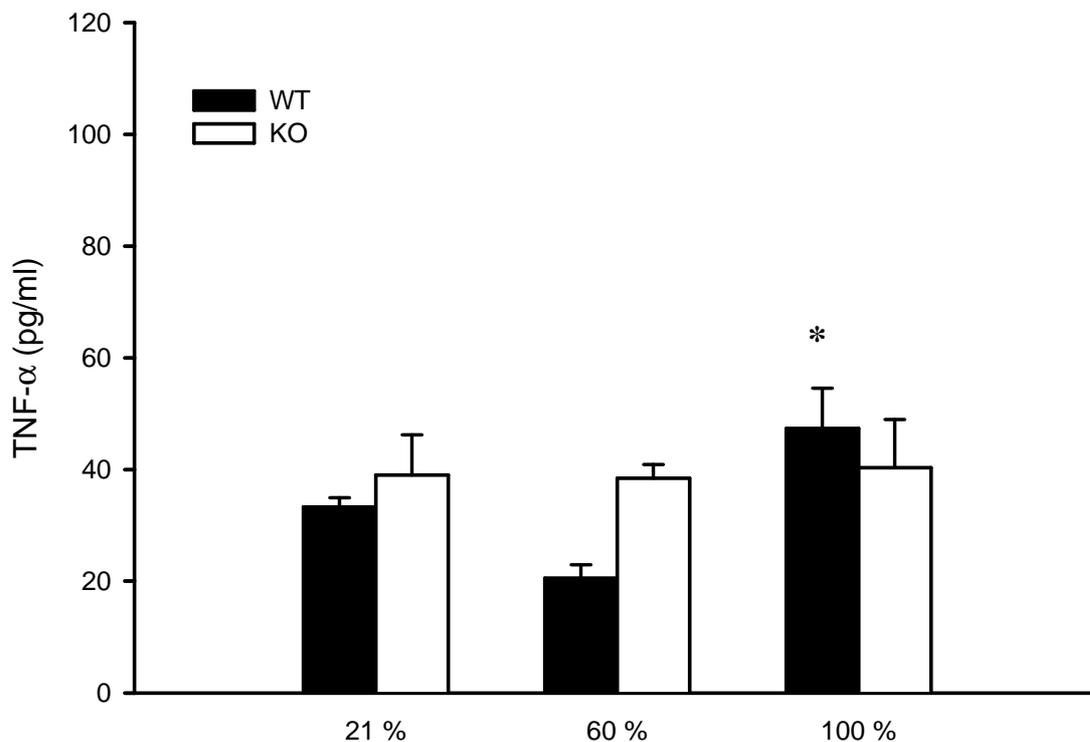
Nach 72 h änderte sich die LDH-Aktivität in der WT-Gruppe unter 60 % O<sub>2</sub>-Exposition mit 1,6 ± 0,4 U/min/ml nicht im Vergleich zur Normoxie (21 % O<sub>2</sub>: 3,1 ± 1,0 U/min/ml), während ihre Aktivität unter 100 % O<sub>2</sub> signifikant auf 41,8 ± 10,8 U/min/ml anstieg, signifikant auch im Vergleich zur KO-Gruppe unter 100 % O<sub>2</sub>. Demgegenüber zeigte sich bei den KO-Mäusen nach 72 h kein Anstieg der LDH-Aktivität (21 % O<sub>2</sub>: 2,3 ± 0,5 U/min/ml; 60 % O<sub>2</sub>: 6,5 ± 1,7 U/min/ml; 100 % O<sub>2</sub>: 9,6 ± 3,0 U/min/ml) (Abb. 3.11).



**Abb. 3.11:** LDH-Aktivität in der BALF unter 21 % O<sub>2</sub>, 60 % O<sub>2</sub> und 100 % O<sub>2</sub> für 72 h (n = 7; Mittelwerte ± SEM; #p < 0,05 vs. 21 % O<sub>2</sub>; \*p < 0,05 vs. 60 % O<sub>2</sub>; \$p < 0,05 vs. KO)

### 3.8 TNF- $\alpha$ -Konzentration

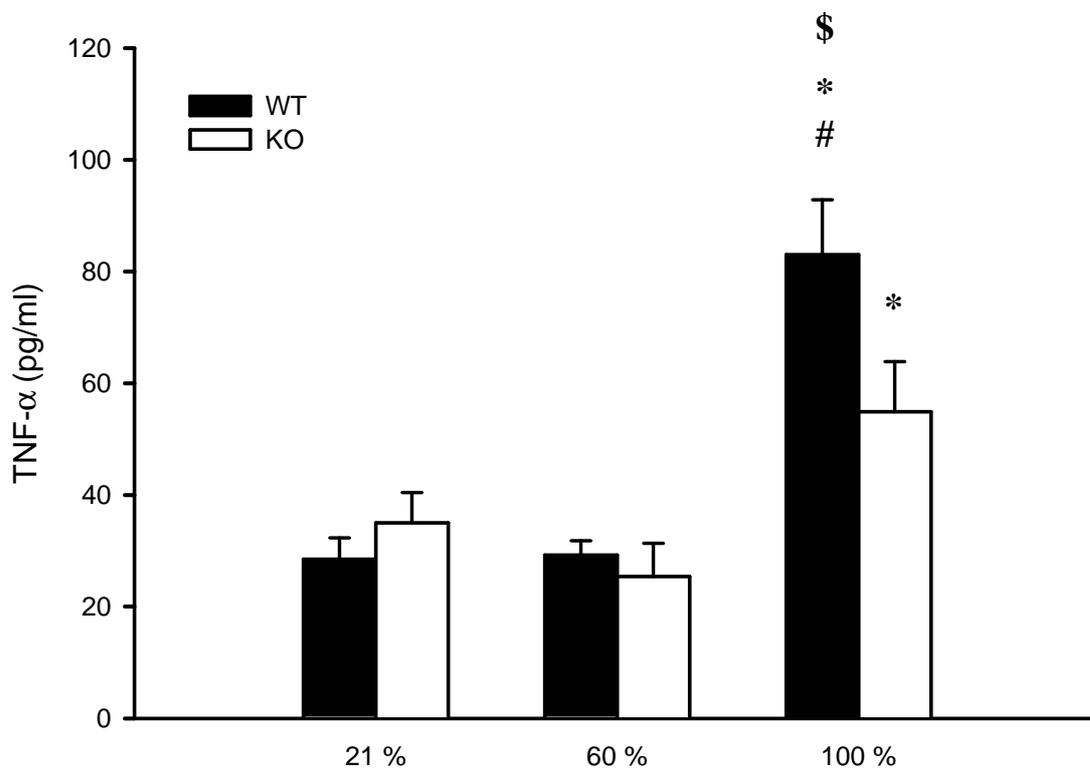
Zur Erfassung einer Zellreaktion im Sinne einer Entzündung wurde die Konzentration des proinflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  in der BALF mittels ELISA erfasst. Nach 24 h Expositionsdauer kam es bei den WT-Mäusen unter 100 % O<sub>2</sub> zu keiner Zunahme der TNF- $\alpha$ -Konzentration (100 % O<sub>2</sub>: 47,3  $\pm$  7,2 pg/ml) im Vergleich zur Normoxie (21 % O<sub>2</sub>: 33,3  $\pm$  1,7 pg/ml) und zu 60 % O<sub>2</sub> (60 % O<sub>2</sub>: 20,5  $\pm$  2,4 pg/ml). In der KO-Gruppe bewirkte die Stimulation mit Sauerstoff ebenfalls keine signifikante Änderung (21 % O<sub>2</sub>: 39,0  $\pm$  7,2 pg/ml; 60 % O<sub>2</sub>: 38,4  $\pm$  2,5 pg/ml; 100 % O<sub>2</sub>: 40,3  $\pm$  8,6 pg/ml; Abb. 3.12).



**Abb. 3.12:** TNF- $\alpha$ -Konzentration in der BALF unter 21 % O<sub>2</sub>, 60 % O<sub>2</sub> und 100 % O<sub>2</sub> für 24 h (n = 7; Mittelwerte  $\pm$  SEM; \*p < 0,05 vs. 60 % O<sub>2</sub>)

Deutlich sind die Ergebnisse nach 72stündiger Expositionsdauer. Bei den WT-Mäusen ergab sich mit 83,0  $\pm$  9,8 pg/ml unter 100 % O<sub>2</sub> ein signifikanter Anstieg der TNF- $\alpha$ -Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 28,5  $\pm$  3,8 pg/ml und 60 %

Sauerstoff-Exposition mit  $29,2 \pm 2,6$  pg/ml. Ebenso war in der Gruppe der KO-Mäuse eine signifikante Zunahme unter 100 % O<sub>2</sub> (100 % O<sub>2</sub>:  $54,9 \pm 9,0$  pg/ml) erkennbar, während die TNF- $\alpha$ -Konzentration unter 60 % O<sub>2</sub> (60 % O<sub>2</sub>:  $25,4 \pm 6,0$  pg/ml) und unter normoxischen Bedingungen (21 % O<sub>2</sub>:  $35,0 \pm 5,4$  pg/ml) annähernd gleich blieb. Die Zunahme in der WT-Gruppe fiel dabei signifikant höher aus als in der KO-Gruppe (Abb. 3.13).



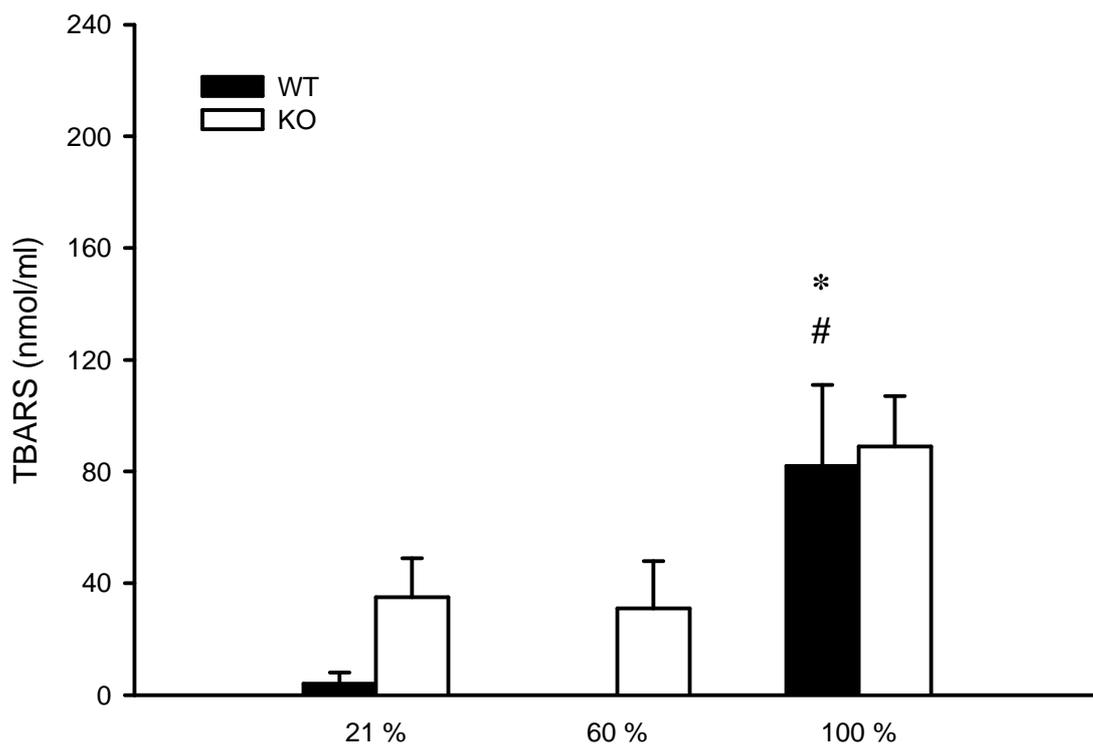
**Abb. 3.13:** TNF- $\alpha$ -Konzentration in der BALF unter 21 % O<sub>2</sub>, 60 % O<sub>2</sub> und 100 % O<sub>2</sub> für 72 h (n = 7; Mittelwerte  $\pm$  SEM; #p < 0,05 vs. 21 % O<sub>2</sub>; \*p < 0,05 vs. 60 % O<sub>2</sub>; \$p < 0,05 vs. KO)

### 3.9 Konzentration der TBARS

Als Ausdruck für die Freisetzung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffmetaboliten im Rahmen einer zellulären Abwehrreaktion wurden als Marker der Lipidperoxidation Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS) in der BALF und im Lungengewebe bestimmt.

#### 3.9.1 BALF

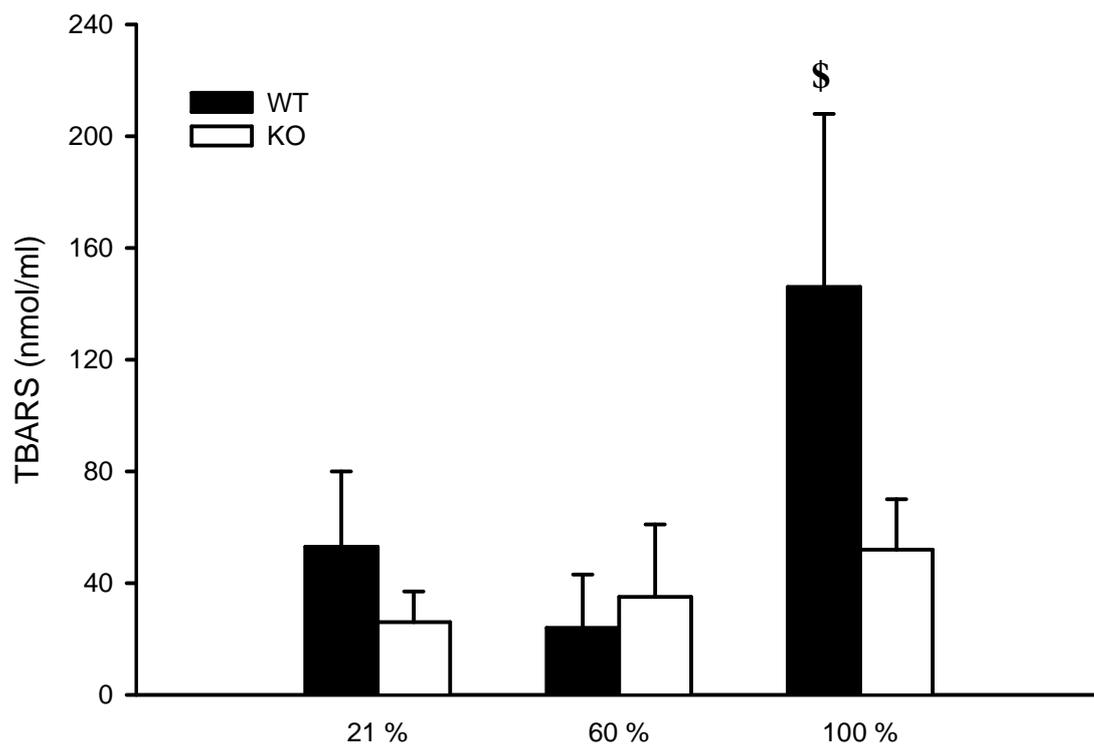
In der BALF der WT-Gruppe konnten nach 24 h unter 21 % O<sub>2</sub> und 60 % O<sub>2</sub> nur geringe Mengen an TBARS nachgewiesen werden (21 % O<sub>2</sub>: 4,0 ± 4,0 nmol/ml; 60 % O<sub>2</sub>: 0,0 ± 0,0 nmol/ml). Unter 100 % O<sub>2</sub>-Exposition kam es zu einem signifikanten Anstieg der Konzentration (100 % O<sub>2</sub>: 82,0 ± 29,0 nmol/ml).



**Abb. 3.14:** TBARS-Konzentration in der BALF unter 21 % O<sub>2</sub>, 60 % O<sub>2</sub> und 100 % O<sub>2</sub> für 24 h (n = 7; Mittelwerte ± SEM; #p < 0,05 vs. 21 % O<sub>2</sub>; \*p < 0,05 vs. 60 % O<sub>2</sub>)

Bei den KO-Mäusen zeigte sich mit  $89,0 \pm 18,0$  nmol/ml keine signifikante Zunahme der TBARS-Konzentration unter 100 % O<sub>2</sub>. Die Konzentrationen unter Normoxie (21 % O<sub>2</sub>:  $35,0 \pm 14,0$  nmol/ml) und unter mäßiger Hyperoxie (60 % O<sub>2</sub>:  $31,0 \pm 17,0$  nmol/ml) waren im Vergleich zur WT- Gruppe bereits leicht erhöht (Abb. 3.14).

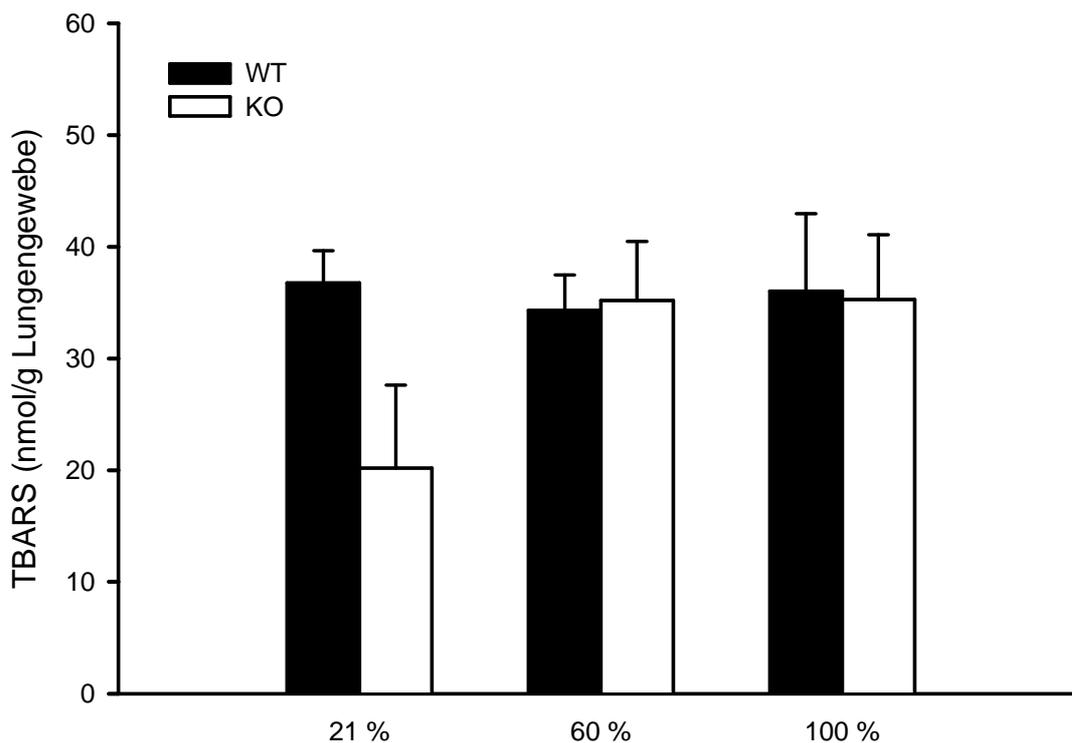
Unter Normoxie ergab sich in der WT-Gruppe nach 72 h eine Konzentration von  $53,0 \pm 27,0$  nmol/ml, unter 60 % iger Hyperoxie war eine TBARS-Konzentration von  $24,0 \pm 19,0$  nmol/ml zu verzeichnen. Zu einer Zunahme der TBARS-Konzentration kam es unter 100 % O<sub>2</sub> (100 % O<sub>2</sub>:  $146,0 \pm 62,0$  nmol/ml); diese Zunahme war signifikant verglichen mit der KO-Gruppe. In der KO-Gruppe ergab sich nach 72 h keine signifikante Änderung der TBARS-Konzentration unter den jeweiligen O<sub>2</sub>-Konzentrationen (21 % O<sub>2</sub>:  $26,0 \pm 11,0$  nmol/ml; 60 % O<sub>2</sub>:  $35,0 \pm 26,0$  nmol/ml; 100 % O<sub>2</sub>:  $52,0 \pm 18,0$  nmol/ml; Abb. 3.15).



**Abb. 3.15:** TBARS-Konzentration in der BALF unter 21 % O<sub>2</sub>, 60 % O<sub>2</sub> und 100 % O<sub>2</sub> für 72 h (n = 7; Mittelwerte  $\pm$  SEM; \$p < 0,05 vs. KO)

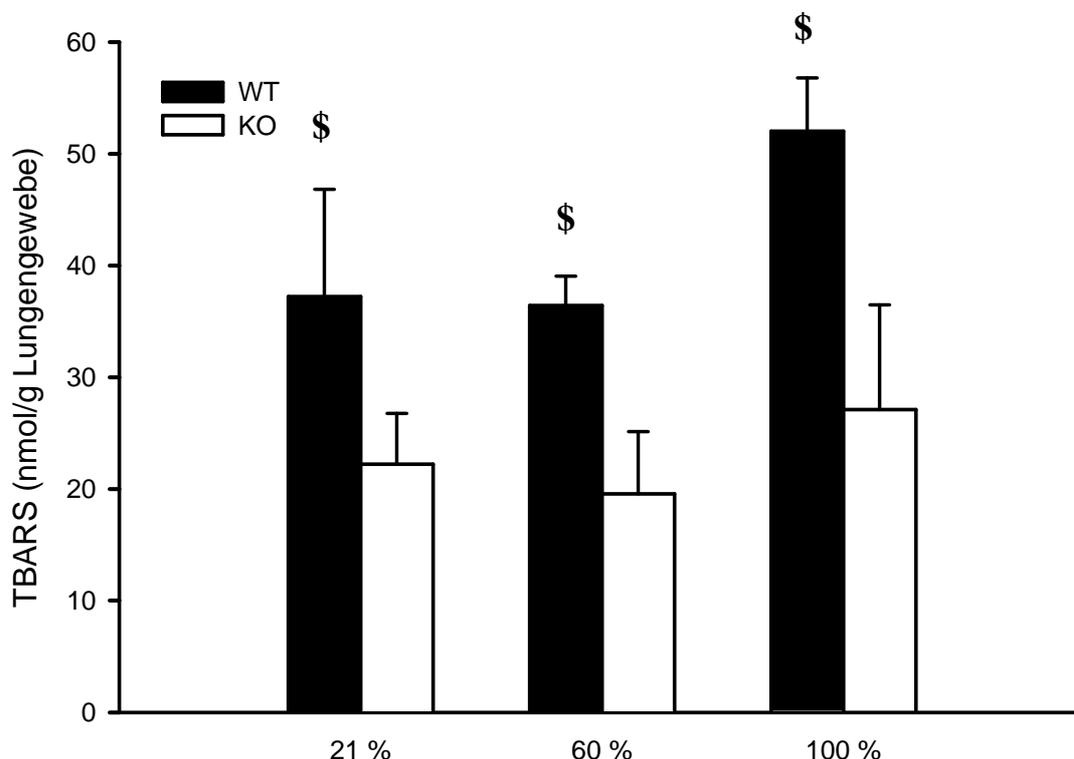
### 3.9.2 Lungengewebe

Bei der Analyse der TBARS-Konzentration im Lungengewebe ergaben sich weder bei den WT- noch bei den KO-Mäusen nach 24 h signifikante Unterschiede. Die Werte unter normoxischen Bedingungen lagen in der WT-Gruppe bei  $36,8 \pm 2,9$  nmol/g Lungengewebe, in der KO-Gruppe bei  $20,2 \pm 7,4$  nmol/g Lungengewebe, unterschieden sich aber nicht signifikant voneinander. Weder unter 60 % O<sub>2</sub> (60 % O<sub>2</sub>:  $34,3 \pm 3,2$  nmol/g Lungengewebe) noch unter 100 % O<sub>2</sub> (100 % O<sub>2</sub>:  $36,0 \pm 6,9$  nmol/g Lungengewebe) ergab sich bei den WT-Mäusen eine signifikante Zunahme. In der Gruppe der KO-Mäuse war ein ebenfalls kein signifikanter Anstieg der TBARS-Konzentrationen unter 60 % O<sub>2</sub> (60 % O<sub>2</sub>:  $35,2 \pm 5,3$  nmol/g Lungengewebe) und unter 100 % O<sub>2</sub> (100 % O<sub>2</sub>:  $35,3 \pm 5,8$  nmol/g Lungengewebe) erkennbar (Abb. 3.16).



