

Aus der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss von inhaliertem Kohlenmonoxid auf die hypoxisch  
pulmonale Vasokonstriktion (HPV) während Sepsis im Modell  
der isoliert perfundierten Mäuselunge

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Daniel David Oswald

aus Stuttgart

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. J. Weimann  
2. Prof. Dr. med. W. M. Kübler  
3. Prof. Dr. Dr. h.c. K. Geiger

**Datum der Promotion: 22.11.2008**

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>- 3 -</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>- 5 -</b>
1.1 DIE HYPOXISCH PULMONALE VASOKONSTRIKTION (HPV) .....	- 5 -
1.2 DAS AKUTE LUNGENVERSAGEN (ARDS).....	- 6 -
1.3 DIE HÄM-OXYGENASE (HO) .....	- 8 -
1.4 KOHLENMONOXID (CO) .....	- 11 -
1.5 ZIELSETZUNG .....	- 15 -
<b>2 MATERIAL UND METHODIK</b> .....	<b>- 16 -</b>
2.1 TIERE .....	- 16 -
2.2 ISOLIERT PERFUNDIERTES UND VENTILIERTES MÄUSEMODELL .....	- 16 -
2.3 QUANTIFIZIERUNG DER HYPOXISCH PULMONALEN VASOKONSTRIKTION .....	- 19 -
2.4 BESTIMMUNG DES CO-Hb .....	- 19 -
2.5 MODELL DER ENDOTOXINÄMIE .....	- 19 -
2.6 CO-EXPOSITION.....	- 20 -
2.7 VERSUCHSPROTOKOLL.....	- 22 -
2.8 NASS-/TROCKEN-ANTEIL DER LUNGEN .....	- 23 -
2.9 STATISTISCHE ANALYSE .....	- 23 -
<b>3 ERGEBNISSE</b> .....	<b>- 24 -</b>
3.1 EINFLUSS VON ENDOTOXIN (LPS) AUF DIE HPV .....	- 25 -
3.2 EINFLUSS VON INHALIERTEM CO AUF DIE HPV .....	- 25 -
3.3 CO-Hb WÄHREND CO EXPOSITION .....	- 27 -
3.4 CO EXPOSITION IN 50% SAUERSTOFF VERSUS IN AIR .....	- 29 -
3.5 NASS-/TROCKEN-VERHÄLTNIS DER LUNGEN .....	- 30 -
<b>4 DISKUSSION</b> .....	<b>- 31 -</b>
4.1 DIE VERMINDERUNG DER HPV WÄHREND ENDOTOXÄMIE .....	- 31 -
4.2 DER PROTEKTIVE EFFEKT VON KOHLENMONOXID .....	- 32 -
4.3 DOSISEFFEKT VON KOHLENMONOXID.....	- 34 -
4.4 CO-Hb .....	- 35 -
4.5 WAS BEDEUTET DAS FÜR DIE KLINIK? .....	- 37 -
4.6 KRITISCHE AUSEINANDERSETZUNG MIT DEM EXPERIMENTELLEN ANSATZ .....	- 38 -
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>- 39 -</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>- 40 -</b>
<b>7 LEBENS LAUF</b> .....	<b>- 51 -</b>
<b>8 DANKSAGUNG</b> .....	<b>- 52 -</b>
<b>9 ERKLÄRUNG AN EIDES STATT</b> .....	<b>- 53 -</b>

---

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ALI	“acute lung injury”, akute Lungenschädigung
ARDS	„acute respiratory distress syndrome“, akutes Lungenversagen
ANOVA	„analysis of variance“, Varianzanalyse
AZV	Atemzugvolumen
cGMP	3':5'-cyklisches Guanosinmonophosphat
CO	„carbon monoxide“, Kohlenmonoxid
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CO-Hb	Carboxyhämoglobin
ERK	“extracellular signal regulated kinase”, extrazellulär-regulierende Signalkinase
Fe	“ferritin”, Eisen
FiO <sub>2</sub>	inspiratorische Sauerstofffraktion
HO	Hämoxygenase
HPV	Hypoxisch Pulmonale Vasokonstriktion
HSF 1	Hitzeschockfaktor 1
HSP 70	Hitzeschockprotein 70
iCO	„inhaled carbon monoxide“, inhaliertes Kohlenmonoxid
i.p.	intraperitoneal
IL	Interleukin
JNK	c-jun NH <sub>2</sub> terminal kinase
LAP	„left atrial pressure“, linksartialer Druck
L-NAME	N <sub>ω</sub> -Nitro-L-Argine methyl Ester
LPS	Lipopolysaccharid
LSD	least significant difference
MAPK	„mitogen activated protein kinase“, mitogenaktivierte Proteinkinase
MIP1 $\alpha$	“macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$ “, Makrophagen-Inflammationsprotein
MW	Mittelwert
NO	„nitric oxide“, Stickstoffmonoxid
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
paO <sub>2</sub>	arterieller Sauerstoffpartialdruck

PAP	„pulmonary artery pressure“, pulmonalarterieller Druck
PAWP	„pulmonary artery wedge pressure“, pulmonalarterieller Verschlussdruck
PCWP	„pulmonary capillary wedge pressure“, pulmonalkapillärer Verschlussdruck
PEEP	„positive endexpiratory pressure“, positiver endexpiratorischer Plateaudruck
PIP	„peak inspiratory pressure“, inspiratorischer Spitzendruck
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
ppm	„parts per million“, Teile pro Million
Q	Fluss
SD	Standardabweichung
SIRS	„systemic inflammatory response syndrome“, Systemisches inflammatorisches Response Syndrom
sGC	„soluble guanylate cyclase“, lösliche Guanylatzyklase
TNF- $\alpha$	„tumor necrosis factor alpha“, Tumornekrosefaktor alpha
V	Ventilation

## 1 EINLEITUNG

Die vorliegende Arbeit stellt den Zusammenhang zwischen inhaliertem Kohlenmonoxid und dem möglichen Einfluss auf die hypoxisch-pulmonale Vasokonstriktion während Sepsis im Modell der isoliert perfundierten Mäuselunge dar.