**Abb. 3.16:** TBARS-Konzentration im Lungengewebe unter 21 % O<sub>2</sub>, 60 % O<sub>2</sub> und 100 % O<sub>2</sub> für 24 h (n = 7; Mittelwerte ± SEM)

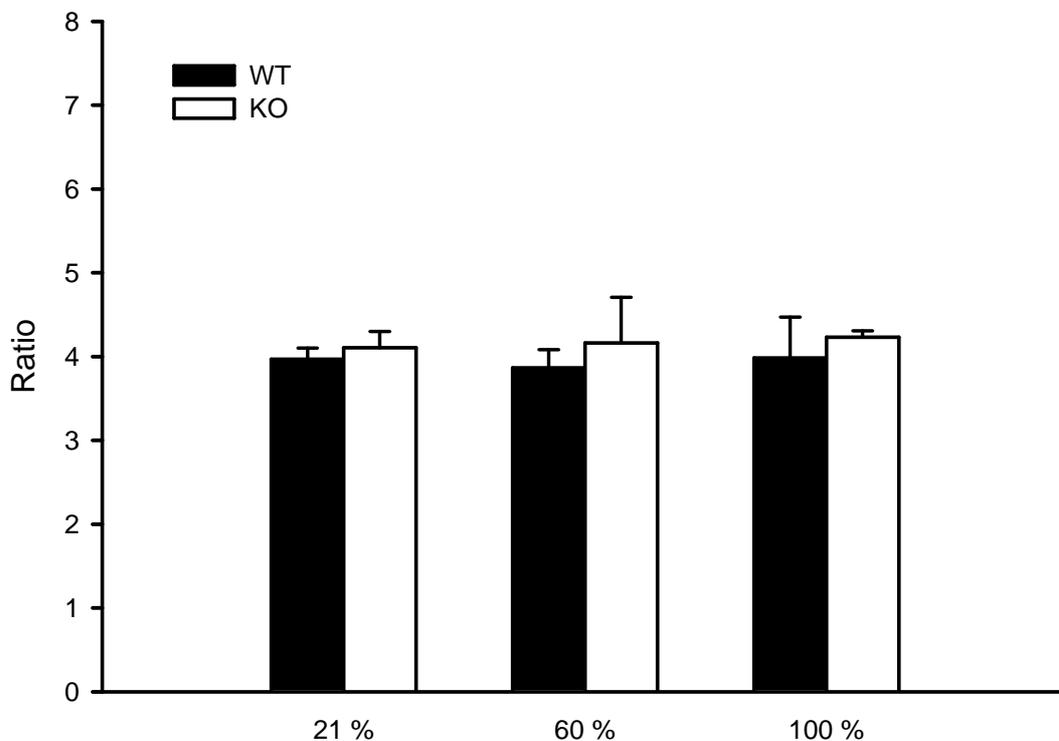
Die Ergebnisse nach 72 h zeigten in der WT-Gruppe unter 100 % O<sub>2</sub> mit 52,0 ± 4,8 nmol/g Lungengewicht keine signifikante Zunahme der TBARS-Konzentration verglichen mit den Werten unter Normoxie (21 % O<sub>2</sub>: 37,2 ± 9,6 nmol TBARS/g Lungengewebe) und der Exposition mit 60 % O<sub>2</sub> (60 % O<sub>2</sub>: 36,4 ± 2,6 nmol/g Lungengewebe). In der KO-Gruppe lag die Konzentration unter Normoxie bei 22,2 ± 4,6 nMol TBARS/g Lungengewebe und unter 60 % O<sub>2</sub> bei 19,6 ± 5,6 nmol/g Lungengewebe. Hier kam es unter 100 %iger Exposition ebenfalls zu keinem signifikanten Anstieg der TBARS-Konzentration (100 % O<sub>2</sub>: 27,1 ± 9,4 nmol/g Lungengewebe; Abb. 3.17). Dennoch zeigte der Vergleich zwischen den WT- und den KO-Mäusen sowohl unter normoxischen Bedingungen, als auch unter 60 % O<sub>2</sub> und 100 % O<sub>2</sub> einen signifikanten Unterschied für die gemessenen TBARS-Konzentrationen.



**Abb. 3.17:** TBARS-Konzentration im Lungengewebe unter 21 % O<sub>2</sub>, 60 % O<sub>2</sub> und 100 % O<sub>2</sub> für 72 h (n = 7; Mittelwerte ± SEM; \$p < 0,05 vs. KO)

### 3.10 Verhältnis von Lungenfeucht- zu Lungentrockengewicht

Als Maß für ein interstitielles Ödem wurde das Verhältnis von Lungenfeucht- zu Lungentrockengewicht (Wet-Dry-Ratio) gravimetrisch ermittelt. Nach 24-stündiger Exposition zeigte sich bei den WT-Mäusen keine signifikante Änderung der Wet-Dry-Ratio unter 100 % O<sub>2</sub> (100 % O<sub>2</sub>: 4,0 ± 0,5) und unter 60 % O<sub>2</sub> (60 % O<sub>2</sub>: 3,9 ± 0,2) im Vergleich zur Normoxie (21 % O<sub>2</sub>: 4,0 ± 0,1). Auch in der KO-Gruppe ergab sich nach 24 h kein signifikanter Anstieg der Wet-Dry-Ratio mit 4,1 ± 0,5 unter 60 % O<sub>2</sub>, bzw. mit 4,2 ± 0,1 unter 100 %iger O<sub>2</sub>-Exposition gegenüber normoxischen

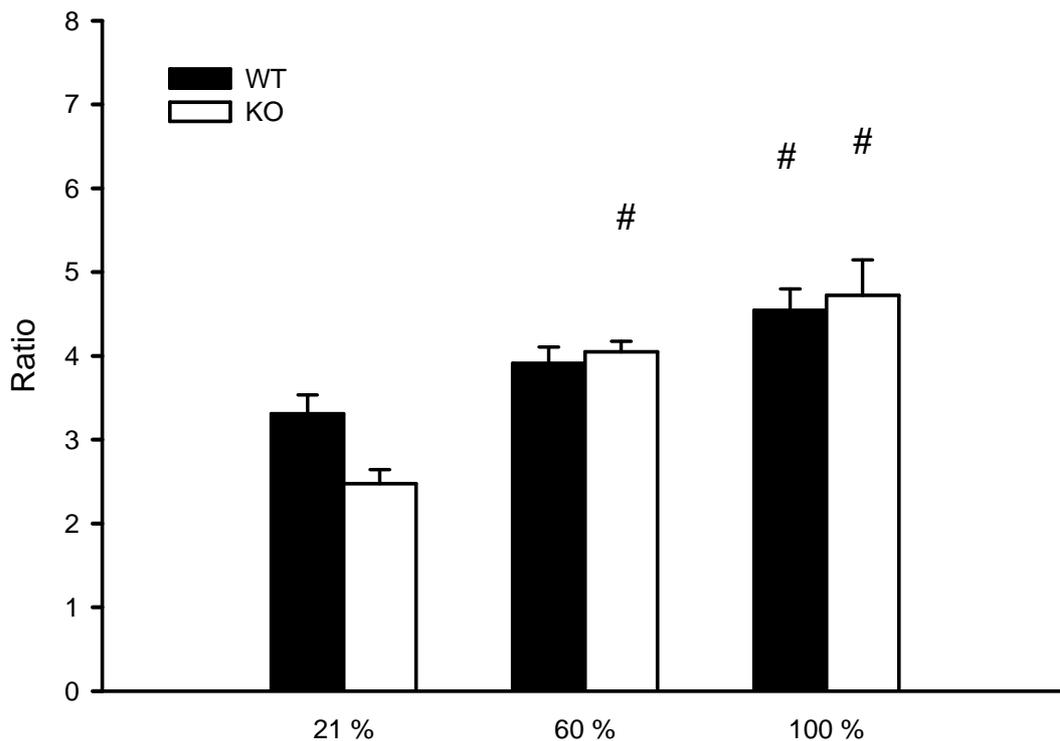


Bedingungen (21 % O<sub>2</sub>: 4,1 ± 0,2; Abb. 3.18).

**Abb. 3.18:** Verhältnis von Lungenfeucht- zu Lungentrockengewicht unter 21 % O<sub>2</sub>, 60 % O<sub>2</sub> und 100 % O<sub>2</sub> für 24 h (n = 7; Mittelwerte ± SEM)

Nach 72 h kam es in der WT-Gruppe mit 3,9 ± 0,2 ebenfalls zu keiner Zunahme der Wet-Dry-Ratio unter 60 % O<sub>2</sub> im Vergleich zu 21 % O<sub>2</sub> (21 % O<sub>2</sub>: 3,3 ± 0,2). Unter

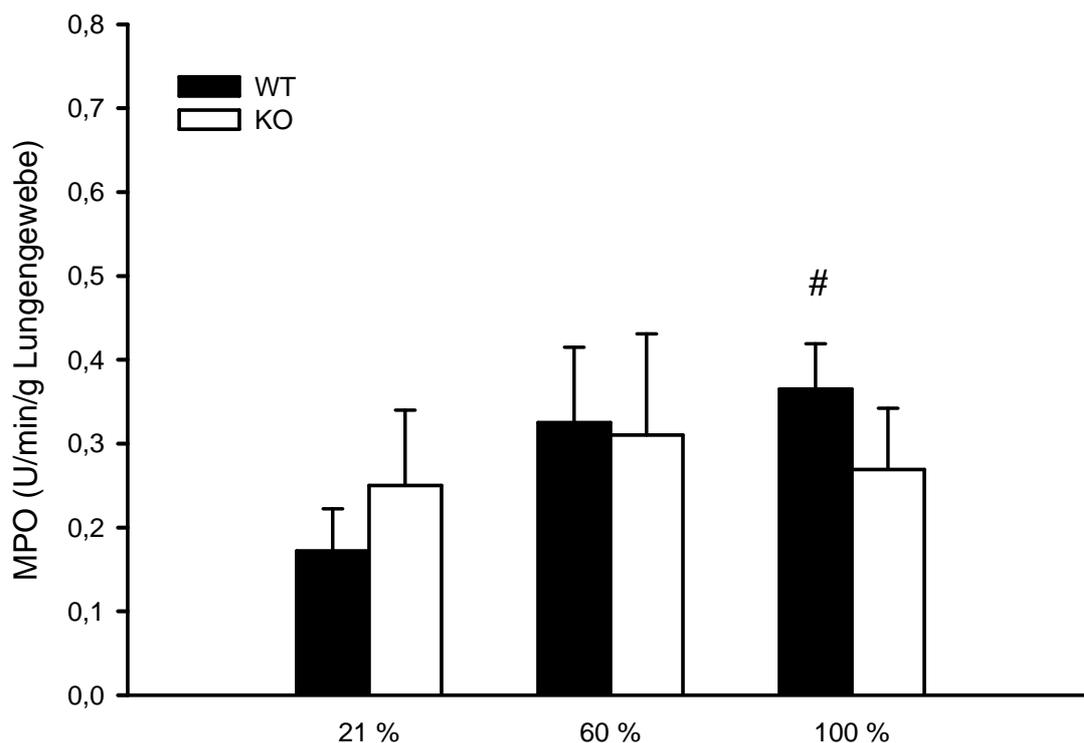
100 % O<sub>2</sub> -Exposition (100 % O<sub>2</sub>: 4,5 ± 0,3) ergab sich für die WT-Mäuse ein signifikanter Anstieg der Wet-Dry-Ratio im Vergleich zur Normoxie. Deutliche Unterschiede waren auch in der Gruppe der KO-Mäuse nach 72 h nachzuweisen. Während das Verhältnis von Lungenfeucht- zu Lungentrockengewicht unter Normoxie bei 2,5 ± 0,2 lag, stieg es unter 60 % O<sub>2</sub> auf 4,0 ± 0,1 bzw. unter 100 % O<sub>2</sub> auf 4,7 ± 0,4 signifikant an (Abb. 3.19).



**Abb. 3.19:** Verhältnis von Lungenfeucht- zu Lungentrockengewicht unter 21 % O<sub>2</sub>, 60 % O<sub>2</sub> und 100 % O<sub>2</sub> für 72 h (n = 7; Mittelwerte ± SEM; #p < 0,05 vs. 21 % O<sub>2</sub>)

### 3.11 Myeloperoxidase-Aktivität

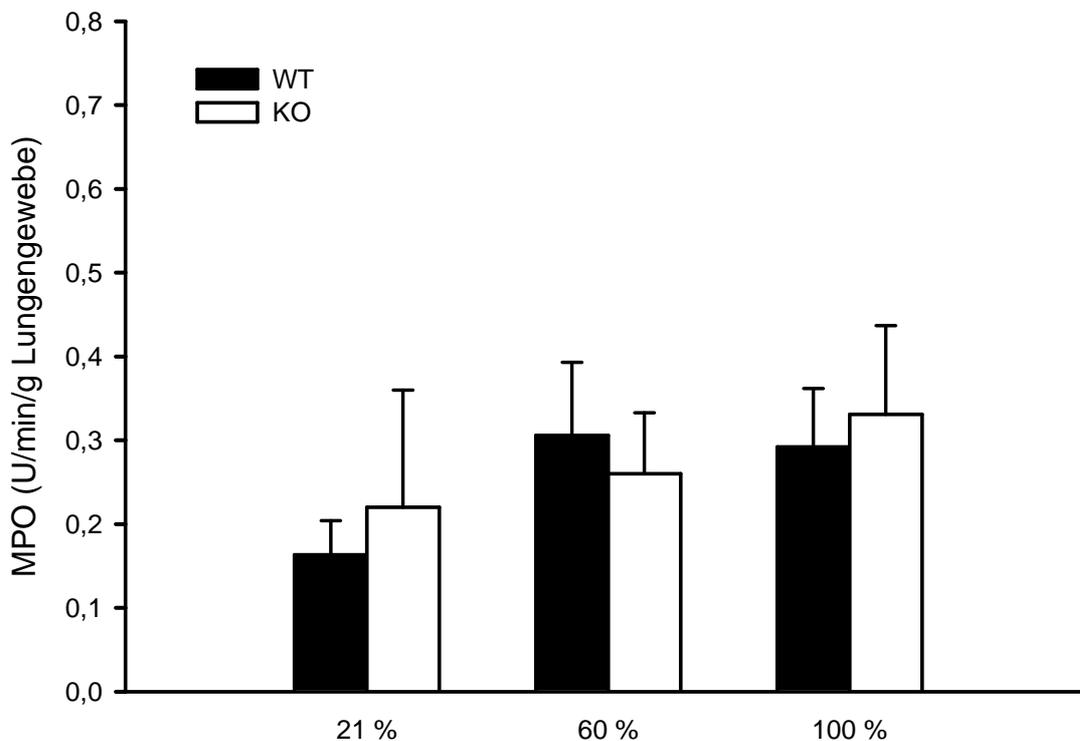
Zur Erfassung einer Granulozyten-Akkumulation in der Lunge wurde die MPO-Aktivität im Lungengewebe bestimmt. In der WT-Gruppe zeigte sich nach 24 h unter 60 % keine (60 % O<sub>2</sub>: 0,33 ± 0,10 U/min/g Lungengewebe), unter 100 %iger O<sub>2</sub>-Exposition eine signifikante Zunahme der MPO-Aktivität (100 % O<sub>2</sub>: 0,37 ± 0,05 U/min/g Lungengewebe) verglichen mit normoxischer Exposition (21 % O<sub>2</sub>: 0,17 ± 0,05 U/min/g Lungengewebe). Bei den KO-Mäusen konnte keine signifikante Zunahme der MPO-Aktivität unter hyperoxischer Exposition nachgewiesen werden (21 % O<sub>2</sub>: 0,25 ± 0,09 U/min/g Lungengewebe; 60 % O<sub>2</sub>: 0,31 ± 0,12 U/min/g Lungengewebe; 100 % O<sub>2</sub>: 0,27 ± 0,07 U/min/g Lungengewebe; Abb. 3.20).



**Abb. 3.20:** Myeloperoxidase-Aktivität unter 21 % O<sub>2</sub>, 60 % O<sub>2</sub> und 100 % O<sub>2</sub> für 24 h (n = 7; Mittelwerte ± SEM; <sup>#</sup>p < 0,05 vs. 21 % O<sub>2</sub>)

Nach dreitägiger Exposition mit Sauerstoff kam es in der WT-Gruppe zu keinem signifikanten Anstieg der MPO-Aktivität unter 60 und 100 % O<sub>2</sub> (60 % O<sub>2</sub>: 0,31 ± 0,09 U/min/g Lungengewebe; 100 % O<sub>2</sub>: 0,29 ± 0,07 U/min/g Lungengewebe). Die Werte unter Normoxie lagen bei 0,16 ± 0,04 U/min/g Lungengewebe.

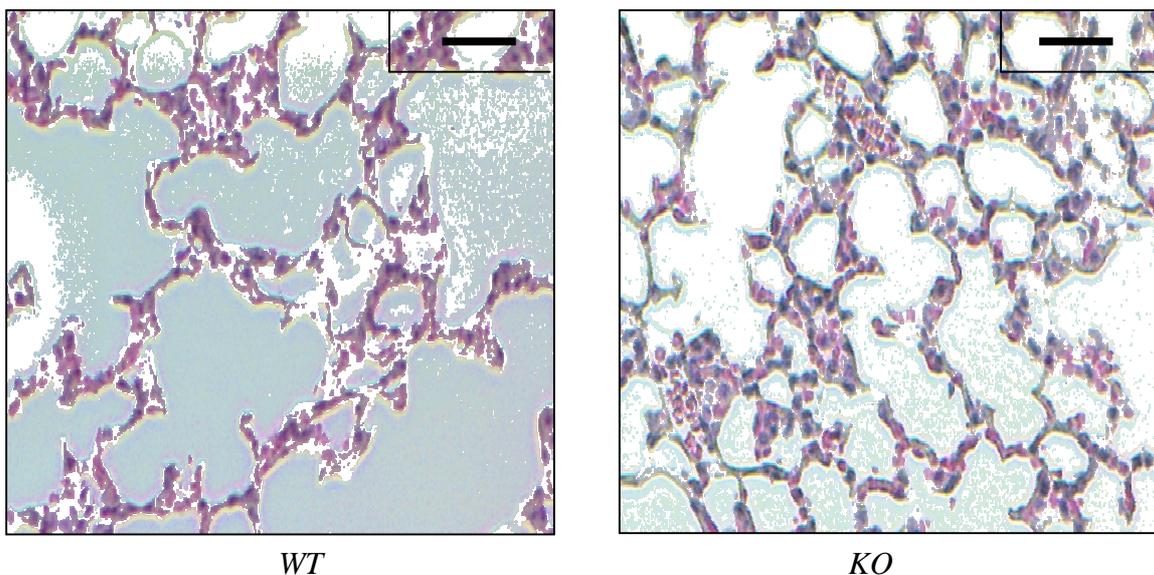
Die Ergebnisse in der KO-Gruppe ergaben unter Normoxie eine Aktivität von 0,22 ± 0,14 U/min/g Lungengewebe. Unter 60 % O<sub>2</sub> (60 % O<sub>2</sub>: 0,26 ± 0,07 U/min/g Lungengewebe), sowie unter 100 % O<sub>2</sub> (100 % O<sub>2</sub>: 0,33 ± 0,11 U/min/g Lungengewebe) zeigte sich ebenfalls keine signifikante Zunahme der MPO-Aktivität (Abb. 3.21).



**Abb. 3.21:** Myeloperoxidase-Aktivität unter 21 % O<sub>2</sub>, 60 % O<sub>2</sub> und 100 % O<sub>2</sub> für 72 h (n = 7; Mittelwerte ± SEM)

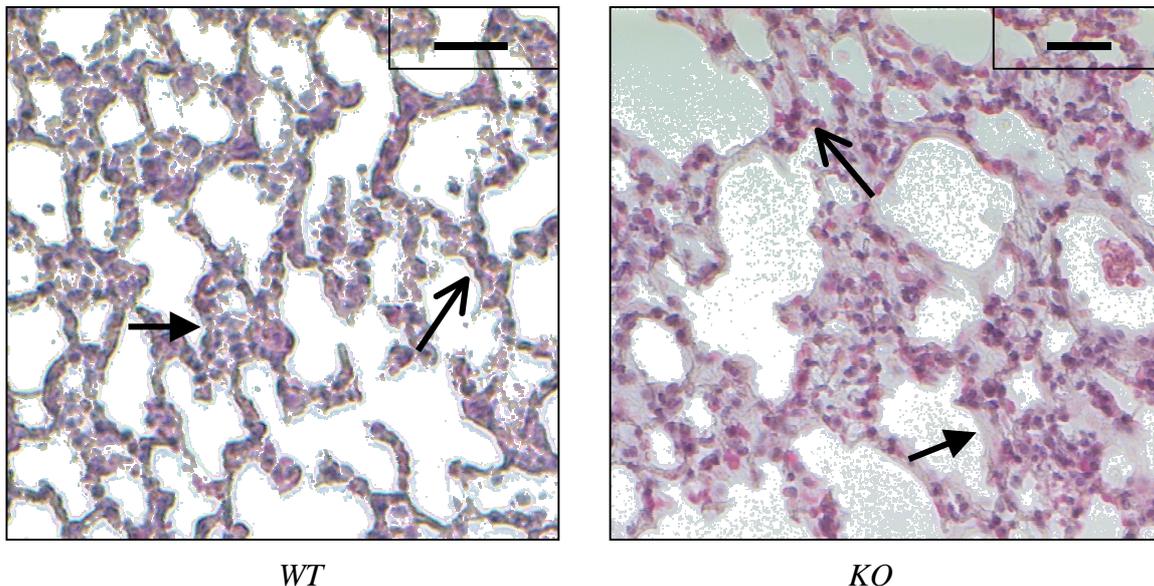
### 3.12 Histologie

Um das Ausmaß des hyperoxischen Lungenschadens beurteilen zu können, wurden histologische Gewebeschnitte angefertigt. Die mikroskopische Untersuchung der Lungenschnitte nach standardisierter Hämatoxylin-Eosin-Färbung ergab sowohl bei den WT-Mäusen, als auch bei den KO-Mäusen unter Kontrollbedingungen das Gesamtbild einer gesunden Lunge. Abb. 3.22 zeigt exemplarisch einen Ausschnitt aus dem Lungengewebe einer WT- und einer KO-Maus unter normoxischen Bedingungen. Zu sehen ist das Alveolarnetz der Lungenperipherie mit den dünnen Alveolarsepten sowie regelrechtes Bronchialepithel. Leukozyten als Anzeichen für eine bestehende Entzündung sind weder bei den WT- noch bei den KO-Mäusen zu erkennen.



**Abb. 3.22:** Exemplarische Darstellung des Lungengewebes von WT- und KO-Mäusen ( $n = 7$ ) unter Kontrollbedingungen (21 %  $O_2$ ). Die lichtmikroskopischen Aufnahmen (Originalvergrößerung  $\times 400$ ; Hämatoxylin-Eosin-Färbung) zeigen einen Normalbefund. Die Länge des in den rechten Bildrand eingeblendeten Balkens entspricht 25  $\mu\text{m}$ .

Die hyperoxische Exposition (60 % und 100 % O<sub>2</sub>) ergab nach 24 h keine deutlichen, histologisch erkennbaren Veränderungen im Lungenparenchym, weder in der Gruppe der WT-Mäuse noch bei den KO-Mäusen (nicht gezeigt). Auch nach 72 h unter 60 % O<sub>2</sub> war allenfalls eine geringfügige Verdickung der Alveolarsepten im Lungengewebe der WT-, wie auch im Lungengewebe der KO-Mäuse zu erkennen (nicht gezeigt). Nach 72 h und 100 % O<sub>2</sub> zeigte sich dann ein ausgeprägter Lungenschaden, sowohl bei den WT-Mäusen, als auch bei den KO-Mäusen. Es kam zur Ausbildung eines interstitiellen Ödems, in Abb. 3.23 zu erkennen als deutliche Verbreiterung der Alveolarsepten und des Brochchialwandepithels, zu einer verstärkten Bildung von Atelektasen, sowie zu einem vermehrten Influx von Entzündungszellen interstitiell und auch alveolär. Hyaline Membranen sind zu diesem Zeitpunkt noch nicht nachweisbar. Das Ausmaß des hyperoxischen Lungenschadens zeigt nach 72 h in der Histologie noch keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich von WT- und KO-Mäusen.



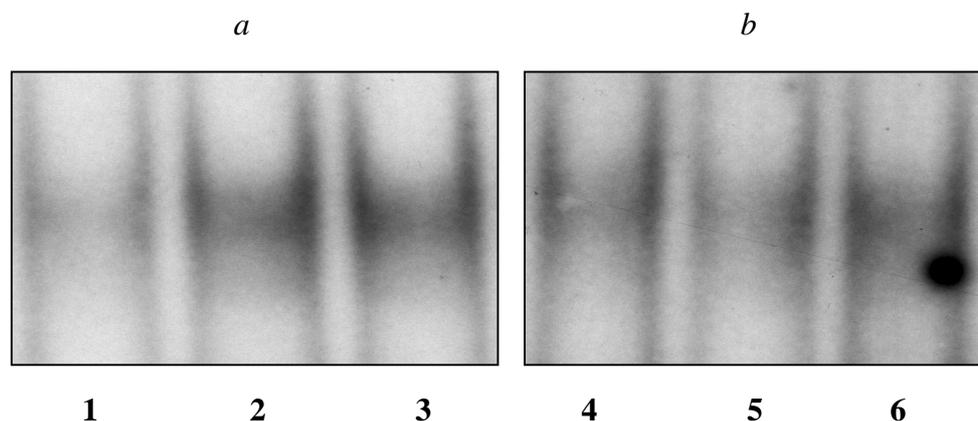
**Abb. 3.23:** Exemplarische Darstellung des Lungengewebes von WT- und KO-Mäusen (n = 7) unter 100 % O<sub>2</sub> für 72 h. Das histologische Präparat (Originalvergrößerung x 400; Hämatoxylin-Eosin-Färbung) zeigt deutlich ödematös aufgequollene Alveolarsepten ( → ), eine verstärkte Atelektasenbildung ( → ), sowie eine Extravasation von Entzündungszellen. Hyaline Membranen sind zu diesem Zeitpunkt noch nicht nachweisbar. Die Länge des in den rechten Bildrand eingblendeten Balkens entspricht 25 µm.

### 3.13 Aktivierung der Transkriptionsfaktoren

Der Nachweis der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 erfolgte mittels EMSA-Analysen in Kooperation mit Herrn Dr. Kupatt von der Medizinischen Klinik I im Klinikum der Universität München-Großhadern.

#### 3.13.1 NF- $\kappa$ B

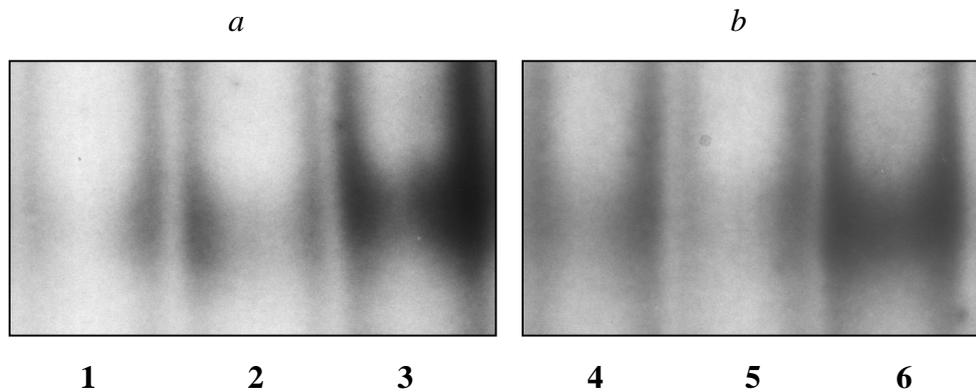
Unter Kontrollbedingungen, sowie unter hyperoxischer Exposition war sowohl bei den WT-Mäusen, als auch bei den KO-Mäusen nach 24 h allenfalls eine geringfügige NF- $\kappa$ B-Bindungsaktivität im Kern nachweisbar (nicht gezeigt). Auch nach 72 h war unter Kontrollbedingungen bei den WT-Mäusen, wie auch bei den KO-Mäusen nur wenig Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B zu erkennen. In Anwesenheit von erhöhten Sauerstoffkonzentrationen kam es nach einer Expositionszeit von 72 h zu einer deutlichen Zunahme der NF- $\kappa$ B-Aktivität, die bei den WT-Mäusen stärker ausgeprägt war als bei den KO-Mäusen (Abb. 3.24).



**Abb. 3.24:** NF- $\kappa$ B: EMSA einer WT- (a) und KO-Maus (b) unter 21 % O<sub>2</sub> (Banden 1 und 4), 60 % O<sub>2</sub> (Banden 2 und 5) und 100 % O<sub>2</sub> (Banden 3 und 6) nach 72 h

### 3.13.2 AP-1

Die Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 ergab bei den WT- und KO-Mäusen nach 24 h unter hyperoxischer Exposition nur eine leichte Zunahme im Vergleich zu normoxischen Bedingungen (nicht gezeigt). AP-1 war nach 72 h ebenfalls in beiden Gruppen unter Normoxie nur schwach aktiviert. Unter Hyperoxie, vor allem unter 100 % O<sub>2</sub>, kam es zu einem deutlichen Anstieg der Bindungsaktivität von AP-1, welcher in der Gruppe der WT-Mäuse etwas stärker ausfiel als in der Gruppe der KO-Mäuse (Abb. 3.25).



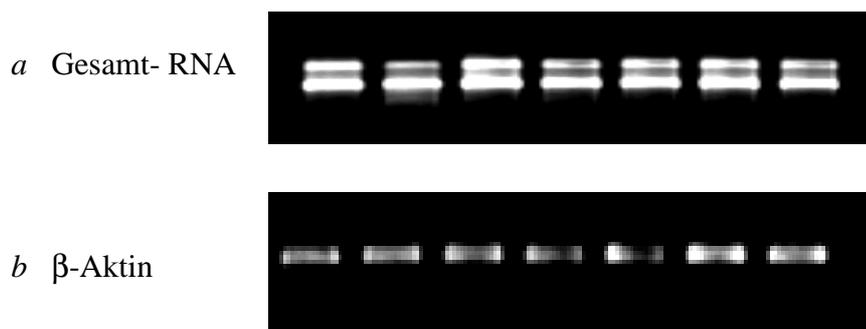
**Abb. 3.25:** AP-1: EMSA einer WT- (a) und KO-Maus (b) unter 21 % O<sub>2</sub> (Banden 1 und 4), 60 % O<sub>2</sub> (Banden 2 und 5) und 100 % O<sub>2</sub> (Banden 3 und 6) nach 72 h

### 3.14 iNOS- und TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression

#### 3.14.1 Haushaltsgen $\beta$ -Aktin

Zunächst wurde überprüft, ob der Isolierungsprozess der Gesamt-RNA ohne deren Degradierung erfolgt war. Die typischen Doppelbanden in der Gelelektrophorese der RNA belegen dies (Abb. 3.26 a).

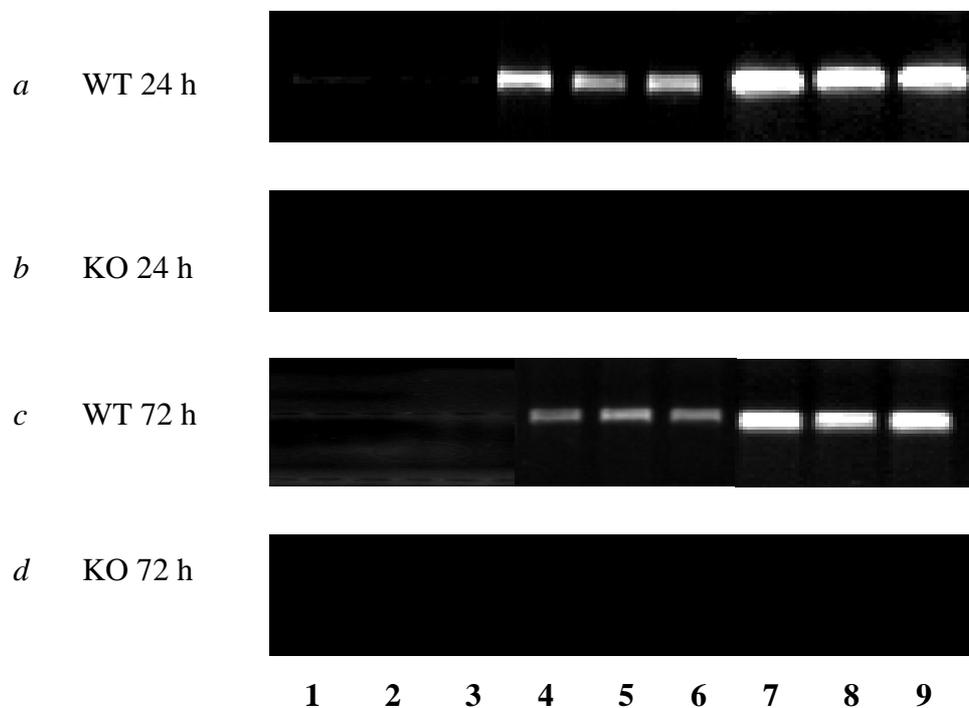
Um zu kontrollieren, ob für alle Proben jeweils die gleiche Menge an RNA eingesetzt wurde, dient der Nachweis der Expression eines Haushaltsgens. Haushaltsgene sind Gene, die zur Aufrechterhaltung der basalen Funktionen einer Zelle im Allgemeinen mit gleichbleibender Geschwindigkeit transkribiert werden. Man bezeichnet dies auch als konstitutive Transkription. Die Transkription von regulierten Genen kann im Gegensatz dazu um Größenordnungen variieren. In unserem Fall wurde  $\beta$ -Aktin als Haushaltsgen verwendet. Abb. 3.26 b zeigt exemplarisch das Gel der RT-PCR einer Gruppe unter 100 % O<sub>2</sub>-Exposition. Nach 27 Zyklen war kein Einfluss der Hyperoxie zu erkennen, die  $\beta$ -Aktin-Expression kann daher als interne Kontrolle dienen.



**Abb. 3.26:** Elektrophorese der Gesamt-RNA (a) und RT-PCR des Haushaltsgens  $\beta$ -Aktin (b) am Beispiel einer Gruppe unter 100 % O<sub>2</sub>-Exposition

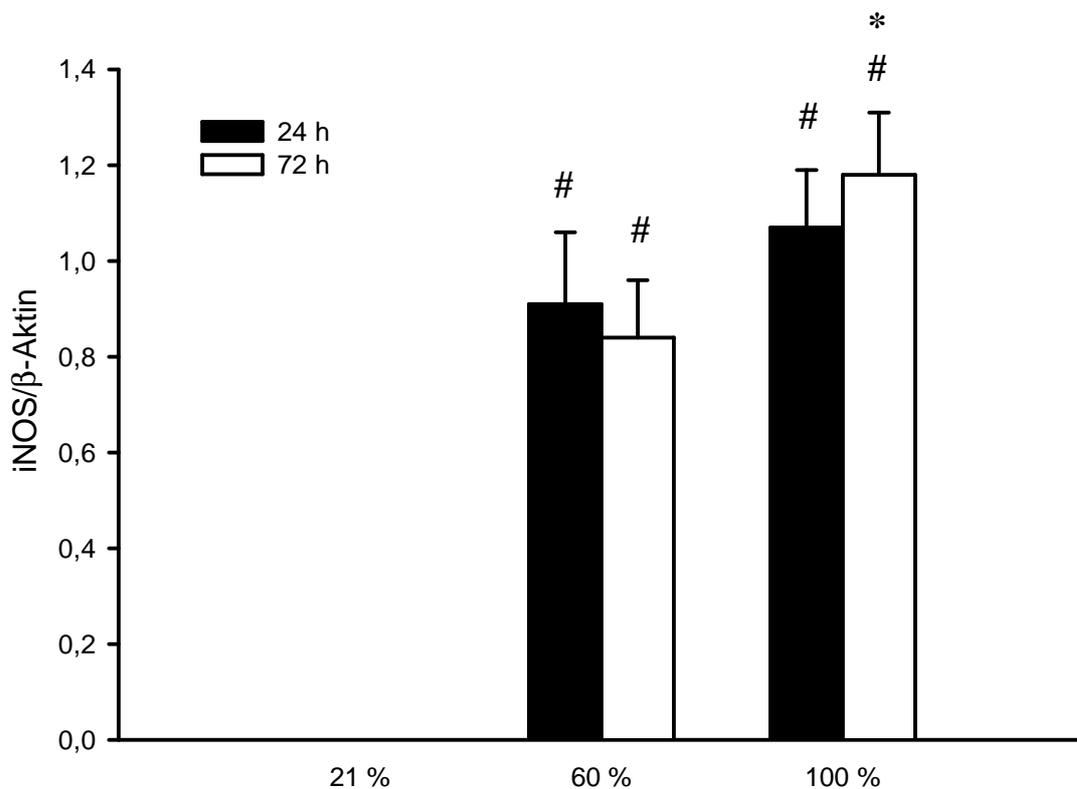
### 3.14.2 iNOS-mRNA-Expression

Die Exposition unter 100 % O<sub>2</sub> ergab bei den WT-Mäusen nach 24 h eine deutlich stärkere iNOS-mRNA-Expression im Vergleich zur 60 % O<sub>2</sub>-Exposition (Abb. 3.27 a). Auch nach 72 h zeigte sich eine deutlich erhöhte iNOS-mRNA-Expression unter 100 % O<sub>2</sub> gegenüber der Exposition mit 60 % O<sub>2</sub> (Abb. 3.27 c). Unter normoxischen Bedingungen war die iNOS bei den WT-Mäusen nicht exprimiert. In den Gruppen der KO-Mäuse war weder nach 24 h noch nach 72 h eine iNOS-mRNA-Expression zu erkennen (Abb. 3.27 b und d).



**Abb. 3.27:** Expression der iNOS-mRNA nach 35 Zyklen. Banden 1 - 3: 21 % O<sub>2</sub>; Banden 4 - 6: 60 % O<sub>2</sub>; Banden 7 - 9: 100 % O<sub>2</sub>

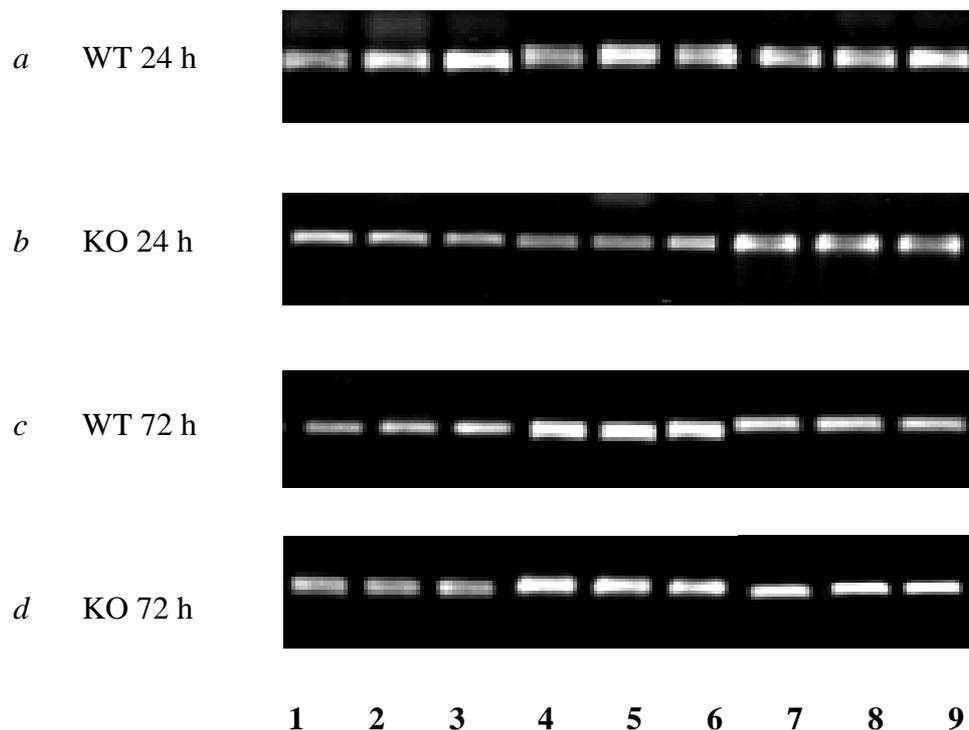
Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung sind als Verhältnis zwischen iNOS und  $\beta$ -Aktin dargestellt (Abb. 3.28). Die RT-PCR (30 Zyklen) zeigt in allen Kontrollgruppen keine iNOS-Expression. Nach 24 h zeigt sich unter 60 % O<sub>2</sub> eine signifikante Expression des iNOS-Gens (60 % O<sub>2</sub>: 0,91  $\pm$  0,15), die unter 100 % O<sub>2</sub> (100 % O<sub>2</sub>: 1,07  $\pm$  0,12) noch zunimmt. Die Exposition unter erhöhten Sauerstoffkonzentrationen ergab nach 72 h einen signifikant stärkeren Anstieg unter 100 % O<sub>2</sub> (100 % O<sub>2</sub>: 1,18  $\pm$  0,13) im Vergleich zur Exposition mit 60 % O<sub>2</sub> (60 % O<sub>2</sub>: 0,84  $\pm$  0,12).



**Abb. 3.28:** Densitometrische Analyse der RT-PCR Ergebnisse des iNOS-Gens nach 30 Zyklen (n = 7; Mittelwerte  $\pm$  SEM; #p < 0,05 vs. 21 % O<sub>2</sub>; \*p < 0,05 vs. 60 % O<sub>2</sub>)

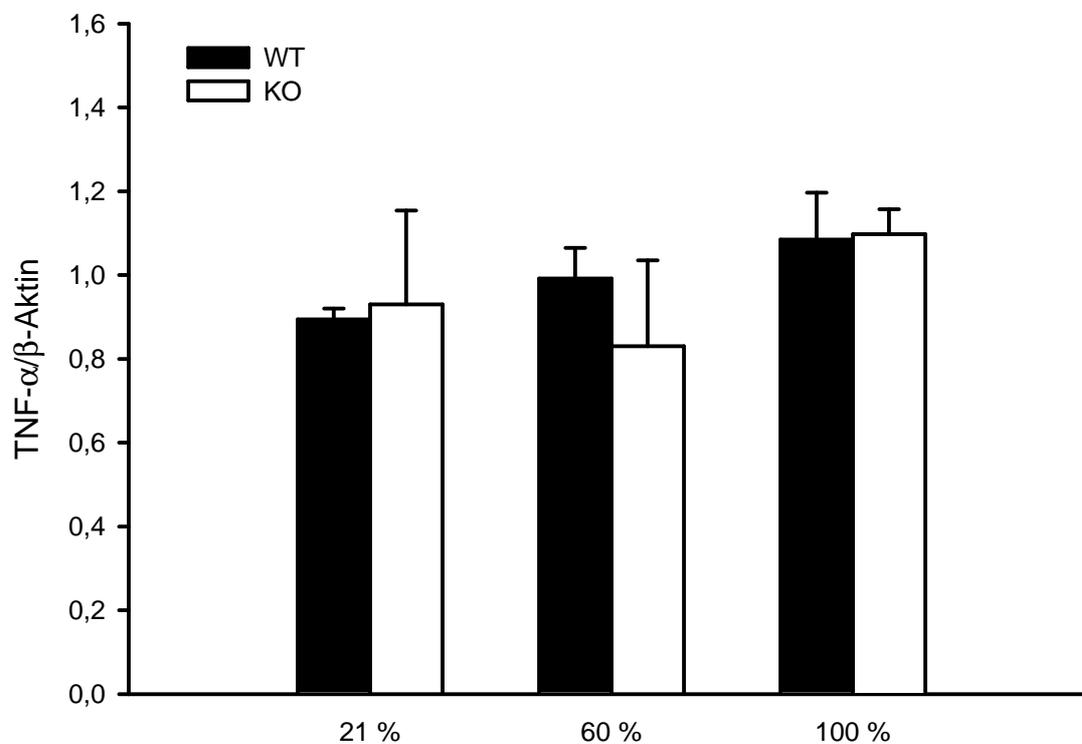
### 3.14.3 TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression

Die TNF- $\alpha$ -mRNA war schon unter Normoxie bei den WT- wie auch bei den KO-Mäusen exprimiert. In der WT-Gruppe zeigte sich nach 24stündiger Sauerstoff-Exposition unter Hyperoxie eine leicht vermehrte TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression (Abb. 3.29 a). Bei den KO-Tieren kam es nach 24 h 100 % O<sub>2</sub> zu einer stärkeren TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression im Vergleich zur Normoxie und der 60 %igen Stimulation (Abb. 3.29 b). Auch nach 72 h war bei den WT-Mäusen ein Anstieg der mRNA-Expression des TNF- $\alpha$ -Gens unter hyperoxischer Exposition nachzuweisen (Abb. 3.29 c). In der KO-Gruppe war ebenfalls unter 60 % O<sub>2</sub>, sowie auch unter 100 % O<sub>2</sub> eine etwas stärkere TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression erkennbar, verglichen mit normoxischen Bedingungen (Abb. 3.29 d).



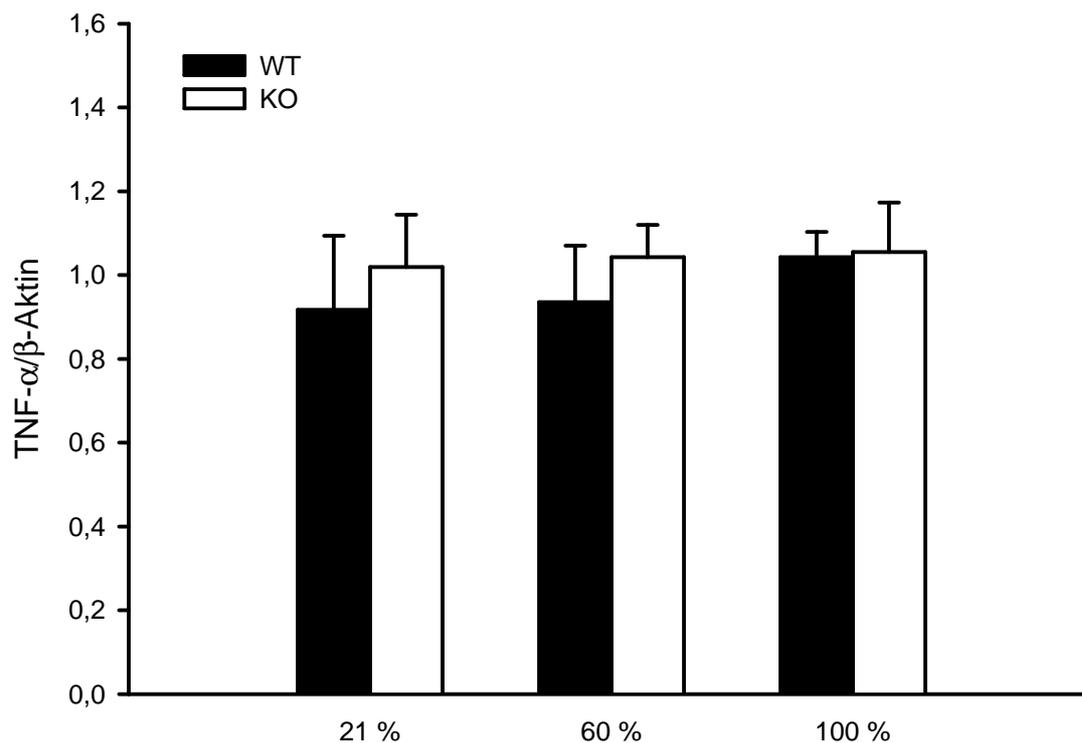
**Abb. 3.29:** Expression der TNF- $\alpha$ -mRNA nach 35 Zyklen. Banden 1 - 3: 21 % O<sub>2</sub>; Banden 4 - 6: 60 % O<sub>2</sub>; Banden 7 - 9: 100 % O<sub>2</sub>

Die densitometrische Analyse der RT-PCR des TNF- $\alpha$ -Gens (30 Zyklen) ergab nach 24stündiger Expositionsdauer in der WT-Gruppe keinen signifikanten Anstieg der Expression nach mäßiger (60 % O<sub>2</sub>: 0,99  $\pm$  0,07) und starker hyperoxischer Exposition (100 % O<sub>2</sub>: 1,09  $\pm$  0,11) im Vergleich zur Normoxie (21 % O<sub>2</sub>: 0,89  $\pm$  0,03). Auch in der Gruppe der KO-Mäuse zeigte sich keine signifikante Zunahme der Expression mit zunehmender Sauerstoffkonzentration (21 % O<sub>2</sub>: 0,93  $\pm$  0,22; 60 % O<sub>2</sub>: 0,83  $\pm$  0,21; 100 % O<sub>2</sub>: 1,10  $\pm$  0,06; Abb. 3.30).



**Abb. 3.30:** Densitometrische Auswertung der RT-PCR des TNF- $\alpha$ -Gens nach 24 h nach 30 Zyklen (n = 7; Mittelwerte  $\pm$  SEM)

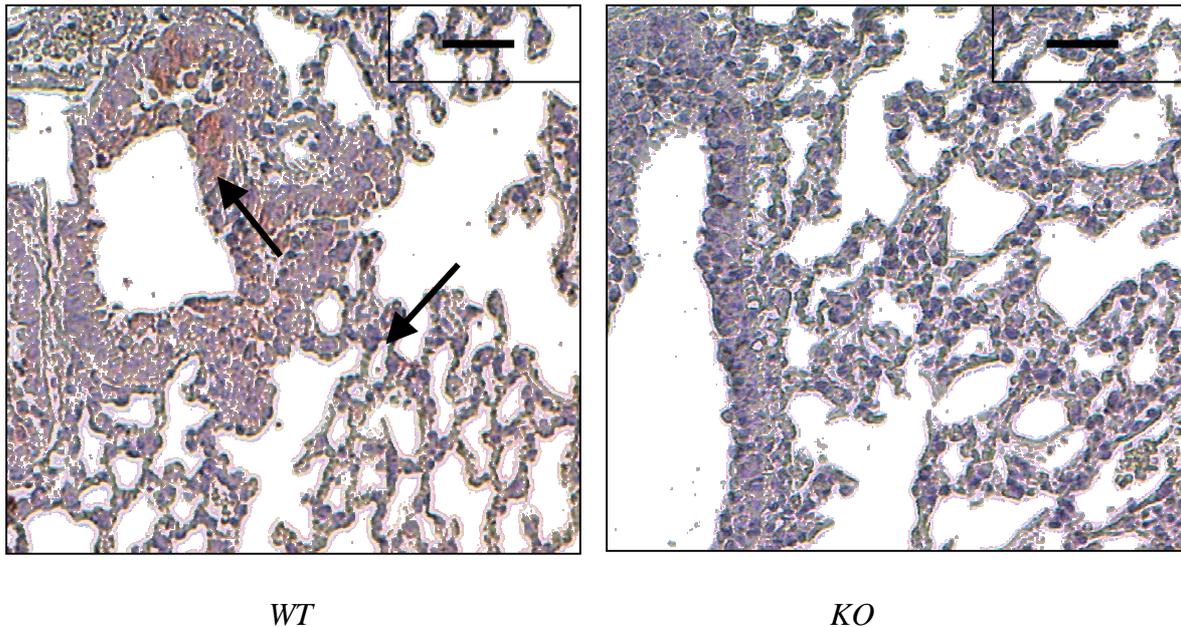
Nach 72stündiger Exposition war ebenfalls weder in der WT-Gruppe (21 % O<sub>2</sub>: 0,923 ± 0,18; 60 % O<sub>2</sub>: 0,94 ± 0,14; 100 % O<sub>2</sub>: 1,04 ± 0,08), noch in der KO-Gruppe (21 % O<sub>2</sub>: 1,02 ± 0,12; 60 % O<sub>2</sub>: 1,04 ± 0,08; 100 % O<sub>2</sub>: 1,06 ± 0,12) eine signifikante Zunahme der TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression unter hyperoxischer Exposition zu verzeichnen (Abb. 3.31).



**Abb. 3.31:** Densitometrische Auswertung der RT-PCR des TNF- $\alpha$ -Gens nach 72 h nach 30 Zyklen (n = 7; Mittelwerte ± SEM)

### 3.15 Nachweis des iNOS-Proteins

Die Expression des nativen iNOS-Proteins konnte mittels eines immunhistochemischen Assays nachgewiesen werden. Dabei zeigt sich eine iNOS-Proteinexpression anhand der braunroten Farbe im Zytoplasma der Zellen.



**Abb. 3.32:** Exemplarische Darstellung einer immunhistochemischen Anfärbung des nativen iNOS-Proteins im Lungengewebe von WT- und KO-Mäusen ( $n = 7$ ) unter 100 %  $O_2$  für 72 h. Die histologische Abbildung (Originalvergrößerung  $\times 400$ , Hämatoxylin-Eosin-Färbung) zeigt deutlich die braunrote intrazelluläre Anfärbung des iNOS-Proteins im Lungengewebe der WT-Maus. Die Länge des im rechten Bildrand eingeblendeten Balkens entspricht 25  $\mu\text{m}$ .

Im Einklang mit den Ergebnissen der RT-PCR war in der Gruppe der WT-Mäuse unter Kontrollbedingungen nach 24 h bzw. nach 72 h keine iNOS-Expression zu erkennen (nicht gezeigt). Ebenso zeigte sich unter 60 %  $O_2$ -Exposition nach 24 h, sowie auch nach 72 h allenfalls vereinzelt natives iNOS-Protein im Lungengewebe der WT-Mäuse (nicht gezeigt). Nach 24 h 100 %  $O_2$  ergab sich eine leichte (nicht gezeigt), nach 72 h 100 %  $O_2$  eine deutliche intrazelluläre Anfärbung, sowohl im Bronchialepithel, als

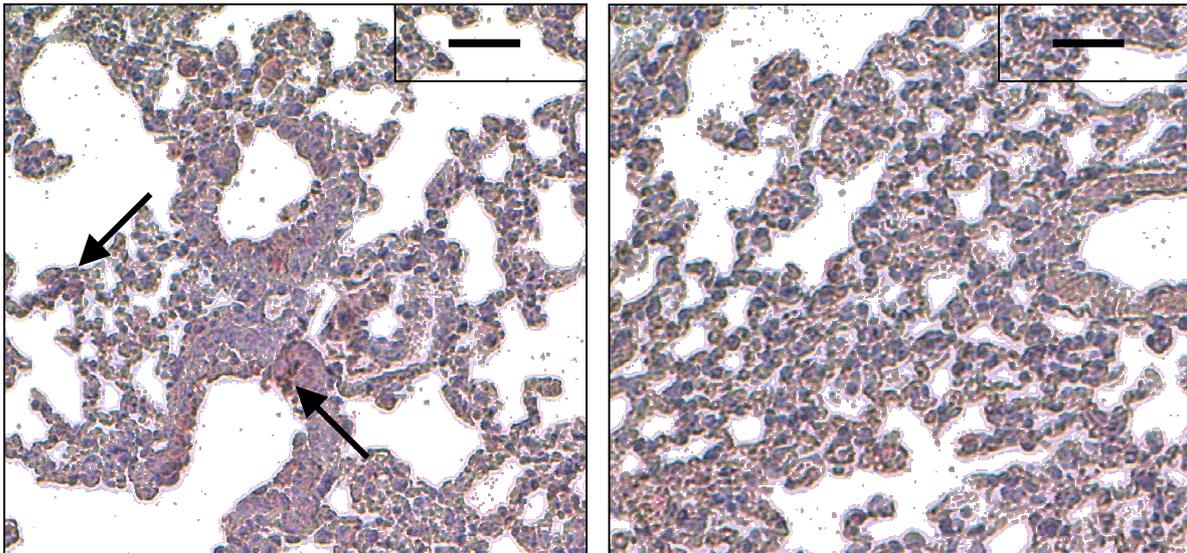
auch in Alveolarmakrophagen, Endothel- und Alveolarepithelzellen. In der Gruppe der KO-Mäuse war unter keiner der untersuchten Bedingungen eine iNOS-Protein-Anfärbung nachweisbar (Abb. 3.32).

### **3.16 NO-Konzentration in der BALF**

Die Bestimmung der NO-Konzentration in der BALF mittels der Griess-Reaktion ergab sowohl für die Gruppen der WT-Mäuse, als auch für die Gruppen der KO-Mäuse keine nachweisbaren Konzentrationen, weder nach 24 h noch nach 72 h, weder unter Normoxie noch unter Hyperoxie.

### **3.17 Nachweis von Nitrotyrosin**

Durch die Detektion von Nitrotyrosin kann eine NO-Produktion indirekt immunhistochemisch in feingeweblichen Lungenschnitten nachgewiesen werden. Analog zu den Ergebnissen der iNOS-Protein-Anfärbung war bei den WT-Mäusen für die jeweilige Expositionsdauer von 24 bzw. 72 h unter Kontrollbedingungen, sowie unter 60 % O<sub>2</sub> keine oder allenfalls eine geringe intrazelluläre Anfärbung von Nitrotyrosin zu erkennen (nicht gezeigt). Unter 100 % O<sub>2</sub> konnte nach 24 h (nicht gezeigt), und noch deutlicher nach 72 h eine Nitrotyrosinbildung nachgewiesen werden, diese war erkennbar als bräunliche Anfärbung im Zytoplasma von Bronchialepithel, Alveolarmakrophagen, Endothelzellen sowie von Pneumozyten (Abb. 3.33). Im Lungengewebe der KO-Mäuse zeigte sich unter Kontrollbedingungen keine Nitrotyrosinanfärbung (nicht gezeigt). Unter hyperoxischer Exposition war eine im Vergleich zu den WT-Mäusen deutlich geringere Nitrotyrosinbildung zu verzeichnen. Diese Nitrotyrosinbildung könnte auf die Produktion durch die konstitutiven Isoformen der iNOS zurückzuführen sein.



*WT*

*KO*

**Abb. 3.33:** Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Anfärbung von Nitrotyrosin im Lungengewebe von WT- und KO-Mäusen ( $n = 7$ ) unter 100 %  $O_2$  für 72 h. Die lichtmikroskopische Abbildung (Originalvergrößerung  $\times 400$ , Hämatoxylin-Eosin-Färbung) lässt deutlich die bräunliche intrazelluläre Anfärbung des Nitrotyrosins im Präparat der WT-Maus erkennen. Im Gewebe der KO-Maus zeigt sich eine schwächere Nitrotyrosinanfärbung intrazellulär. Die Länge des im rechten Bildrand eingeblen deten Balkens entspricht 25  $\mu\text{m}$ .

## 4 Diskussion

### 4.1 Einleitung

Die Langzeitapplikation hoher Sauerstoffkonzentrationen unter intensivmedizinischen Bedingungen, z.B. bei Patienten mit Pneumonie, Lungenödem, Atelektasen, ARDS (adult respiratory distress syndrome) oder COPD (chronic obstructive pulmonary disease) stellt die Basis der nicht-medikamentösen Therapie einer chronisch respiratorischen Insuffizienz dar. Ziel der Sauerstofftherapie sollte es sein, einen arteriellen Sauerstoffpartialdruck ( $\text{PaO}_2$ )  $> 60$  mmHg zu gewährleisten. Sowohl in der Nocturnal-Oxygen-Therapie-Trial (NOTT)-Studie (1980), als auch in der Medical-Research-Council (MRC)-Studie (1981) konnte eine Verbesserung der Überlebensrate von Patienten mit COPD durch eine chronische Sauerstoffgabe nachgewiesen werden (Koehler *et al.*, 2001).

Auch für pulmonal gesunde Patienten gibt es die Möglichkeit, von einer Beatmung mit erhöhten Sauerstoffkonzentrationen zu profitieren, so z. B. für Patienten mit intraoperativem Blutverlust. Durch Gabe von kolloiden und kristalloiden Plasmaersatzlösungen entsteht eine Hämodilution, dabei kann der Hämoglobingehalt des Blutes auf Werte um 6 - 8 g/dl sinken. Normalerweise wird bei diesen Hämoglobinkonzentrationen Fremdblut transfundiert. Studien von Habler und Meßmer ergaben, dass unter Beatmung mit reinem Sauerstoff die Hämodilution unter diesen Grenzwert fortgesetzt werden kann, ohne dass Schäden durch Gewebhypoxie oder Organdysfunktionen auftreten. So könnte es durch die Kombination von hyperoxischer Beatmung und Hämodilution möglich werden, Bluttransfusionen zu verzögern bzw. gänzlich zu vermeiden, bis eine chirurgische Blutstillung gewährleistet ist (Habler und Meßmer, 1998; Habler *et al.*, 1998).

Die verschiedenen Indikationen der künstlichen Hyperoxie werden in Zukunft noch weiter zunehmen, auch wenn dies leider nicht ohne Risiko für den Patienten ist. Denn die kontinuierliche Sauerstoffapplikation kann zu einer akuten Lungenschädigung führen, die innerhalb weniger Tage auftritt.

Die Pathophysiologie der Sauerstofftoxizität ist zurückzuführen auf verschiedenste Mechanismen und beinhaltet eine verstärkte Rekrutierung und Aktivierung von

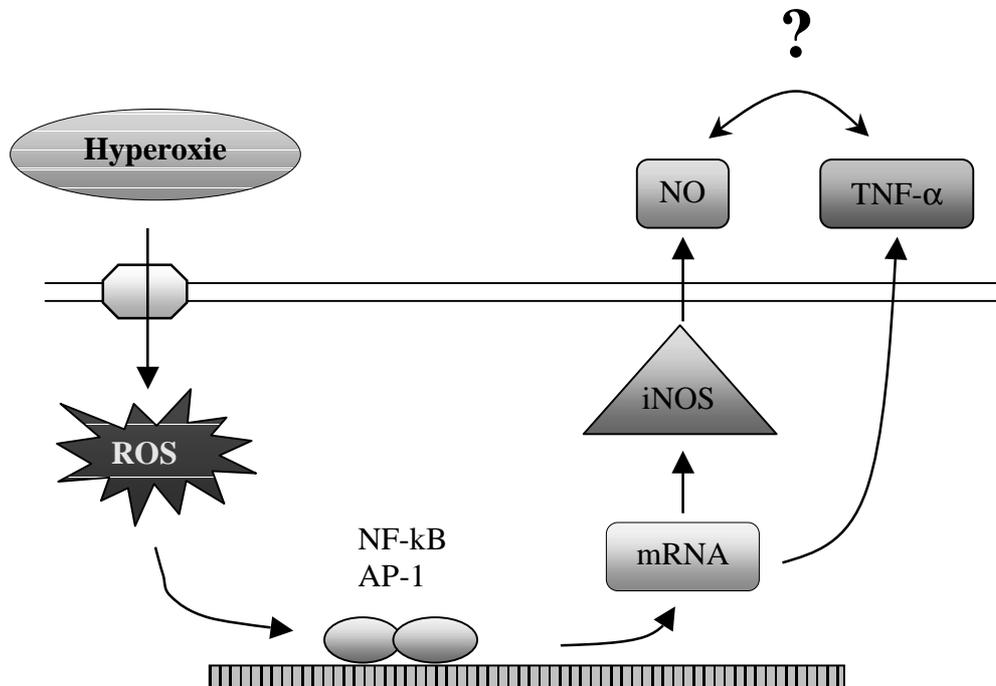
Leukozyten und Makrophagen, eine gesteigerte Zytokinfreisetzung, eine vermehrte Gefäßreagibilität und Gefäßpermeabilität, sowie DNA-Schädigungen. Ursächlich hierfür ist vermutlich eine exzessiv gesteigerte Bildung freier Sauerstoffradikale (ROS) wie Superoxidanionen und Hydroxylradikalen (Capellier *et al.*, 1999; Chabot *et al.*, 1998; Klein, 1990).

Zusätzlich gibt es diverse Hinweise darauf, dass unter hohen Sauerstoffkonzentrationen die cNOS-, sowie besonders die iNOS-Aktivität und damit konsekutiv die NO-Produktion gesteigert sind (Arkovitz *et al.*, 1997; Cucchiaro *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 2001; Pepperl *et al.*, 2001). Eine vermehrte Freisetzung von NO wirkt einerseits schädigend durch Bildung der zytotoxischen Substanz Peroxinitrit (Hashida *et al.*, 2000; Kooy *et al.*, 1995), andererseits auch protektiv auf das Lungengewebe über eine antioxidative Wirkung durch Bindung von ROS (Gutierrez *et al.*, 1996; Jun *et al.*, 1994). Garat und Mitarbeiter konnten durch eine inhalative Applikation unterschiedlicher NO-Konzentrationen (10 - 100 ppm) zeigen, dass der protektive Effekt von NO konzentrationsabhängig stattfindet. Hohe NO-Konzentrationen (100 ppm) haben zusätzlich toxische Effekte, da vermutlich Peroxinitrit im Überschuss gebildet wird (Garat *et al.*, 1997 a). Der komplexe Zusammenhang zwischen der iNOS-Induktion und dem hyperoxischen Lungenschaden ist noch immer nicht eindeutig geklärt.

Es ist bekannt, dass unter hyperoxischen Bedingungen diverse Zytokine, u.a. TNF- $\alpha$ , gebildet und von unterschiedlichsten Zellen wie Epithel- und Endothelzellen, Granulozyten oder Alveolarmakrophagen, freigesetzt werden (Geiser, 1999; Menard *et al.*, 1993; Zabel, 1996). Beteiligt an der Genexpression von Zytokinen und der iNOS unter Hyperoxie sind zahlreiche Transkriptionsfaktoren. Hierzu gehören der Nuklear-Faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) und das Aktivator-Protein-1 (AP-1) (Christman *et al.*, 2000; Rahman und MacNee, 1998; Young und Gwang, 2003). Diese redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren werden über intrazellulär gebildete reaktive Sauerstoffspezies (ROS) aktiviert (Pepperl *et al.*, 2001). Eine mögliche Wechselwirkung zwischen NO und freigesetztem TNF- $\alpha$  wird noch kontrovers diskutiert (Beck *et al.*, 1999; Sass *et al.*, 2001; Abb. 4.1).

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Einfluss einer unter Hyperoxie induzierten iNOS-Expression und NO-Produktion auf die daraus resultierende akute

inflammatorische Reaktion und Lungenschädigung *in vivo*. Zusätzlich sollte deren Einfluss auf die Aktivierung der redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 untersucht werden.



**Abb. 4.1:** Induktion der TNF- $\alpha$ - und iNOS-Expression bzw. NO-Produktion unter Hyperoxie durch intrazelluläre ROS über Aktivierung der redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1

## 4.2 Modell der iNOS-defizienten Maus

Um die Bedeutung der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase für die Pathogenese des akuten hyperoxischen Lungenschadens zu untersuchen, wurde auf das Modell der iNOS-defizienten Maus zurückgegriffen. Das hierbei verwendete Modell bot gegenüber anderen Tierspezies und *in vitro*-Modellen mehrere Vorteile.

Frühere Studien aus unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass zwischen Ratten und Hamstern Speziesunterschiede bezüglich der iNOS-Expression und NO-Produktion bestehen. So sind Hamster-AM im Gegensatz zu Ratten-AM nicht in der Lage, unter

adäquater Stimulation mit LPS, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  die iNOS zu induzieren und NO freizusetzen (Dörger *et al.*, 1997; Jesch *et al.*, 1997 und 1998). Der Nachteil eines *in vivo*-Vergleichs zwischen Ratten und Hamstern unter hyperoxischer Exposition besteht darin, dass die beobachteten Ergebnisse nicht nur auf die fehlende iNOS-Expression der Hamster zurückgeführt werden könnten, sondern möglicherweise auch Speziesunterschiede in der antioxidativen Kapazität eine Rolle spielen (Carter und Driscoll, 2001).

Eine weitere Methode zur Untersuchung der Hyperoxie-induzierten inflammatorischen Reaktion ist die Verwendung von NOS-Inhibitoren. Dabei können unselektive von selektiven Inhibitoren unterschieden werden (Jorens *et al.*, 1995; Kerwin *et al.*, 1995). Guanidin-substituierte Arginin-Analoga blockieren unselektiv die Aktivität der induzierbaren NO-Synthase, wie auch die der konstitutiven Isoformen. *In vivo*-Studien zur genaueren Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem hyperoxischen Lungenschaden und einer iNOS-Expression an Ratten zeigten z.B., dass es nach Applikation von L-NAME (N<sup>G</sup>-Nitro-L-argininmethylester) zu einer Verstärkung der hyperoxischen Lungenschädigung kommt, im Sinne einer erhöhten vaskulären Permeabilität und einer Verkürzung der Überlebenszeit (Capellier *et al.*, 1996). Arkovitz und Mitarbeiter wiesen in einem Maus-Modell ebenfalls nach Gabe von L-NAME eine erhöhte Mortalität unter hyperoxischer Exposition nach (Arkovitz *et al.*, 1997). Da es sich bei L-NAME um einen unspezifischen Inhibitor der NO-Synthasen handelt, können jedoch keine Rückschlüsse daraus gezogen werden, ob nur die Hemmung der iNOS für die beobachteten Veränderungen verantwortlich gemacht werden kann. In den letzten Jahren ist es gelungen, relativ selektive iNOS-Inhibitoren zu entwickeln. Doch auch die Ergebnisse unter Verwendung von selektiven iNOS-Inhibitoren wie NIL (N<sup>6</sup>-Iminoethyl-1-lysin) liefern noch keine eindeutigen Beweise für eine spezifische Bedeutung der iNOS am Hyperoxie-induzierten Lungenschaden (Hierholzer *et al.*, 1998). So können durch ihre Bindung an das katalytische Häm-Zentrum des Enzyms ein Einfluss auf andere NO-Synthase-Isoformen oder weitere unspezifische Effekte durch eine Interaktion mit anderen eisen- oder kupferhaltigen Enzymen nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Auch Unterschiede in der Bioverfügbarkeit spielen bei Applikation von NOS-Inhibitoren eine Rolle. Die Applikation

müsste systemisch erfolgen, wobei nicht eindeutig geklärt ist, ob der Inhibitor auch sein Zielorgan, in unserem Fall die Lunge, wirklich erreicht und dort aktiv ist.

Rothe und Mitarbeiter beschreiben eine Methode zur Gewinnung von murinen iNOS-defizienten Makrophagen (Rothe *et al.*, 1996). Dieser Ansatz einer spezifischen iNOS-Inhibition mittels der Antisense-Technik erlaubt zwar eine genauere Analyse der Regulation der AM und ihrer Abwehrfunktionen, doch können hiermit *in vitro* weder Auswirkungen auf einzelne Organe noch auf den gesamten Organismus untersucht werden.

Das Modell der iNOS-defizienten Maus bietet die Möglichkeit, selektiv nur das iNOS-Gen auszuschalten und somit die Folgen einer Exposition unter erhöhten Sauerstoffkonzentrationen bezüglich einer inflammatorischen Reaktion und einer akuten Lungenschädigung *in vivo* genauer zu analysieren. Knockout-Mäuse, die aufgrund blockierter Allele nicht in der Lage sind, die iNOS zu exprimieren, wiesen gegenüber Kontrolltieren nach einer Infektion mit Mykobakterien ein deutlich beschleunigtes Bakterienwachstum, ein vermehrtes Auftreten von nekrotisierenden Granulomen im Lungengewebe, sowie eine erhöhte Sterberate auf (MacMicking *et al.*, 1997). iNOS-defiziente Mäuse haben eine vermehrte Empfindlichkeit gegenüber viralen und bakteriellen Pathogenen (MacMicking *et al.*, 1997), zudem ein deutlich erhöhtes Risiko bezüglich einer Tumorentstehung, sowie eine bedeutende Resistenz gegenüber einer Sepsis-induzierten Hypotension (Mashimo und Goyal, 1999). Phänotypisch weisen iNOS-defiziente Mäuse (C57BL/6 x 129/SvEv) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen keine Unterschiede bezüglich Gewicht, sowie Blut- und Serumwerten auf, auch die histologische Begutachtung diverser Organe ergab keine besonderen Auffälligkeiten (MacMicking *et al.*, 1995). Diese Untersuchungen bedeuten, dass das iNOS-Gen für die Entwicklung und Fortpflanzung entbehrlich ist. Nach einer Studie von Ihrig und Mitarbeitern weisen iNOS-KO-Mäuse jedoch spontan einen signifikant erhöhten systolischen Blutdruck und Serum-Cholesterin-Spiegel auf und haben in Folge eine signifikant erhöhte Inzidenz für das Auftreten atherosklerotischer Plaques (Ihrig *et al.*, 2001).

Die exemplarische Auswertung einiger BALF-Parameter (Zellvitalität, Gesamtzellzahl, Recovery) unter Kontrollbedingungen belegt, dass sich in unserem Versuchsmodell die Daten von WT- und KO-Mäusen unter Normoxie vergleichen lassen. Eine

pulmonale Infektion der Tiere konnte über eine unauffällige Anzahl an neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten in der BALF, sowie über unauffällige histologische Schnitte der Lungengewebe unter Kontrollbedingungen weitgehend ausgeschlossen werden. Die beobachteten Veränderungen unter hyperoxischer Exposition können folglich auf eine iNOS-Defizienz zurückgeführt werden.

### 4.3 Versuchsaufbau und -durchführung

Die Exposition der iNOS-KO- und WT-Mäuse erfolgte in einer in der Hauswerkstatt unseres Instituts hergestellten, luftdicht abgeschlossenen Plexiglas-kammer (siehe Abb. 2.1). Mit einem Maß von 27 x 27 x 20 cm<sup>3</sup> bot sie Raum für eine Versuchsgruppe von sieben Mäusen. In der Literatur sind zur Durchführung einer hyperoxischen Exposition *in vivo* ähnliche Varianten dieses Versuchsaufbaus beschrieben (Deneke *et al.*, 1978; Horinouchi *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 1984; Kleeberger *et al.*, 2001; Steudel *et al.*, 2000).

Um konstante Bedingungen in der Kammer zu garantieren, wurden in einem 12 h-Rhythmus die Temperatur, die Luftfeuchtigkeit, sowie der Luftdruck in der Kammer kontrolliert. Die gemessenen Werte für die Temperatur ( $24^{\circ}\text{C} \pm 1,5$ ) entsprechen den in der Literatur angegebenen Daten (Jones *et al.*, 1984; Kleeberger *et al.*, 2001; Steudel *et al.*, 2000). Das einströmende Luftgemisch wurde über ein Wasserreservoir angefeuchtet und anschließend in die Kammer geleitet, um eine Luftfeuchtigkeit von  $73 \% \pm 13$  zu garantieren. Der Gesamtluftdruck in München liegt bei etwa 730 mmHg und entspricht annähernd dem in der Kammer gemessenen Druck von  $947 \text{ mbar} \pm 5$  ( $\approx 711 \text{ mmHg}$ ). Mit einem eingestellten Volumenfluss von 6 l/min ergab sich in der Kammer bei einem Kammervolumen von ca. 14,6 l ein durchschnittlicher Gesamt-gasaustausch von 25x/h mit dem Ziel, die CO<sub>2</sub>-Konzentration unter 1 % zu halten.

Eine große Bedeutung hat auch das Alter der exponierten Tiere. Während ausgewachsene Meerschweinchen mit 3,9 Tagen und Ratten mit maximal 2,8 Tagen relativ sensitiv gegenüber Sauerstoff reagieren, beträgt die Überlebenszeit bei Hamstern unter erhöhten Sauerstoffkonzentrationen bis zu 5,3 Tage (Frank *et al.*, 1978). Clerch und Massaro konnten in einem Experiment an Ratten demonstrieren, dass antioxidative

Abwehrmechanismen unter hyperoxischen Bedingungen altersabhängig aktiviert werden (Clerch und Massaro, 1993). So zeigten jüngere Ratten mit einem geringeren Körpergewicht eine erhöhte Toleranz gegenüber einer Hyperoxie von  $> 95\% \text{ O}_2$ . Erwachsene Mäuse überleben eine  $> 95\%$ ige Hyperoxie bis 3,6 Tage, wohingegen neonatale Mäuse erst nach 5 Tagen erste Anzeichen einer oxidativen Schädigung der Lunge aufweisen (Johnston *et al.*, 1997). Mit einem Alter von 12 - 16 Wochen werden die in unserem Modell verwendeten Mäuse zu den erwachsenen Mäusen gezählt.

Um die zeitliche Dynamik der hyperoxischen Lungenschädigung besser analysieren zu können, wurden für unsere Versuchsdurchführung Expositionszeiten von 24 und 72 h gewählt. Alle Versuchstiere überlebten eine Expositionsdauer von 72 h.

Grundsätzlich lässt sich für das Beatmungsregime von respiratorisch insuffizienten Patienten festhalten, dass die Zufuhr von reinem Sauerstoff über maximal 24 h wahrscheinlich unschädlich für die Lungen ist. Konzentrationen über  $50\% \text{ O}_2$  sind potentiell toxisch, während Konzentrationen bis  $40\%$  vermutlich auch bei längerer Anwendung als nicht toxisch gelten (Carvalho *et al.*, 1998). Im Hinblick auf diese Zahlenangaben wurden in unserer Studie drei verschiedene Sauerstoffkonzentrationen festgelegt:  $21\% \text{ O}_2$  als Kontrollgruppe,  $60\% \text{ O}_2$  als Schwellenwert für erste Anzeichen einer oxidativen Schädigung und  $100\% \text{ O}_2$  als Maximalwert.

Ähnlich den Beschreibungen von Smith (Smith, 1985) konnten auch wir unter Exposition von reinem Sauerstoff nach 72 h einen deutlich reduzierten Allgemeinzustand der Tiere, insbesondere der WT-Mäuse, beobachten. Das Fell erschien ungepflegt und struppig, die Augen matt und glanzlos, die Atmung tachy- und dyspnoeisch. Im Einklang mit diesen Beobachtungen nahm auch das Körpergewicht der WT-Mäuse im Vergleich zwischen dem Gewicht vor und nach der Exposition signifikant ab. Interessanterweise kam es in der Gruppe der KO-Mäuse zu keiner signifikanten Abnahme des Körpergewichtes.

#### 4.4 iNOS-Induktion und NO-Produktion

Die Entdeckung, dass Stickstoffmonoxid (NO) als intra- und interzelluläres Signalmolekül betrachtet werden kann, hat zu einer Flut an Publikationen über seine physiologische und pathophysiologische Relevanz geführt. Es entsteht enzymatisch unter Katalyse der NO-Synthasen aus L-Arginin. Die meisten der bis heute identifizierten Isoenzyme der NO-Synthase werden konstitutiv durch eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Konzentration aktiviert (cNOS), die Regulation der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) in Makrophagen, Epithel- und Endothelzellen und anderen Zellen des Immunsystems erfolgt auf transkriptioneller Ebene über eine Reihe von Zytokinen. Abgesehen von der Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase mit Folge einer Vasodilatation dient NO als Bestandteil der Abwehrreaktion gegen Bakterien im Immunsystem, sowie als Neurotransmitter im Nervensystem (Nathan, 1992).

Die iNOS ist ein Enzym, das unter adäquater Stimulation exprimiert wird. Gut untersucht ist die iNOS-Expression unter Stimulation mit bakteriellem Endotoxin (Hammermann *et al.*, 2001; Hickey *et al.*, 1997; Kang *et al.*, 2002; Kristof *et al.*, 1998). Ermert und Mitarbeiter analysierten die zellspezifische iNOS-Expression und deren Regulation an Ratten-Lungen. Zeit- und dosisabhängig kommt es nach Stimulation mit LPS zu einer verstärkten iNOS-Reaktivität im Lungengewebe, genauer gesagt im Bronchialepithel, in glatten Muskelzellen, in Alveolarepithel und Alveolarmakrophagen (Ermert *et al.*, 2002). Die intratracheale Instillation von Asbest-Fasern führt ebenfalls zu einer verstärkten iNOS-mRNA- und Protein-Expression (Dörger *et al.*, 2002 a). Auch eine kombinierte Gabe von  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  und Benzapyren, die eine potentielle Rolle in der Karzinogenese des Bronchialkarzinoms spielen, lässt in Folge die pulmonale Induktion proinflammatorischer Mediatoren, darunter wiederum die iNOS, ansteigen (Garcon *et al.*, 2001). Neueste *in-vitro*-Studien von Panaro und Mitarbeitern weisen auf eine iNOS-Proteinexpression und NO-Produktion in menschlichen Alveolarmakrophagen nach (Panaro *et al.*, 2003).

Unsere eigene Arbeitsgruppe konnte bereits *in vitro* demonstrieren, dass AM auch nach hyperoxischer Stimulation eine erhöhte iNOS-Expression aufweisen (Pepperl *et al.*, 2001). *In vivo*-Studien an Ratten zeigten ebenfalls unter Hyperoxie eine gesteigerte

iNOS-Expression im Vergleich zur Normoxie (Arkovitz *et al.*, 1997; Cucchiaro *et al.*, 1999). Die Auswertung der RT-PCR ergab auch in unserem Versuchsmodell an Mäusen eine Zunahme der iNOS-mRNA-Expression, am deutlichsten nach einer Expositionszeit von 72 h unter 100 % O<sub>2</sub>. Die densitometrische Analyse der RT-PCR zeigte eine signifikante Zunahme der iNOS-mRNA-Expression nach 72 h unter 100 % O<sub>2</sub> verglichen mit 60 % O<sub>2</sub>. Im Lungengewebe der KO-Mäuse war zu keinem Zeitpunkt eine iNOS-mRNA-Expression zu verzeichnen. Die Ergebnisse einer gesteigerten iNOS-mRNA-Expression unter Hyperoxie scheinen einer Studie von Arkovitz *et al.* zu widersprechen, in welcher keine Hyperoxie-induzierte iNOS-mRNA-Expression nachzuweisen war (Arkovitz *et al.*, 1997). Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass dabei die Detektion der iNOS-mRNA mittels Northern Blot erfolgte. Die Northern Blot-Technik ist aber weniger sensitiv als die Methode der RT-PCR, welche auch sehr kleine Mengen an mRNA detektieren kann (Cucchiaro *et al.*, 1999).

Die immunhistochemische Anfärbung des iNOS-Proteins mittels eines Antikörpers eignet sich gut dafür, zwischen iNOS-positiven und iNOS-negativen Zellen zu unterscheiden. Eine unterschiedlich starke iNOS-Protein-Expression der Zellen kann hiermit aber nicht objektiv dargestellt werden. Erst kürzlich wurde eine Studie publiziert, in der die zellspezifische Expression der NO-Synthasen als Antwort auf eine systemische Gabe von LPS analysiert wurde. Eine immunhistochemische Anfärbung der iNOS mit polyklonalen Antikörpern war in Bronchialepithelzellen und glatten Muskelzellen, in Zellen des Alveolareptums und vor allem in Alveolarmakrophagen zu erkennen (Ermert *et al.*, 2002). Im vorliegenden Versuchsansatz bestätigen die Ergebnisse der Immunhistochemie die Auswertung der RT-PCR der iNOS-mRNA-Expression, denn unter Kontrollbedingungen war keine, unter 60 % O<sub>2</sub> nur eine geringe iNOS-Protein-Anfärbung zu erkennen. Erst nach dreitägiger 100 %iger Sauerstoffexposition zeigte sich eine deutlich positive intrazelluläre Anfärbung im Lungen- und Bronchialepithel, sowie in Alveolarmakrophagen. Diese Beobachtungen korrelieren gut mit den Ergebnissen von Cucchiaro und Mitarbeitern, die in Lungenschnitten von Hyperoxie-exponierten Ratten ebenfalls eine positive Immunreaktivität für iNOS in Alveolarmakrophagen und -epithelien vorfanden (Cucchiaro *et al.*, 1999).

NO ist ein sehr reaktives Gas mit einer kurzen Halbwertszeit von unter 5 sec und kann daher nur sehr schwierig nachgewiesen werden. Eine Möglichkeit, NO indirekt zu detektieren, ist die Bestimmung des stabilen Reaktionsproduktes Nitrit mit Hilfe der Griess-Reaktion. Es sind bereits Arbeiten bekannt, die darauf hinweisen, dass Hyperoxie eine NO-Produktion *in vitro* induziert (Arkovitz *et al.*, 1996; Haddad *et al.*, 1996; Pepperl *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit lagen die Werte für die Nitrit-Konzentration *in vivo* unterhalb der Nachweisgrenze, sowohl unter Normoxie als auch unter Hyperoxie nach 24 h bzw. 72 h. Es gibt mehrere mögliche Erklärungen für dieses Ergebnis: 1.) Die iNOS wird zwar exprimiert, aber durch die Hyperoxie in ihrer Aktivität blockiert, 2.) NO kann aufgrund der oxidativen Schädigung und der daraus resultierenden Verlängerung der Diffusionsstrecke nicht oder nur kaum in den Alveolarraum gelangen und 3.) NO wird produziert, aber sofort durch andere freie Radikale oder Proteine inaktiviert. In einer Studie an Mäusen konnten Arkovitz *et al.* demonstrieren, dass auch *in vivo* die Nitrit-Konzentration in der BALF unter Hyperoxie gesteigert ist. Signifikante Ergebnisse ergaben sich jedoch erst nach vier bzw. fünf Tagen (Arkovitz *et al.*, 1997). Diese Daten sprechen dafür, dass die iNOS weder inaktiviert wird, noch dass der hyperoxische Lungenschaden eine Diffusion von NO in die Alveolen verhindert.

Eine Zunahme der NO-Produktion unter hyperoxischer Exposition wird auch von Haddad und Mitarbeitern angenommen, denn diese konnten im Lungengewebe vermehrt Reaktionsprodukte von NO nachweisen (Haddad *et al.*, 1994). NO bildet mit Superoxidanionen das hochpotente Oxidans Peroxinitrit. Dieses wiederum ist in der Lage, den Phenolring der Aminosäure Tyrosin zu nitrieren und somit als intra- und extrazelluläres Reservoir an Proteine gebunden zu dienen. Die Detektion von 3-Nitrotyrosin galt bis vor kurzem als sog. „footprint“ für die Bildung von Peroxinitrit. Laut neueren Untersuchungen soll es auch MPO-abhängige Reaktionen geben, die zu einer Entstehung von 3-Nitrotyrosin führen (Eiserich *et al.*, 1998; Kozlov *et al.*, 2001). Der Nachweis von 3-Nitrotyrosin ist folglich besser ein Hinweis für das Auftreten reaktiver Stickstoffspezies und den damit verbundenen oxidativen Stress als ein spezifischer Marker für Peroxinitrit. 3-Nitrotyrosin kann nach hyperoxischer Exposition in der Lunge von Ratten angefärbt werden (Cucchiaro *et al.*, 1999; Haddad *et al.*, 1994). Auch im vorliegenden Versuchsmodell war mittels Immunhistochemie

eine vermehrte intrazelluläre Nitrotyrosinanfärbung unter Exposition mit erhöhten Sauerstoffkonzentrationen nach 24 h und noch deutlicher nach 72 h zu erkennen. In der Gruppe der KO-Mäuse war eine wesentlich geringere Nitrotyrosinanfärbung unter hyperoxischer Exposition zu verzeichnen, was auf eine zusätzliche, iNOS-unabhängige Bildung von NO-Metaboliten schließen lässt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die iNOS maßgeblich an der Nitrotyrosinbildung beteiligt ist.

#### **4.5 Hyperoxie-induzierte Lungenschädigung**

Sauerstoff, in hohen Konzentrationen eingeatmet, schädigt die Lungen. Es kommt zu einer erhöhten Permeabilität des Alveolarepithels und des Kapillarendothels. Hierdurch kann sich ein interstitielles und alveoläres Lungenödem bilden. Zudem entwickelt sich eine unspezifische Entzündungsreaktion in der Lunge.

Die Beteiligung von NO am hyperoxischen Lungenschaden wird kontrovers diskutiert. Einige Autoren vermuten einen protektiven Effekt von NO. Die iNOS, welche NO in größeren Mengen und über einen längeren Zeitraum produziert, scheint aber eher schädigende Effekte zu haben.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, welchen Einfluss eine iNOS-Defizienz auf den akuten hyperoxischen Lungenschaden *in vivo* ausübt. Zur Erfassung einer Hyperoxie-induzierten inflammatorischen Reaktion wurden die Gesamtzellzahl und das Zelldifferential in der BALF ausgewertet. Die Ergebnisse der Gesamtzellzahl in der BALF ergaben nach 24 h Expositionsdauer keinen signifikanten Anstieg unter hyperoxischer Exposition. Erst nach 72 h unter 100 % O<sub>2</sub> war eine signifikante Zunahme zu verzeichnen, diese fiel in der Gruppe der WT-Mäuse signifikant höher aus verglichen mit der KO-Gruppe. Die vermehrte Zellularität in der BALF ist neben einer Bedeutung für die entstehende inflammatorische Reaktion Ausdruck einer erhöhten Kapillarpermeabilität. Dedhia und Mitarbeiter zeigten in einer Studie an Ratten eine signifikante Zunahme des Neutrophilen- und Lymphozyten-Influges unter hyperoxischer Exposition (Dedhia *et al.*, 1993). Bereits nach 24 h kam es auch in der vorliegenden Studie in der Gruppe der WT-Mäuse zu einer signifikanten Abnahme der AM-Population zugunsten der neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten unter

Hyperoxie (60 % und 100 % O<sub>2</sub>). Hyperoxie hatte auf die Gruppe der KO-Mäuse nach 24 h noch keinen wesentlichen Einfluss. Nach 72 h zeigte sich sowohl bei den WT-Mäusen als auch bei den KO-Mäusen eine signifikante Abnahme der Anzahl der AM verbunden mit einer signifikanten Zunahme von Neutrophilen und Lymphozyten. Hierbei war keine Auswirkung der iNOS-Defizienz zu erkennen. Diese Ergebnisse stimmen mit Studien von Greenberg und Mitarbeitern überein, in denen die LPS-induzierte Rekrutierung von PMN in den Lungen von iNOS-KO-Mäusen signifikant geringer war als in den Lungen von cNOS-KO-Mäusen (Greenberg *et al.*, 1999). Der Anstieg der Anzahl neutrophiler Granulozyten und der Lymphozyten in der BALF könnte in unserem Modell einer oxidativen Schädigung teilweise den Verlust der Integrität der endothelialen Barriere widerspiegeln. Die genauere Bedeutung von Lymphozyten in der Genese entzündlicher Lungenerkrankungen wird erst in jüngerer Zeit genauer analysiert. Auch sie scheinen an pathophysiologischen Prozessen beteiligt zu sein (Bingisser und Holt, 2001; Schraufnagel *et al.*, 2003). In Versuchen von Lefer *et al.* hatte eine iNOS-Defizienz keinen Einfluss auf die Leukozyten-Adhäsion unter Normalbedingungen (Lefer *et al.*, 1999). So hat die iNOS offensichtlich bedeutend weniger Einfluss auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion als ihre konstitutiven Isoformen. Die Messungen der MPO-Aktivität zur Erfassung einer Granulozyten-Akkumulation ergaben nach 24 h und nach 72 h analog zu den Ergebnissen der Zelldifferenzierung in der BALF einen deutlichen, wenn auch nicht signifikanten Anstieg. In unserem Ansatz war unter hyperoxischer Exposition ebenfalls kein Unterschied im Vergleich von WT- und KO-Mäusen zu erkennen. Die Arbeitsgruppe um Hickey wies demgegenüber eine signifikant erhöhte Leukozyten-Akkumulation in den Lungen von iNOS-defizienten Mäusen nach systemischer Applikation von bakteriellem Endotoxin nach (Hickey *et al.*, 1997). Unter septischen Bedingungen scheint also die iNOS-Expression und NO-Produktion eine potente Rolle in der Regulation der Leukozyten-Rekrutierung zu spielen. Neutrophile Granulozyten sind mit die wichtigsten Entzündungszellen in der Pathogenese des hyperoxischen Lungenschadens. Auten und Kollegen konnten zeigen, dass die Blockade des Neutrophilen-Influges den oxidativen DNA-Schaden an Sauerstoff-exponierten Rattenlungen reduziert (Auten *et al.*, 2002).

Wie bereits eingangs erwähnt, werden im Rahmen der Entzündungsreaktion diverse Mediatoren von Leukozyten und Alveolarmakrophagen sezerniert. TNF- $\alpha$  ist ein Zytokin mit einer komplexen Rolle an der Pathogenese pulmonaler Entzündungsprozesse (Becker *et al.*, 1989; Calkins *et al.*, 2001). So induziert die subletale Gabe von TNF die Entwicklung eines ARDS, bestehend aus einer reduzierten Lungencompliance, vermehrtem pulmonalen Wassergehalt und einer erhöhten Zellularität (Ferrari-Baliviera *et al.*, 1989). Dies steht im Einklang mit Ergebnissen von Millar und Mitarbeitern, die in der BALF von Patienten mit ARDS eine erhöhte TNF-Konzentration fanden (Millar *et al.*, 1989). TNF- $\alpha$  wird von AM und neutrophilen Granulozyten freigesetzt (Johnston *et al.*, 1997). Es gibt mehrere Hinweise darauf, dass TNF- $\alpha$  unter Hyperoxie produziert wird (Desmarquest *et al.*, 1998; Horinouchi *et al.*, 1996; O'Brien-Ladner *et al.*, 1995). Lindsay und ihre Arbeitsgruppe wiesen in neonatalen Ratten ebenfalls eine vermehrte TNF- $\alpha$ -Induktion unter 95 %iger Hyperoxie nach (Lindsay *et al.*, 2000). *In vivo*-Studien von Ben-Ari und Kollegen demonstrieren, dass die hyperoxische Exposition von Ratten eine sequentielle Produktion von Zytokinen zur Folge hat. Dabei wird TNF- $\alpha$  in der Frühphase freigesetzt, das antiinflammatorische Zytokin IL-6 erreicht sein Maximum nach 6 bis 9 Tagen (Ben-Ari *et al.*, 2000). Zur Erfassung einer Zellreaktion im Sinne einer Entzündung wurde die TNF- $\alpha$ -Konzentration in der BALF mittels der ELISA-Technik erfasst. Eine 24stündige hyperoxische Exposition hatte keinen signifikanten Anstieg der TNF- $\alpha$ -Konzentration zur Folge, während nach 72 h unter 100 % Sauerstoff die TNF- $\alpha$ -Konzentration in der Gruppe der WT-Mäuse überraschenderweise signifikant höher anstieg als in der KO-Gruppe. Auf mRNA-Ebene zeigte sich ebenfalls eine deutlich erkennbare Zunahme der TNF- $\alpha$ -Expression unter Hyperoxie, auch wenn hierbei keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und KO-Mäusen zu verzeichnen waren. Diese Ergebnisse sind ein Hinweis auf einen möglichen stimulatorischen Effekt der iNOS bzw. von NO auf die TNF- $\alpha$ -Induktion unter Hyperoxie. Sass und Kollegen konnten in einem Modell an iNOS-defizienten Mäusen zeigen, dass NO proinflammatorische Gene reguliert und so den LPS-induzierten Leberschaden über eine vermehrte TNF- $\alpha$ -Produktion verstärkt (Sass *et al.*, 2001). Die molekularen Mechanismen, über welche NO auf die Expression von Genen wirkt, sind

noch nicht genauer untersucht und werden z.T. auch widersprüchlich diskutiert. Eine mögliche Erklärung für die kontroversen Ergebnisse ist, dass NO sowohl antioxidative als auch prooxidative Eigenschaften besitzt. So gibt es Hinweise darauf, dass NO hauptsächlich an der Regulation von Transkriptionsfaktoren beteiligt ist, deren Aktivierung vom intrazellulären Redox-Status abhängig ist (Beck *et al.*, 1999).

Um zu untersuchen, ob die TNF- $\alpha$ -Expression unter Hyperoxie auf Protein- oder mRNA-Ebene reguliert wird, entschlossen wir uns, einen möglichen Einfluss der iNOS-Defizienz auf die Aktivierung der redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 zu untersuchen. Denn Shea und Mitarbeiter konnten zeigen, dass eine hyperoxische Exposition von Mäusen mit einer erhöhten Aktivierung von NF- $\kappa$ B einhergeht, verbunden mit einer vermehrten TNF- $\alpha$ -mRNA- und -Protein-Expression (Shea *et al.*, 1996). Der Nachweis der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren erfolgte mittels EMSA-Technik. Eine Expositionsdauer von 24 h führte unter hyperoxischer Exposition zu einer geringfügigen Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B und AP-1, wobei keine deutlichen Unterschiede im Vergleich zwischen WT- und KO-Mäusen erkennbar waren. Nach 72 h konnte eine deutliche Zunahme der Bindungsaktivität beider Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden, welche in der Gruppe der WT-Mäuse stärker ausfiel als in der Gruppe der KO-Mäuse. Dies würde bedeuten, dass auch in der Aktivierung der redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 die Induktion der iNOS einen stimulatorischen Effekt unter hyperoxischen Bedingungen besitzt. Im Gegensatz dazu konnten Chen *et al.* nach Stimulation mit LPS oder Kieselgel eine negative Wirkung von endogenem NO auf eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung demonstrieren (Chen *et al.*, 1995). Auch Studien von Kupatt und Mitarbeitern geben Hinweise auf einen negativen Feedback-Mechanismus von NO auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B unter Ischämie und Reperfusion (Kupatt *et al.*, 1997). Eine mögliche Erklärung für diese kontroversen Ergebnisse wäre, dass die unter Hyperoxie gebildeten ROS und RNS synergistisch auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und AP-1 wirken und dadurch die Inhibierung durch NO weniger zum Tragen kommt. Janssen und Kollegen demonstrierten in einem *in vitro*-Modell eine verstärkte c-fos- und c-jun-Gen- und -Protein-Expression, sowie eine gesteigerte AP-1-DNA-Bindungsaktivität vermittelt über RNS und ROS (Janssen *et al.*, 1997). Diese synergistische Aktivierung

der beiden Transkriptionsfaktoren könnte auch die erhöhte TNF- $\alpha$ -Induktion in der Gruppe der WT-Mäuse erklären.

Die inflammatorische Reaktion unter Hyperoxie geht mit einer verstärkten oxidativen Lungenschädigung einher. Um den Einfluss einer iNOS-Defizienz zu untersuchen, wurde das Ausmaß der akuten hyperoxischen Lungenschädigung durch die Messung verschiedenster biologischer Marker charakterisiert. Über die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes in der BALF kann eine endotheliale und epitheliale Permeabilitätsstörung erfasst werden. Als unspezifisches Zeichen einer Zellschädigung wurde die LDH-Aktivität in der BALF bestimmt. Dedhia und Mitarbeiter wiesen nach hyperoxischer Exposition von Ratten einen erhöhten Gesamtproteingehalt in der BALF, sowie eine Abnahme der Zellvitalität von Alveolarmakrophagen nach (Dedhia *et al.*, 1993). Auch die vorliegenden Ergebnisse zeigten eine Zunahme des Gesamtproteingehaltes in der BALF nach 24 h und 72 h, wobei diese Zunahme in der Gruppe der WT-Mäuse signifikant höher ausfiel. Analog dazu kam es in der BALF der WT-Gruppe unter Hyperoxie (72 h 100 % O<sub>2</sub>) zu einem signifikanten Anstieg der LDH-Aktivität, signifikant auch im Vergleich zur Gruppe der KO-Mäuse. Diese Daten stimmen auch mit Werten aus der Literatur überein (Smith, 1985).

Es ist bekannt, dass unter Hyperoxie sowohl Nekrose als auch Apoptose auftreten können (Barazzone und White, 2000; Kazzaz *et al.*, 1996; Mantell und Lee, 2000; Tateda *et al.*, 2003). Die Vitalität der Zellen unter Kontrollbedingungen betrug konstant > 91 %, ohne Einfluss einer iNOS-Defizienz. In der Gruppe der WT-Mäuse kam es bereits nach 24 h unter 100 % O<sub>2</sub> zu einer signifikanten Abnahme der Zellvitalität, während bei den KO-Mäusen eine Abnahme der Vitalität der Zellen erst nach 72 h signifikant wurde.

Ein vermehrter Flüssigkeitsausstrom aus den Gefäßen in das Lungeninterstitium kann durch die Berechnung des Verhältnisses von Lungenfeucht- zu Lungentrockengewicht (Wet-Dry-Ratio) ermittelt werden. Untersuchungen von Stuhr und Kollegen wiesen einen unterschiedlichen Wassergehalt unter hyperoxischer Exposition in verschiedenen Organen nach (Stuhr *et al.*, 2002). So war die Wet-Dry-Ratio besonders im Respirationstrakt signifikant erhöht, genauer gesagt in der Trachea, in den Bronchien und in der Lunge, sowie in der Haut. Dagegen war der Gesamtflüssigkeitsgehalt in den Nieren, in den Augen und im Gehirn reduziert. In unserer Studie war erst nach einer

Expositionsdauer von 72 h eine signifikante Zunahme der Wet-Dry-Ratio im Vergleich zur Normoxie zu verzeichnen, die iNOS-Defizienz hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Entwicklung eines interstitiellen Ödems. Garat und Mitarbeiter demonstrierten in einem Modell an Ratten, dass zwar nach 40 h 100 % O<sub>2</sub> die Wet-Dry-Ratio der Lunge signifikant erhöht, der alveoläre Flüssigkeitstransport aber intakt und noch nicht durch ROS inhibiert ist (Garat *et al.*, 1997 b).

Die mikroskopische Untersuchung der Lungenschnitte nach standardisierter Hämatoxylin-Eosin-Färbung zur Beurteilung des hyperoxischen Lungenschadens ergab sowohl bei den WT-Mäusen als auch bei den KO-Mäusen unter Kontrollbedingungen das Gesamtbild einer gesunden Lunge. Ähnlich den Beschreibungen von Smith, 1985, zeigten sich zeit- und dosisabhängig nach hyperoxischer Exposition deutliche Veränderungen des Lungengewebes mit Ausbildung eines interstitiellen Ödems sowie ein vermehrter Influx von Entzündungszellen. Hyaline Membranen waren nach 72 h 100 % O<sub>2</sub> noch nicht nachweisbar. Barazzone und Mitarbeiter konnten die Ausbildung hyaliner Membranen histologisch erst nach einer Expositionsdauer von 90 h beobachten (Barazzone *et al.*, 1996 a und b). Das Ausmaß des hyperoxischen Lungenschadens zeigte in unserem Versuchsmodell in der Histologie auch nach 72 h keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich von WT- und KO-Mäusen.

Das vermehrte Auftreten von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffmetaboliten wurde indirekt durch die Bestimmung der Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS) nachgewiesen. Diese gelten als Maß für die durch den oxidativen Stress entstandene Lipidperoxidation von Zellmembranen (Jamieson *et al.*, 1986). In der BALF konnte eine hyperoxische Exposition eine deutliche Zunahme von TBARS auslösen. Nach 72 h und 100 % O<sub>2</sub> war der Anstieg der TBARS in der Gruppe der WT-Mäuse signifikant erhöht verglichen mit den KO-Mäusen. Ebenso war im Lungengewebe eine vermehrte Konzentration von TBARS unter Hyperoxie nachzuweisen, auch hier bewirkte eine iNOS-Defizienz eine signifikant geringere Formation reaktiver Stickstoff- und Sauerstoff-Metaboliten.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass eine Induktion der iNOS unter hyperoxischen Bedingungen das Ausmaß der inflammatorischen Reaktion und der daraus resultierenden oxidativen Lungenschädigung negativ zu beeinflussen scheint. Cuzzocrea und Kollegen wiesen in einem Modell zur Carrageenan-induzierten Pleuritis und

akuten Lungenschädigung ebenfalls abgeschwächte Zeichen eines Entzündungsprozesses im Lungengewebe von iNOS-defizienten Mäusen nach (Cuzzocrea *et al.*, 2000). Ähnlich unseren Ergebnissen zeigte sich hier ein reduzierter Influx von Entzündungszellen, kombiniert mit einer verminderten MPO-Aktivität und einem histologisch geringer ausgeprägten Lungenschaden. Ebenso war der Nachweis einer Lipidperoxidation und Nitrotyrosinanfärbung in Abwesenheit des iNOS-Gens wesentlich moderater zu verzeichnen. Eine iNOS-Defizienz ist auch in der Lage, eine durch Ozon-Exposition verursachte pulmonale Entzündungsreaktion abzuschwächen und den Gesamtproteingehalt, sowie den Influx von Leukozyten zu reduzieren (Kleeberger *et al.*, 2001). Die intratracheale Instillation von Asbest ist eine weitere Methode, eine akute Lungenschädigung und damit auch eine iNOS-Expression zu induzieren. Auch hier war im Lungengewebe iNOS-defizienter Mäuse ein abgeschwächter oxidativer Lungenschaden nachzuweisen, im Sinne einer signifikanten Abnahme des Gesamtproteingehaltes in der BALF, der LDH-Aktivität und der Nitrotyrosinanfärbung verglichen mit WT-Mäusen (Dörger *et al.*, 2002 a). In der Pathogenese des hämorrhagischen Schocks scheint die Induktion der iNOS ebenfalls eine negative Rolle zu spielen. Hierholzer und Kollegen demonstrierten einen geringer ausgeprägten Leber- und Lungenschaden, sowie eine verminderte NF- $\kappa$ B-Aktivierung, verbunden mit einer reduzierten Zytokin-Expression im Gewebe iNOS-defizienter Mäuse (Hierholzer *et al.*, 1998). Eine systemische Applikation von bakteriellem Endotoxin führte zu deutlich weniger morphologischen Veränderungen im Lungengewebe von iNOS-KO-Tieren verglichen mit WT-Mäusen (Kristof *et al.*, 1998). In einem Sepsis-Modell verbesserte eine iNOS-Defizienz zudem die Überlebensrate der Tiere um über 30 % im Vergleich zu WT-Tieren (Hollenberg *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu wiesen iNOS-defiziente Mäuse eine höhere Empfindlichkeit gegenüber einem durch Ischämie/Reperfusion-induzierten Leberschaden auf (Hines *et al.*, 2001).

Kobayashi und Kollegen publizierten kürzlich eine Studie an iNOS-defizienten Mäusen (C57BL/6J x SV 129) unter hyperoxischer Exposition ähnlich unserem Modell (Kobayashi *et al.*, 2001). Überraschenderweise löste hier die Hyperoxie einen verstärkten Einstrom von Leukozyten, eine erhöhte LDH-Aktivität und Albuminkonzentration, sowie eine höhere Wet-Dry-Ratio in der Gruppe der iNOS-

KO-Mäuse aus verglichen mit den WT-Mäusen. Wie in Punkt 4.3 aufgeführt, hat das Alter der exponierten Tiere eine große Bedeutung für die Entstehung und das Ausmaß oxidativer Schäden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die altersabhängige Aktivierung antioxidativer Abwehrmechanismen sein (Clerch und Massaro, 1993). So überlebten erwachsene Mäuse eine > 95 %ige Hyperoxie bis 3,6 Tage, während neonatale Mäuse erst nach 5 Tagen erste Anzeichen einer oxidativen Schädigung aufweisen (Johnston *et al.*, 1997). Die Mäuse in der Studie von Kobayashi und Mitarbeitern waren mit 4 - 6 Wochen wesentlich jünger als die von uns verwendeten Tiere mit 12 - 16 Wochen. Ebenso ist die Überlebenszeit der Tiere in der Arbeitsgruppe um Kobayashi mit  $135,0 \pm 3,6$  h verlängert gegenüber Experimenten mit C57BL/6-Stämmen (86,4 h) und SV129/J-Stämmen (114,5 h) (Johnston *et al.*, 1998). Desweiteren konnten Kobayashi und Mitarbeiter keinen signifikanten Hyperoxie-induzierten Influx von neutrophilen Granulozyten in den Lungen ihrer WT-Mäuse nachweisen. An adulten Mäusen konnte bereits Smith (1985) eine signifikante Erhöhung der Neutrophilen unter Hyperoxie verzeichnen. Die iNOS-Expression scheint daher eine altersabhängige Rolle in der Genese eines akuten hyperoxischen Lungenschadens zu spielen.

Genauso wie NO oft als zweischneidiges Schwert bezeichnet wird, ist auch die Bedeutung der induzierbaren NO-Synthase an der Entstehung und Progression entzündlicher Lungenerkrankungen ambivalent. Weitere *in vivo*-Studien an iNOS-defizienten Mäusen, z.B. eine Kombination aus hyperoxischer Exposition und die Applikation von NO-Donatoren, müssen folgen, um das Zusammenspiel von NO und iNOS in der Genese des akuten hyperoxischen Lungenschadens besser analysieren zu können.

#### **4.6 Schlussfolgerung**

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Angaben in der Literatur, dass unter hyperoxischer Exposition die iNOS-mRNA- und -Protein-Expression, sowie die NO-Produktion *in vivo* gesteigert sind. Unter erhöhten Sauerstoffkonzentrationen war die Aktivierung der redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 verstärkt,

wobei sich eine iNOS-Defizienz inhibitorisch auf deren Aktivierung auszuwirken scheint.

Die Hyperoxie-induzierte inflammatorische Reaktion, quantifiziert durch die Bestimmung der Gesamtzellzahl und des Zelldifferentials in der BALF, sowie der TNF- $\alpha$ -Induktion, zeigte ebenfalls eine signifikant verminderte Ausprägung in der Gruppe der iNOS-defizienten Mäuse. Dementsprechend war auch das Ausmaß der oxidativen Lungenschädigung mit vermehrten Zeichen einer Zellschädigung im Sinne einer Abnahme der Zellvitalität, einem Anstieg der Gesamtprotein-Konzentration und einer Zunahme der LDH-Aktivität in der Gruppe der KO-Mäuse signifikant reduziert gegenüber den WT-Mäusen. Die Auswertung der Wet-Dry-Ratio und die Beurteilung der oxidativen Lungen-schädigung mittels Histologie ergaben nach 72 h keine deutlichen Unterschiede im Vergleich von WT- und KO-Mäusen. Als Marker für verstärkten oxidativen Stress war eine erhöhte Lipidperoxidation zu verzeichnen. Die Bestimmung TBARS-Konzentrationen in der BALF und im Lungengewebe ergaben bei den WT-Mäusen wesentlich höhere Werte als bei den KO-Mäusen, was ebenfalls auf die erhöhte iNOS-Expression zurückgeführt werden könnte.

Unsere Untersuchungen am Modell der iNOS-defizienten Maus deuten darauf hin, dass unter hyperoxischer Exposition die proinflammatorische Komponente der induzierbaren NO-Synthese überwiegt und dadurch das Ausmaß der akuten oxidativen Lungenschädigung potenziert wird.

## **4.7 Ausblick**

„NO News Is Bad News“ lautete der Leitartikel, mit dem das Journal „Science“ Stickstoffmonoxid (NO) zum Molekül des Jahres 1992 wählte. Seitdem wurde eine wahre Flut von Publikationen aus den verschiedensten Forschungsbereichen der Medizin, Pharmakologie und Biologie ausgelöst. NO ist demnach an einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen beteiligt. Die Bedeutung von NO am hyperoxischen Lungenschaden wird kontrovers diskutiert. Unsere Ergebnisse geben Anhaltspunkte dafür, dass sich eine verstärkte iNOS-Expression und NO-Produktion unter Hyperoxie schädlich auf die Lungen auswirkt. So konnten z. B.

auch eine erhöhte iNOS-Expression und hohe Konzentrationen von Stickstoff-Metaboliten im Lungengewebe von Patienten mit ARDS (adult respiratory distress syndrome) nachgewiesen werden (Sittipunt *et al.*, 2001).

Andererseits wird die Inhalation von NO derzeit zur Therapie von Patienten mit pulmonaler Hypertension und ARDS eingesetzt (Baldus *et al.*, 2001; Gerlach, 2001; Max *et al.*, 1997; Roissant *et al.*, 1994; Staudinger *et al.*, 1998). NO liegt unter normalen Umgebungsbedingungen als Gas vor. Somit kann es mit der Einatemluft als selektiver pulmonaler Vasodilatator zugemischt werden, da wegen der sofortigen Inaktivierung von NO durch Hämoglobin der vasodilatatorische Effekt auf die pulmonale Strombahn beschränkt bleibt. Durch eine Verbesserung der Oxygenierung können dadurch die Nebenwirkungen der künstlichen Beatmungstherapie, besonders der pulmonalen Sauerstofftoxizität, vermindert werden (Eissa, 1998; Gutierrez *et al.*, 1996; Nelin *et al.*, 1998). Neben dem ARDS gibt es eine ganze Reihe von Erkrankungen, bei denen inhalatives NO angewendet wird, wie z.B. bei hypoxämischen Neugeborenen mit bronchopulmonaler Dysplasie oder bei Patienten vor einer geplanten Herztransplantation (Benzing und Geiger, 1998; Bindels *et al.*, 2001). Bei Patienten nach Lungentransplantation wird durch eine Inhalation von NO die Dauer der postoperativen Beatmungsphase verkürzt und möglicherweise die Letalität gesenkt.

Obwohl bislang in keiner größeren Studie klinisch relevante Nebenwirkungen von NO berichtet worden sind, gibt es einige unerwünschte Wirkungen des inhalativen NO. Vor allem in Kombination mit erhöhten Sauerstoffkonzentrationen können toxisch wirkende reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies entstehen, die den pulmonalen Entzündungsprozess noch verstärken (Gaston *et al.*, 1994; Narula *et al.*, 1998). So konnten Lorch und Mitarbeiter in einer Studie an Mäusen demonstrieren, dass eine Inhalation von NO die Bildung reaktiver Stickstoff-Metabolite unter Hyperoxie verstärkt (Lorch *et al.*, 2000). Die Menge der entstehenden reaktiven Stickstoffspezies ist wahrscheinlich abhängig von der Konzentration des NO und des Sauerstoffs, sowie von der Kontaktzeit beider Gase (Motsch *et al.*, 1994). Nach systemischer Applikation von bakteriellem Endotoxin scheint eine Inhalation von NO jedoch den pulmonalen Entzündungsprozess und die Formation reaktiver Stickstoffspezies zu reduzieren (Honda *et al.*, 1999).

Angesichts dieser ungeklärten Fragen der NO-Toxizität ist die Forderung verständlich, NO bislang nur in kontrollierten klinischen Studien einzusetzen. Ein besseres Verständnis der Rolle des NO in der Pathogenese der hyperoxischen Lungenschadens ist deshalb für die Entwicklung eines zufrieden stellenden therapeutischen Konzeptes notwendig. Dabei gilt es jedoch zu beachten, dass eine direkte Übertragbarkeit der Daten von tierexperimentellen Untersuchungen auf klinische Situationen als kritisch zu bewerten ist, denn es häufen sich immer mehr die Hinweise auf spezies-spezifische Regulationsmechanismen der iNOS-Expression (Dörger *et al.*, 1997; Jesch *et al.*, 1997).

Dennoch ist es wichtig, die Mechanismen, durch welche NO seine Wirkung vollzieht, auf zellulärer und molekularer Ebene zu untersuchen und auch zu verstehen. Die iNOS, die NO über einen längeren Zeitraum und in großen Mengen produziert, hat möglicherweise eher schädigende Effekte. So könnten die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen dazu beitragen, das Verständnis, wie NO als intra- und interzellulärer Mediator im Rahmen entzündlicher Vorgänge wirken kann, zu verbessern.

## 5 Zusammenfassung

Trotz zahlreicher Neuerungen in der Therapie des ARDS (adult respiratory distress syndrome) hat sich seine Mortalität seit der Erstbeschreibung durch Ashbaugh im Jahre 1967 kaum verringert. Die entzündlichen Veränderungen in der Lunge machen eine aggressive Beatmungstherapie mit hohen Sauerstoffkonzentrationen notwendig. Durch diesen oxidativen Stress und die vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies kann ein hyperoxischer Lungenschaden entstehen, dessen genauer Pathomechanismus jedoch bis heute nicht geklärt ist. In diversen Studien mehren sich die Hinweise auf eine Beteiligung von NO an der Entstehung der Hyperoxie-induzierten Lungenschädigung. Dabei werden große Mengen von NO durch die induzierbare NO-Synthase, einem „stress response gene“, produziert. Über die gesteigerte Bildung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies kommt es unter Hyperoxie zu einer Aktivierung der redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1, die u.a. an der Regulierung des iNOS- und des TNF- $\alpha$ -Gens beteiligt sind. Ausmaß und Dynamik dieser inflammatorischen Reaktion unter Hyperoxie sind noch unklar.

Ziel der vorliegenden Studie war daher, die Auswirkung einer iNOS-Defizienz auf die Hyperoxie-induzierte inflammatorische Reaktion und dadurch konsekutiv auf das Ausmaß der hyperoxischen Lungenschädigung im zeitlichen Verlauf zu analysieren. Zusätzlich sollte der Einfluss einer iNOS-Defizienz auf die Hyperoxie-induzierte Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 untersucht werden. Um die spezifische Bedeutung des iNOS-Gens zu analysieren, wurde auf das Modell der iNOS-defizienten Maus zurückgegriffen und die Ergebnisse mit Wildtyp-Mäusen verglichen. Hierzu wurden die Tiere in einer Plexiglaskammer konstanten normobaren Sauerstoffkonzentrationen von 21 %, 60 % und 100 % für 24 h und 72 h ausgesetzt.

Die iNOS-Expression wurde auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR ermittelt. Eine Sauerstoff-Exposition von 100 % konnte bei den WT-Mäusen nach 24 h und 72 h eine signifikant erhöhte iNOS-mRNA-Expression auslösen. In der Gruppe der KO-Mäuse war zu keinem Zeitpunkt eine iNOS-mRNA-Expression nachweisbar. Analog zu diesen Ergebnissen führten erhöhte Sauerstoffkonzentrationen zeit- und dosisabhängig zu einer verstärkten intrazellulären Immunreaktivität des iNOS-Proteins bei den

WT-Mäusen. Ebenso konnten vermehrt Reaktionsprodukte von NO immunhistochemisch nachgewiesen werden. Unter Hyperoxie war 3-Nitrotyrosin im Lungengewebe der WT-Mäuse deutlich, im Lungengewebe der KO-Mäuse nur schwach anfärbbar. Zur Erfassung einer Hyperoxie-induzierten inflammatorischen Reaktion wurden die Gesamtzellzahl und das Zelldifferential in der BALF bestimmt. Nach einer Expositionsdauer von 72 h unter 100 % O<sub>2</sub> war in der Gruppe der WT-Mäuse eine signifikante Zunahme der Gesamtzellzahl zu verzeichnen, signifikant auch zur Gruppe der KO-Mäuse. Die Untersuchung des Zelldifferentials zeigte in der Gruppe der WT-Mäuse bereits nach 24 h, in der KO-Gruppe erst nach 72 h unter Hyperoxie eine signifikante Abnahme der AM-Population zugunsten der neutrophilen Granulozyten und der Lymphozyten. Analog zu diesen Ergebnissen konnte eine hyperoxische Exposition zeit- und dosisabhängig einen deutlichen, aber nicht signifikanten Anstieg der MPO-Aktivität als Ausdruck einer Granulozyten-Akkumulation auslösen, ebenfalls ohne Auswirkung einer iNOS-Defizienz. Zur Erfassung einer Zellreaktion im Rahmen der Entzündung wurde mittels ELISA-Technik die TNF- $\alpha$ -Konzentration in der BALF erfasst. Diese stieg nach 72 h unter 100 % O<sub>2</sub> in der Gruppe der WT-Mäuse signifikant höher an verglichen mit den KO-Mäusen. Auf mRNA-Ebene zeigte sich keine signifikante Zunahme der TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression unter Hyperoxie. Um den Einfluss einer iNOS-Defizienz auf die Aktivierung redoxsensitiver Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NF- $\kappa$ B unter Hyperoxie zu untersuchen, wurde deren Aktivierung mittels EMSA-Technik nachgewiesen. Nach 72 h konnte eine deutliche Zunahme der Bindungsaktivität beider Transkriptionsfaktoren unter Hyperoxie verzeichnet werden, welche in der Gruppe der WT-Mäuse stärker ausfiel als in der Gruppe der KO-Mäuse. Die inflammatorische Reaktion unter hyperoxischen Bedingungen geht mit einer verstärkten oxidativen Lungenschädigung einher, quantifiziert über die Bestimmung des Gesamtprotein-gehaltes und der LDH-Aktivität in der BALF. Die vorliegenden Ergebnisse zeigten eine signifikante Zunahme beider Parameter in der Gruppe der WT-Mäuse nach 24 h und 72 h 100 % O<sub>2</sub>, signifikant auch zur Gruppe der KO-Mäuse. Ebenso ergaben die Untersuchungen zur Vitalität der Zellen in der BALF eine signifikante Abnahme unter hyperoxischer Exposition. Durch die Berechnung der Wet-Dry-Ratio konnte eine signifikant vermehrte Extravasation von Flüssigkeit nach 72 h 100 % O<sub>2</sub> ermittelt

werden, eine iNOS-Defizienz hatte keinen Einfluss auf die Entwicklung eines interstitiellen Ödems. Die histologische Untersuchung des Lungengewebes nach standardisierter Hämatoxylin-Eosin-Färbung ergab unter Kontrollbedingungen bei den WT- und KO-Mäusen das Gesamtbild einer gesunden Lunge. Zeit- und dosisabhängig kam es nach hyperoxischer Exposition zur Ausbildung eines interstitiellen Ödems und zu einem vermehrten Influx von Entzündungszellen. Eine iNOS-Defizienz hatte keine Auswirkung auf das Ausmaß der oxidativen Lungenschädigung. Durch die Bestimmung Thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen konnte unter Hyperoxie ein signifikant vermehrtes Auftreten von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffmetaboliten nachgewiesen werden. Eine iNOS-Defizienz bewirkte eine signifikant geringere Formation reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffmetaboliten.

Aus der Gesamtheit der Daten lässt sich schließen, dass unter akuter Hyperoxie die proinflammatorische Komponente der induzierbaren NO-Synthase zu überwiegen scheint. Dadurch wird das Ausmaß der inflammatorischen Reaktion verstärkt und die resultierende oxidative Lungenschädigung potenziert. Um die genaue Bedeutung von NO an der Pathogenese des hyperoxischen Lungenschadens genauer aufzuklären, sind weitere *in vivo*-Studien an iNOS-defizienten Mäusen, z.B. eine Kombination aus hyperoxischer Exposition und Applikation von NO-Donatoren, notwendig, die das komplexe Zusammenspiel von iNOS und NO einerseits und der Zytokin-induzierten inflammatorischen Reaktion andererseits analysieren.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Abu-Soud HM, Ichimori K, Nakazawa H, Stuehr DJ. Regulation of inducible nitric oxide synthase by self-generated NO. *Biochemistry* 40 (23), 6876 - 81. 2001.
2. Adcock IM. Transcription factors as activators of gene transcription: AP-1 and NF- $\kappa$ B. *Monaldi Arch Chest Dis* 52 (2), 178 - 86. 1997.
3. Al-Ali MK, Howarth PH. Nitric oxide and the respiratory system in health and disease. *Respir Med* 92 (5), 701 - 15. 1998.
4. Arkovitz MS, Szabó C, Wispé JR, Ziegler MM, Garcia VF. Hyperoxia upregulates alveolar macrophage nitric oxide production. *Surgical forum*, 696 - 98. 1996.
5. Arkovitz MS, Szabo C, Garcia VF, Wong HR, Wispe JR. Differential effects of hyperoxia on the inducible and constitutive isoforms of nitric oxide synthase in the lung. *Shock* 7 (5), 345 - 50. 1997.
6. Auten RL, Whorton MH, Nicholas Mason S. Blocking neutrophil influx reduces DNA damage in hyperoxia-exposed newborn rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26 (4), 391 - 7. 2002.
7. Bailey TC, Cavanagh C, Mehta S, Lewis JF, Veldhuizen RA. Sepsis and hyperoxia effects on the pulmonary surfactant system in wild-type and iNOS knockout mice. *Eur Respir J* 20 (1), 177 - 82. 2002.
8. Baldus S, Castro L, Eiserich JP, Freeman BA. Is \*NO news bad news in acute respiratory distress syndrome? *Am J Respir Crit Care Med* 163 (2), 308 - 10. 2001.
9. Barazzone C, Belin D, Piguet PF, Vassalli JD, Sappino AP. Plasminogen activator inhibitor-1 in acute hyperoxic mouse lung injury. *J Clin Invest* 98 (12), 2666 - 73. 1996 a.

10. Barazzone C, Tacchini-Cottier F, Vesin C, Rochat AF, Piguet PF. Hyperoxia induces platelet activation and lung sequestration: an event dependent on tumor necrosis factor-alpha and CD11a. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15 (1), 107 - 14. 1996 b.
11. Barazzone C, White CW. Mechanisms of cell injury and death in hyperoxia: role of cytokines and Bcl-2 family proteins. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22 (5), 517 - 9. 2000.
12. Beck KF, Eberhardt W, Frank S, Huwiler A, Meßmer UK, Mühl H, Pfeilschifter J. Inducible NO-synthase: role in cellular signalling. *J Exp Biol* 202, 645 - 53. 1999.
13. Becker S, Devlin RB, Haskill JS. Differential production of tumor necrosis factor, macrophage colony stimulating factor, and interleukin 1 by human alveolar macrophages. *J Leukoc Biol* 45 (4), 353 - 61. 1989.
14. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271 (5 Pt 1), C1424 - 37. 1996.
15. Ben-Ari J, Makhoul IR, Dorio RJ, Buckley S, Warburton D, Walker SM. Cytokine response during hyperoxia: sequential production of pulmonary tumor necrosis factor and interleukin-6 in neonatal rats. *Isr Med Assoc J* 2 (5), 365 - 9. 2000.
16. Benzing A, Geiger K. NO-inhalation: what are the indications? *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 33 (8), 514 - 6. 1998.
17. Berg JT, White JE, Tsan MF. Response of alveolar macrophage-depleted rats to hyperoxia. *Exp Lung Res* 21 (1), 175 - 85. 1995.
18. Bindels AJ, van Der Hoeven JG, Groeneveld PH, Frolich M, Meinders AE. Atrial natriuretic peptide infusion and nitric oxide inhalation in patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care* 5 (3), 151 - 7. 2001.

19. Bingisser RM, Holt PG. Immunomodulating mechanisms in the lower respiratory tract: nitric oxide mediated interactions between alveolar macrophages, epithelial cells, and T-cells. *Swiss Med Wkly* 131 (13-14), 171 - 9. 2001.
20. Bowie A, O'Neill LAJ. Oxidative stress and nuclear factor-kB activation. *Biochemical Pharmacology* 59, 13 - 23. 2000.
21. Bustani P, Kotecha S. Role of cytokines in hyperoxia mediated inflammation in the developing lung. *Front Biosci* 1 (8), S 694 - 704. 2003.
22. Calkins CM, Heimbach JK, Bensard DD, Song Y, Raeburn CD, Meng X, McIntyre RC Jr. TNF receptor I mediates chemokine production and neutrophil accumulation in the lung following systemic lipopolysaccharide. *J Surg Res* 101 (2), 232 - 7. 2001.
23. Capellier G, Maupoil V, Boillot A, Kantelip JP, Rochette L, Regnard J, Barale F. L-NAME aggravates pulmonary oxygen toxicity in rats. *Eur Respir J* 9 (12), 2531 - 6. 1996.
24. Capellier G, Maupoil V, Boussat S, Laurent E, Neidhardt A. Oxygen toxicity and tolerance. *Minerva Anesthesiol* 65 (6), 388 - 92. 1999.
25. Carter JM, Driscoll KE. The role of inflammation, oxidative stress, and proliferation in silica-induced lung disease: a species comparison. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 20 Suppl 1: 33 - 43. 2001.
26. Carvalho CR, de Paula Pinto Schettino G, Maranhao B, Bethlem EP. Hyperoxia and lung disease. *Curr Opin Pulm Med* 4 (5), 300 - 4. 1998.
27. Chabot F, Mitchell JA, Gutteridge JM, Evans TW. Reactive oxygen species in acute lung injury. *Eur Respir J* 11 (3), 745 - 57. 1998.
28. Chang WC, Lee YC, Liu CL, Hsu JD, Wang HC, Chen CC, Wang CJ. Increased expression of iNOS and c-fos via regulation of protein tyrosine phosphorylation and MEK1/ERK2 proteins in terminal bronchiole lesions in the lungs of rats exposed to cigarette smoke. *Arch Toxicol* 75 (1), 28 - 35. 2001.

29. Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem* 45 (1), 7 - 17. 1999.
30. Chen F, Kuhn DC, Sun SC, Gaydos LJ, Demers LM. Dependence and reversal of nitric oxide production on NF-kappa B in silica and lipopolysaccharide-induced macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 214 (3), 839 - 46. 1995.
31. Christman JW, Sadikot RT, Blackwell TS. The role of nuclear factor-kappa B in pulmonary diseases. *Chest* 117 (5), 1482 - 7. 2000.
32. Clerch LB, Massaro D. Tolerance of rats to hyperoxia. Lung antioxidant enzyme gene expression. *J Clin Invest* 91 (2), 499 - 508. 1993.
33. Comhair SA, Erzurum SC. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol* 283 (2), L246 - 55. 2002.
34. Crapo JD, Tierney DF. Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity. *Am J Physiol* 226 (6), 1401 - 7. 1974.
35. Cucchiaro G, Tatum AH, Brown MC, Camporesi EM, Daucher JW, Hakim TS. Inducible nitric oxide synthase in the lung and exhaled nitric oxide after hyperoxia. *Am J Physiol* 277 (3 Pt 1), L636 - 44. 1999.
36. Cuzzocrea S, Mazzon E, Calabro G, Dugo L, De Sarro A, van De Loo FA, Caputi AP. Inducible nitric oxide synthase-knockout mice exhibit resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan. *Am J Respir Crit Care Med* 162 (5), 1859 - 66. 2000.
37. D'Angio CT, Finkelstein JN. Oxygen regulation of gene expression: a study in opposites. *Mol Genet Metab* 71 (1-2), 371 - 80. 2000.
38. Dedhia HV, Ma JY, Vallyathan V, Dalal NS, Banks D, Flink EB, Billie M, Barger MW, Castranova V. Exposure of rats to hyperoxia: alteration of lavagete parameters and macrophage function. *J Toxicol Environ Health* 40 (1), 1- 13. 1993.

39. Deneke SM, Bernstein S, Fanburg BL. Absence of inductive effect of hyperoxia on superoxide dismutase activity in rat alveolar macrophages. *Am Rev Respir Dis* 18 (1), 105 - 11. 1978.
40. Desmarquest P, Chadelat K, Corroyer S, Cazals V, Clement A. Effect of hyperoxia on human macrophage cytokine response. *Respir Med* 92 (7), 951 - 60. 1998.
41. Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* 11 (5), 1475 - 89. 1983.
42. Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 141 (7), 2407 - 12. 1988.
43. Dörger M, Allmeling A, Kiefmann R, Schropp A, Krombach F. Dual role of inducible nitric oxide synthase in acute asbestos-induced lung injury. *Free Radic Biol Med* 33 (4), 491 - 501. 2002 a.
44. Dörger M, Allmeling AM, Kiefmann R, Munzing S, Messmer K, Krombach F. Early inflammatory response to asbestos exposure in rat and hamster lungs: role of inducible nitric oxide synthase. *Toxicol Appl Pharmacol* 181 (2), 93 - 105. 2002 b.
45. Dörger M, Jesch NK, Rieder G, Hirvonen MR, Savolainen K, Krombach F, Messmer K. Species differences in NO formation by rat and hamster alveolar macrophages in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16 (4), 413 - 20. 1997.
46. Dörger M, Munzing S, Allmeling AM, Messmer K, Krombach F. Phenotypic and functional differences between rat alveolar, pleural, and peritoneal macrophages. *Exp Lung Res* 27 (1), 65 - 76. 2001.

47. Drath DB, Shorey JM, Huber GL. Functional and metabolic properties of alveolar macrophages in response to the gas phase of tobacco smoke. *Infect Immun* 34 (1), 11 - 5. 1981.
48. Duchstein HJ, Riederer S, Erbach C. Active nitrogen species. A new research area for pharmaceutical chemistry. *Pharm Unserer Zeit* 28 (4), 197 - 207. 1999.
49. Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, van der Vliet A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 391 (6665), 393 - 7. 1998.
50. Eissa NT. Nitric oxide in acute lung injury. *Intensive Care Med* 24 (11), 1226 - 7. 1998.
51. Ermert M, Ruppert C, Gunther A, Duncker HR, Seeger W, Ermert L. Cell-specific nitric oxide synthase-isoenzyme expression and regulation in response to endotoxin in intact rat lungs. *Lab Invest* 82 (4), 425 - 41. 2002.
52. Fakler CR, Wu B, McMicken HW, Geske RS, Welty SE. Molecular mechanisms of lipopolysaccharide induced ICAM-1 expression in A549 cells. *Inflamm Res* 49 (2), 63 - 72. 2000.
53. Fan J, Ye RD, Malik AB. Transcriptional mechanisms of acute lung injury. *Am J Physiol* 281 (5), L1037 - 50. 2001.
54. Feeney L, Berman ER. Oxygen toxicity: membrane damage by free radicals. *Invest Ophthalmol* 15 (1), 789 - 92. 1976.
55. Ferrari-Baliviera E, Mealy K, Smith RJ, Wilmore DW. Tumor necrosis factor induces adult respiratory distress syndrome in rats. *Arch Surg* 124 (12), 1400 - 5. 1989.
56. Fischmann TO, Hruza A, Niu XD, Fossetta JD, Lunn CA, Dolphin E, Prongay AJ, Reichert P, Lundell DJ, Narula SK, Weber PC. Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation. *Nat Struct Biol* 6 (3), 233 - 42. 1999.

57. Förstermann U, Kleinert H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 352 (4), 351 - 64. 1995.
58. Frank L, Bucher JR, Roberts RJ. Oxygen toxicity in neonatal and adult animals of various species. *J Appl Physiol* 45 (5), 699 - 704. 1978.
59. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47 (5), 412 - 26. 1982.
60. Garat C, Jayr C, Eddahibi S, Laffon M, Meignan M, Adnot S. Effects of inhaled nitric oxide or inhibition of endogenous nitric oxide formation on hyperoxic lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 155 (6), 1957 - 64. 1997 a.
61. Garat C, Meignan M, Matthay MA, Luo DF, Jayr C. Alveolar epithelial fluid clearance mechanisms are intact after moderate hyperoxic lung injury in rats. *Chest* 111 (5), 1381 - 8. 1997 b.
62. Garcon G, Gosset P, Garry S, Marez T, Hannotiaux MH, Shirali P. Pulmonary induction of proinflammatory mediators following the rat exposure to benzo(a)pyrene-coated onto Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles. *Toxicol Lett* 121 (2), 101 - 17. 2001.
63. Gaston B, Drazen JM, Loscalzo J, Stamler JS. The biology of nitrogen oxides in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 149 (2 Pt 1), 538 - 51. 1994.
64. Geiser T. Inflammatory cytokines and chemokines in acute inflammatory disease. *Schweiz Med Wochenschr* 129 (14), 540 - 6. 1999.
65. Gerlach H. Treatment of the acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Dtsch Med Wochenschr* 126 (42), 1173 - 7. 2001.
66. Greenberg SS, Ouyang J, Zhao X, Parrish C, Nelson S, Giles TD. Effects of ethanol on neutrophil recruitment and lung host defense in nitric oxide synthase I and nitric oxide synthase II knockout mice. *Alcohol Clin Exp Res* 23 (9), 1435 - 45. 1999.

67. Griffith DE, Garcia JG, James HL, Callahan KS, Iriana S, Holiday D. Hyperoxic exposure in humans. Effects of 50 percent oxygen on alveolar macrophage leukotriene B4 synthesis. *Chest* 101 (2), 392 - 7. 1992.
68. Grisham MB, Jourde'Heuil D, Wink DA. Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol* 276 (2 Pt 1), G315 - 21. 1999.
69. Gutierrez HH, Nieves B, Chumley P, Rivera A, Freeman BA. Nitric oxide regulation of superoxide-dependent lung injury: oxidant-protective actions of endogenously produced and exogenously administered nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 21 (1), 43 - 52. 1996.
70. Habler O, Messmer K. Hyperoxaemia in extreme haemodilution. *Br J Anaesth* 81 (Suppl 1), 79 - 82. 1998.
71. Habler OP, Kleen MS, Hutter JW, Podtschaske AH, Tiede M, Kemming GI, Welte MV, Corso CO, Batra S, Keipert PE, Faithfull NS, Messmer KF. Effects of hyperoxic ventilation on hemodilution-induced changes in anesthetized dogs. *Transfusion* 38 (2), 135 - 44. 1998.
72. Haddad IY, Pataki G, Hu P, Galliani C, Beckman JS, Matalon S. Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury. *J Clin Invest* 94 (6), 2407 - 13. 1994.
73. Haddad IY, Zhu S, Crow J, Barefield E, Gadilhe T, Matalon S. Inhibition of alveolar type II cell ATP and surfactant synthesis by nitric oxide. *Am J Physiol* 270 (6 Pt 1), L898 - 906. 1996.
74. Haddad JJ. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(Y)-sensitive transcription factors. *Cellular Signaling* 14, 879 - 97. 2002.
75. Hammermann R, Stichnote C, Closs EI, Nawrath H, Racke K. Inhibition of nitric oxide synthase abrogates lipopolysaccharides-induced up-regulation of L-arginine uptake in rat alveolar macrophages. *Br J Pharmacol* 133 (3), 379 - 86. 2001.

76. Hashida K, Sasaki K, Makino N. Interactions of nitric oxide and oxygen in cytotoxicity: proliferation and antioxidant enzyme activities of endothelial cells in culture. *Free Radic Res* 33 (2), 147 - 56. 2000.
77. Hickey MJ, Sharkey KA, Sihota EG, Reinhardt PH, MacMicking JD, Nathan C, Kubes P. Inducible nitric oxide synthase-deficient mice have enhanced leukocyte-endothelium interactions in endotoxemia. *FASEB J* 11 (12), 955 - 64. 1997.
78. Hierholzer C, Harbrecht B, Menezes JM, Kane J, MacMicking J, Nathan CF, Peitzman AB, Billiar TR, Tweardy DJ. Essential role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after hemorrhagic shock. *J Exp Med* 187 (6), 917 - 28. 1998.
79. Hines IN, Harada H, Bharwani S, Pavlick KP, Hoffman JM, Grisham MB. Enhanced Post-Ischemic Liver Injury in iNOS-Deficient Mice: A Cautionary Note. *Biochem Biophys Res Commun* 22; 284 (4), 972 - 6. 2001.
80. Hollenberg SM, Broussard M, Osman J, Parrillo JE. Increased microvascular reactivity and improved mortality in septic mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Circ Res* 86 (7), 774 - 8. 2000.
81. Honda K, Kobayashi H, Hataishi R, Hirano S, Fukuyama N, Nakazawa H, Tomita T. Inhaled nitric oxide reduces tyrosine nitration after lipopolysaccharide instillation into lungs of rats. *Am J Respir Crit Care Med* 160 (2), 678 - 88. 1999.
82. Horinouchi H, Wang CC, Shepherd KE, Jones R. TNF alpha gene and protein expression in alveolar macrophages in acute and chronic hyperoxia-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 14 (6), 548 - 55. 1996.
83. Ihrig M, Dangler CA, Fox JG. Mice lacking inducible nitric oxide synthase develop spontaneous hypercholesterolaemia and aortic atheromas. *Atherosclerosis* 156 (1), 103 - 7. 2001.

84. Jamieson D, Chance B, Cadenas E, Boveris A. The relation of free radical production to hyperoxia. *Annu Rev Physiol* 48, 703 - 19. 1986.
85. Janssen YM, Matalon S, Mossman BT. Differential induction of c-fos, c-jun, and apoptosis in lung epithelial cells exposed to ROS or RNS. *Am J Physiol* 273 (4 Pt 1), L789 - 96. 1997.
86. Jesch NK, Dörger M, Enders G, Rieder G, Vogelmeier C, Messmer K, Krombach F. Expression of inducible nitric oxide synthase and formation of nitric oxide by alveolar macrophages: an interspecies comparison. *Environ Health Perspect* 105 (Suppl 5), 1297 - 300. 1997.
87. Jesch NK, Dörger M, Messmer K, Krombach F. Formation of nitric oxide by rat and hamster alveolar macrophages: an interstrain and interspecies comparison. *Toxicol Lett* 96-97, 47 - 51. 1998.
88. Johnston CJ, Wright TW, Reed CK, Finkelstein JN. Comparison of adult and newborn pulmonary cytokine mRNA expression after hyperoxia. *Exp Lung Res* 23 (6), 537 - 52. 1997.
89. Jones R, Zapol WM, Reid L. Pulmonary artery remodeling and pulmonary hypertension after exposure to hyperoxia for 7 days. A morphometric and hemodynamic. *Am J Physiol* 117 (2), 273 - 85. 1984.
90. Jorens PG, Matthys KE, and Bult H. Modulation of nitric oxide synthase activity in macrophages. *Mediators of Inflammation* 4, 75 - 89. 1995.
91. Jun CD, Lee JY, Lee BS, Choi BM, Um JY, Kwak HJ, Ji KY, Kim HM, Chung HT. Generation of nitric oxide inhibits formation of superoxide in macrophages during activation. *Biochem Mol Biol Int* 34 (1), 1 - 8. 1994.
92. Kang YJ, Lee BK, Lee YS, Seo HG, Park MK, Kim HJ, Pyo HS, Chong WS, Jung HJ, Yan-Choi HS, Lee DH, Chang KC. Suppression of tumor necrosis factor- $\alpha$  and inducible NO-synthase gene expression by THI 52, a new

- synthetic naphthyl-benzylisoquinoline alkaloid. *Biochem Pharm* 65, 457 - 64. 2003
93. Kang YJ, Seo SJ Yun-Choi HS Lee DH Kim YM Chang KC. A synthetic isoquinoline alkaloid, 1-(beta-naphthylmethyl)-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinoline (YS 51), reduces inducible nitric oxide synthase expression and improves survival in a rodent model of endotoxic shock. *J Pharmacol Exp Ther* 30 1(2), 561 - 7. 2002.
  94. Kanner J, Harel S, Granit R. Nitric oxide, an inhibitor of lipid oxidation by lipoxygenase, cyclooxygenase and hemoglobin. *Lipids* 27 (1), 46 - 9. 1992.
  95. Kazzaz JA, Xu J, Palaia TA, Mantell L, Fein AM, Horowitz S. Cellular oxygen toxicity. Oxidant injury without apoptosis. *J Biol Chem* 271 (25), 15182 - 6. 1996.
  96. Kerwin JF Jr, Lancaster JR Jr, Feldman PL. Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J Med Chem* 38 (22), 4343 - 62. 1995.
  97. Kleeberger SR, Reddy SP, Zhang LY, Cho HY, Jedlicka AE. Toll-like receptor 4 mediates ozone-induced murine lung hyperpermeability via inducible nitric oxide synthase. *Am J Physiol* 280 (2), L326 - 33. 2001.
  98. Klein J. Normobaric pulmonary oxygen toxicity. *Anesth Analg* 70 (2), 195 - 207. 1990.
  99. Kobayashi H, Hataishi R, Mitsufuji H, Tanaka M, Jacobson M, Tomita T, Zapol WM, Jones RC. Antiinflammatory properties of inducible nitric oxide synthase in acute hyperoxic lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24 (4), 390 - 7. 2001.
  100. Koehler U, Greib C, Holland A, Schafer H, von Wichert P. Therapeutic options in chronic respiratory insufficiency. *Internist* 42 (3), 363 - 72. 2001.
  101. Kooy NW, Royall JA, Ye YZ, Kelly DR, Beckman JS. Evidence for in vivo peroxynitrite production in human acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 151 (4), 1250 - 4. 1995.

102. Kozlov AV, Sobhian B, Duvigneau C, Gemeiner M, Nohl H, Redl H, Bahrami S. Organ specific formation of nitrosyl complexes under intestinal ischemia/reperfusion in rats involves NOS-independent mechanism(s). *Shock* 15 (5), 366 - 71. 2001.
103. Kristof AS, Goldberg P, Laubach V, Hussain SN. Role of inducible nitric oxide synthase in endotoxin-induced acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 58 (6), 1883 - 9. 1998.
104. Kuebler WM, Abels C, Schuerer L, Goetz AE. Measurement of neutrophil content in brain and lung tissue by a modified myeloperoxidase assay. *Int J Microcirc Clin Exp* 16 (2), 89 - 97. 1996.
105. Kupatt C, Weber C, Wolf DA, Becker BF, Smith TW, Kelly RA. Nitric oxide attenuates reoxygenation-induced ICAM-1 expression in coronary microvascular endothelium: role of NFkappaB. *J Mol Cell Cardiol* 29 (10), 2599 - 609. 1997.
106. Kwon S, George SC. Synergistic cytokine-induced nitric oxide production in human alveolar epithelial cells. *Nitric Oxide* 3 (4), 348 - 57. 1999.
107. Lavoisier AL. Memoire sur les alterations qui arruvent a L'air dans plusieurs circonstances ou se trouvent les hommes reunis en societe. *Histoire Soc R Med* 5, 569 - 82. 1785.
108. Lee DU, Kang YJ, Park MK, Lee YS, Seo HG, Kim TS, Kim CH, Chang KC. Effects of 13-alkyl-substituted berberine alkaloids on the expression of COX-II, TNF- $\alpha$ , iNOS, and IL-2 production in LPS-stimulated macrophages. *Life Science* 73, 1401 - 12. 2003.
109. Lee RP, Wang D, Kao SJ, Chen HI. The lung is the major site that produces nitric oxide to induce acute pulmonary oedema in endotoxin shock. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28 (4), 315 - 20. 2001.

110. Lefer DJ, Jones SP, Girod WG, Baines A, Grisham MB, Cockrell AS, Huang PL, Scalia R. Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol* 276 (6 Pt 2), H1943 - 50. 1999.
111. Li N, Karin M. Is NF- $\kappa$ B the sensor of oxidative stress? *FASEB J* 13, 1137 - 43. 1999.
112. Liaudet L, Soriano FG, Szabo C. Biology of nitric oxide signaling. *Crit Care Med* 28 (4 Suppl), N37 - 52. 2000.
113. Lindsay L, Oliver SJ, Freeman SL, Josien R, Krauss A, Kaplan G. Modulation of hyperoxia-induced TNF- $\alpha$  expression in the newborn rat lung by thalidomide and dexamethasone. *Inflammation* 24 (4), 347 - 56. 2000.
114. Linn SC, Morelli PJ, Edry I, Cottongim SE, Szabo C, Salzman AL. Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase gene in an intestinal epithelial cell line. *Am J Physiol* 272 (6 Pt 1), G1499 - 508. 1997.
115. Lorch SA, Foust R 3<sup>rd</sup>, Gow A, Arkovitz M, Salzman AL, Szabo C, Vayert B, Geffard M, Ischiropoulos H. Immunohistochemical localization of protein 3-nitrotyrosine and S-nitrosocysteine in a murine model of inhaled nitric oxide therapy. *Pediatr Res* 47 (6), 798 - 805. 2000.
116. Lorrain-Smith J. The pathophysiological effects due to increase of oxygen tension in the air breathed. *Physiol* 24, 19 - 25. 1899.
117. Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW, Murphy WJ. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (20), 9730 - 4. 1993.
118. Lyons CR. The role of nitric oxide in inflammation. *Adv Immunol* 60, 323 - 71. 1995.
119. MacMicking JD, Nathan C, Hom G, Chartrain N, Fletcher DS, Trumbauer M, Stevens K, Xie QW, Sokol K, Hutchinson N et al. Altered responses to bacterial

- infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell* 81 (4), 641 - 50. 1995.
120. MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (10), 5243 - 8. 1997.
121. Mantell LL, Lee PJ. Signal transduction pathways in hyperoxia-induced lung cell death. *Mol Genet Metab* 71 (1-2), 359 - 70. 2000.
122. Mashimo H, Goyal RK. Lessons from genetically engineered animal models. IV. Nitric oxide synthase gene knockout mice. *Am J Physiol* 277 (4 Pt 1), G745 -50. 1999.
123. Matthews JR, Botting CH, Panico M, Morris HR, Hay RT. Inhibition of NF-kappaB DNA binding by nitric oxide. *Nucleic Acids Res* 24 (12), 2236 - 42. 1996.
124. Max M, Kaisers U, Rossaint R. Perspectives in mechanical ventilation in ARDS. *Schweiz Med Wochenschr* 127 (24), 1030 - 8. 1997.
125. Menard O, Martinet N, Martinet Y. Cytokines and the lung. *Pneumologie* 47 (7), 427 - 38. 1993.
126. Millar AB, Foley NM, Singer M, Johnson NM, Meager A, Rook GA. Tumour necrosis factor in bronchopulmonary secretions of patients with adult respiratory distress syndrome. *Lancet* 2 (8665), 712 - 4. 1989.
127. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43 (2), 109 - 42. 1991.
128. Motsch J, Weimann J, Fresenius M, Gagel K, Martin E. In vitro study of the formation of NO<sub>2</sub> in inhalation of nitrogen monoxide. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 29 (3), 157 - 62. 1994.

129. Narula P, Xu J, Kazzaz JA, Robbins CG, Davis JM, Horowitz S. Synergistic cytotoxicity from nitric oxide and hyperoxia in cultured lung cells. *Am J Physiol* 274 (3 Pt 1), L411 - 6. 1998.
130. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6 (12), 3051 - 64. 1992.
131. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthase: roles, tolls, and controls. *Cell* 78, 915 - 18. 1994.
132. Nelin LD, Welty SE, Morrisey JF, Gotuaco C, Dawson CA. Nitric oxide increases the survival of rats with a high oxygen exposure. *Pediatr Res* 43 (6), 727 - 32. 1998.
133. Nunokawa Y, Oikawa S, Tanaka S. Human inducible nitric oxide synthase gene is transcriptionally regulated by nuclear factor-kappaB dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 223 (2), 347 - 52. 1996.
134. Nunokawa Y, Oikawa S, Tanaka S. Expression of human inducible nitric oxide synthase is regulated by both promoter and 3'-regions. *Biochem Biophys Res Commun* 233 (2), 523 - 6. 1997.
135. Nussler AK, Billiar TR. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol* 54 (2), 171 - 8. 1993.
136. O'Brien-Ladner AR, Nelson ME, Cowley BD, Jr Bailey K, Wesselius LJ. Hyperoxia amplifies TNF-alpha production in LPS-stimulated human alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 12 (3), 275 - 9. 1995.
137. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Reaction of linoleic acid hydroperoxide with thiobarbituric acid. *J Lipid Res* 19, 1053 - 7. 1978.
138. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95 (2), 351 - 8. 1979.

139. Panaro MA, Brandonisio O, Acquafredda A, Sisto M, Mitolo V. Evidences for iNOS expression and nitric oxide production in the human macrophages. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 3 (3), 210 - 21. 2003.
140. Pepperl S, Dörger M, Ringel F, Kupatt C, Krombach F. Hyperoxia upregulates the NO pathway in alveolar macrophages in vitro: role of AP-1 and NF-kappaB. *Am J Physiol* 280 (5), L905 - 13. 2001.
141. Pitt BR, St Croix CM. Complex regulation of iNOS in lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26 (1), 6 - 9. 2002.
142. Priestley J. Experiments and observation on different kinds of air. *Volume 2 London: 1775.* 1775.
143. Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 268 (5 Pt 1), L699 - 722. 1995.
144. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 288 (2), 481 - 7. 1991.
145. Rahman I, MacNee W. Role of transcription factors in inflammatory lung diseases. *Thorax* 53 (7), 601 - 12. 1998.
146. Romanska HM, Polak JM, Coleman RA, James RS, Harmer DW, Allen JC, Bishop AE. iNOS gene upregulation is associated with the early proliferative response of human lung fibroblasts to cytokine stimulation. *J Pathol* 197 (3), 372 - 9. 2002.
147. Rossaint R, Pappert D, Gerlach H, Falke K. Therapy of ARDS. 2. New management methods--first clinical experiences. *Anaesthetist* 43 (6), 364 - 75. 1994.
148. Rothe H, Bosse G, Fischer HG, Kolb H. Generation and characterization of inducible nitric oxide synthase deficient macrophage cell lines. *Biol Chem Hoppe Seyler* 377 (4), 227 - 31. 1996.

149. Rubbo H, Darley-USmar V, Freeman BA. Nitric oxide regulation of tissue free radical injury. *Chem Res Toxicol* 9 (5), 809 - 20. 1996.
150. Saleh D, Barnes PJ, Giaid A. Increased production of the potent oxidant peroxynitrite in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 155 (5), 1763 - 9. 1997.
151. Salminen US, Maasilta PK, Harjula AL, Romanska HM, Bishop AE, Polak JM. Nitric oxide in the development of obliterative bronchiolitis in a heterotopic pig model. *Transplantation* 73 (11), 1724 - 9. 2002.
152. Sass G, Koerber K, Bang R, Guehring H, Tiegs G. Inducible NO synthase is critical for immuno-mediated liver injury in mice. *J Clin Invest* 107, 439 - 47. 2001.
153. Schraufnagel DE, Agaram NP, Faruqui A, Jain S, Jain L, Ridge KM, Sznajder JJ. Pulmonary lymphatics and edema accumulation. *Am J Physiol* 284 (5), L891 - 7. 2003.
154. Schulz C, Gillissen A, Schultze-Werninghaus G. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary inflammatory processes. *Pneumologie* 52 (6), 340 - 9. 1998.
155. Schulze-Osthoff K, Los M, Baeuerle PA. Redox signalling by transcription factors NF-kappa B and AP-1 in lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 50 (6), 735 - 41. 1995.
156. Sentman ML, Brannstrom T, Marklund SL. EC-SOD and the response to inflammatory reactions and aging in mouse lung. *Free Radic Biol Med* 32 (1), 975 - 81. 2002.
157. Shea LM, Beehler C, Schwartz M, Shenkar R, Tuder R, Abraham E. Hyperoxia activates NF-kappaB and increases TNF-alpha and IFN-gamma gene expression in mouse pulmonary lymphocytes. *J Immunol* 157 (9), 3902 - 8. 1996.

158. Shellito JE, Kolls JK, Summer WR. Regulation of nitric oxide release by macrophages after intratracheal lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13 (1), 45 - 53. 1995.
159. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215 (2), 213 - 9. 1993.
160. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82 (2), 291 - 5. 1997.
161. Singh S, Evans TW. Nitric oxide, the biological mediator of the decade: fact or fiction? *Eur Respir J* 10 (3), 699 - 707. 1997.
162. Sinkin RA, LoMonaco MB, Finkelstein JN, Watkins RH, Cox C, Horowitz S. Increased fibronectin mRNA in alveolar macrophages following in vivo hyperoxia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7 (5), 548 - 55. 1992.
163. Sittipunt C, Steinberg KP, Ruzinski JT, Myles C, Zhu S, Goodman RB, Hudson LD, Matalon S, Martin TR. Nitric oxide and nitrotyrosine in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 163 (2), 503 - 10. 2001.
164. Smith LJ. Hyperoxic lung injury: biochemical, cellular, and morphologic characterization in the mouse. *J Lab Clin Med* 106 (3), 269 - 78. 1985.
165. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150 ( 1), 76-85. 1985.
166. Spink J, Evans T. Binding of the transcription factor interferon regulatory factor-1 to the inducible nitric-oxide synthase promoter. *J Biol Chem* 272 (39), 24417 - 25. 1997.
167. Staudinger T, Mullner M, Wagner A, Locker GJ, Laczika K, Knapp S, Burgmann H, Stoiser B, Kofler J, Frass M. Experiences with inhalative nitric oxide in internal medicine intensive care patients with adult respiratory distress syndrome. *Acta Med Austriaca* 25 (2), 53 - 6. 1998.

168. Steudel W, Kirmse M, Weimann J, Ullrich R, Hromi J, Zapol WM. Exhaled nitric oxide production by nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med* 162 (4 Pt 1), 1262 - 7. 2000.
169. Stogner SW, Payne DK. Oxygen toxicity. *Ann Pharmacother* 26 (12), 1554 - 62. 1992.
170. Stuhr LE, Gjerde EA, Thorsen E, Reed RK. Effects of normobaric hyperoxia on water content in different organs in rats. *Acta Physiol Scand* 176 (1), 13 - 6. 2002.
171. Tateda K, Deng JC, Moore TA, Newstead MW, Paine R 3<sup>rd</sup>, Kobayashi N, Yamaguchi K, Standiford TJ. Hyperoxia mediates acute lung injury and increased lethality in murine legionella pneumonia: the role of apoptosis. *J Immunol* 170 (8), 4209 - 16. 2003
172. Taylor BS, de Vera ME, Ganster RW, Wang Q, Shapiro RA, Morris SM, Jr Billiar TR, Geller DA. Multiple NF-kappaB enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 273 (24), 15148 - 56. 1998.
173. Thiery J, Teupser D, Walli AK, Ivandic B, Nebendahl K, Stein O, Stein Y, Seidel D. Study of causes underlying the low atherosclerotic response to dietary hypercholesterolemia in a selected strain of rabbits. *Atherosclerosis* 121 (1), 63 - 73. 1996.
174. Tsan MF, White JE, Michelsen PB, Wong GH. Pulmonary O<sub>2</sub> toxicity: role of endogenous tumor necrosis factor. *Exp Lung Res* 21 (4), 589 - 97. 1995.
175. Turanlahti M, Pesonen E, Lassus P, Andersson S. Nitric oxide and hyperoxia in oxidative lung injury. *Acta Paediatr* 89 (8), 966 - 70. 2000.
176. Utaisincharoen P, Tangthawornchaikul N, Kespichayawattana W, Chaisuriya P, Sirisinha S. Burkholderia pseudomallei interferes with inducible nitric oxide synthase (iNOS) production: a possible mechanism of evading macrophage killing. *Microbiol Immunol* 45 (4), 307 - 13. 2001.

177. van der Vliet A, Cross CE. Oxidants, nitrosants, and the lung. *Am J Med* 109 (5), 398 - 421. 2000.
178. Vangala RR, Kritzler K, Schoch G, Topp H. Induction of single-strand breaks in lymphocyte DNA of rats exposed to hyperoxia. *Arch Toxicol* 72 (4), 247 - 8. 1998.
179. Vozzelli MA, Mason SN, Whorton MH, Auten Jr RL. Antimacrophage chemokine treatment prevents neutrophil and macrophage influx in hyperoxia-exposed new-born rat lung. *Am J Physiol* 286 (3), L488 - 93. 2004.
180. Waheed S, D'Angio CT, Wagner CL, Madtes DK, Finkelstein JN, Paxhia A, Ryan RM. Transforming growth factor alpha (TGF(alpha)) is increased during hyperoxia and fibrosis. *Exp Lung Res* 28 (5), 361 - 72. 2002.
181. Wang MJ, Jeng KC, Shih PC. Differential expression and regulation of macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-2 genes by alveolar and peritoneal macrophages in LPS-hyporesponsive C3H/HeJ mice. *Cell Immunol* 204 (2), 88 - 95. 1999.
182. Whitsett JA. Intrinsic and innate defenses in the lung: intersection of pathways regulating lung morphogenesis, host defense, and repair. *J Clin Invest* 109 (5), 565 - 9. 2002.
183. Wort SJ, Mitchell JA, Evans TW. Inducible nitric oxide synthase: a tissue-specific affair? *Am J Physiol* 280 (3), L387 - 9. 2001.
184. Wu M, He YH, Kobune M, Xu Y, Kelley MR, Martin WJ 2nd. Protection of human lung cells against hyperoxia using the DNA base excision repair genes hOgg1 and Fpg. *Am J Respir Crit Care Med* 166 (2), 192 - 9. 2002.
185. Xie QW, Whisnant R, Nathan C. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 177 (6), 1779 - 84. 1993.

186. Yoshida M, Xia Y. Heat shock protein 90 as an endogenous protein enhancer of iNOS. *J Biol Chem* 278 (38), 36953 - 8. 2003.
187. Young KJ, Gwang JH. Down-regulation of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha expression by bisphenol A via nuclear factor-kappaB inactivation in macrophages. *Cancer Lett* 196 (1), 69 - 76. 2003.
188. Zabel P. Tumor necrosis factor--friend and enemy. *Pneumologie* 50 (4), 293 - 302. 1996.
189. Zapol WM, Rimar S, Gillis N, Marletta M, Bosken CH. Nitric oxide and the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 149 (5), 1375 - 80. 1994.
190. Zhang X, Shan P, Sasidhar M, Chupp GL, Flavell RA, Choi AMK, Lee PJ. Reactive oxygen species and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase mediate hyperoxia-induced cell death in lung epithelium. *Am J Resp Cell Mol Biol* 28, 305 - 15. 2003.

## 7 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2001 bis August 2003 unter der Leitung von Professor Dr. med. vet. F. Krombach am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. An dieser Stelle möchte ich mich bei einer Reihe von Personen bedanken, durch deren stets freundliche, hilfreiche und tatkräftige Unterstützung die Durchführung dieser Studie möglich wurde.

Allen voran gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Meßmer, ehemaliger Direktor des Instituts für Chirurgische Forschung, für die freundliche Aufnahme an sein Institut.

Herrn Prof. Dr. med. vet. F. Krombach möchte ich danken für die Vergabe dieses sehr interessanten Themas. Durch seine jederzeit bereitwillige und kompetente Unterstützung und Anregung zur Diskussion wurde die Fertigstellung meiner Arbeit unterstützt.

Ein ganz herzlicher Dank gilt Frau Dr. rer. nat. M. Kiefmann, die mich in ihr Team aufgenommen und in die Methodik eingearbeitet hat. Ihrer unermüdlichen Geduld und stets tatkräftigen Hilfe, sowie ihren wertvollen, kreativen Anregungen ist die Durchführung und das Schreiben dieser Arbeit zu verdanken.

Frau A. Schropp, Frau Ch. Csapó und besonders Frau A.-M. Allmeling danke ich für ihre unermüdliche, immer fortwährende Unterstützung bei der Laborarbeit.

Herrn Dr. med. Ch. Kupatt von der Medizinischen Klinik I der Universität München - Großhadern und seiner Mitarbeiterin Frau E. Ronft gilt mein Dank für die Durchführung der EMSA-Analysen.

Bei den Tierpflegerinnen und Tierpflegern des Instituts, allen voran bei der Leiterin Frau B. Blount, möchte ich mich für die liebevolle Pflege und Aufzucht der Tiere bedanken.

Schließlich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Chirurgische Forschung, die mich bei meiner Arbeit in Gesprächen und Diskussionen, mit vielen interessanten Anregungen und nicht zuletzt durch die freundliche Atmosphäre unterstützt haben, ein herzliches Dankeschön.

## 8 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Anne-Karin Hesse, geb. Kreuz  
Geburtsdatum: 30. Mai 1978  
Geburtsort: Haselünne/Emsland  
Familienstand: verheiratet

### Schulbildung:

1984 - 1988 Grundschule Königswieser Strasse, München  
1988 - 1997 Gymnasium Fürstenried West, München  
27.06.1997 Abitur

### Hochschulbildung:

1997 - 2003 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München  
2002 - 2003 Praktisches Jahr  
*1. Tertial:* Chirurgie, Städtisches Krankenhaus München-Harlaching, Ludwig-Maximilians-Universität München  
*2. Tertial:* Innere Medizin, Kantonsspital Basel, Universität Basel, Schweiz  
*3. Tertial:* Wahlfach Pädiatrie, Kinderklinik, Zentralklinikum Augsburg, Ludwig-Maximilians-Universität München  
17.11.2003 3. Staatsexamen

### Berufliche Tätigkeiten:

Seit 01.01.2004 Ärztin im Praktikum, Kinder- und Jugendmedizin  
Krankenhaus St. Elisabeth und St. Barbara, Halle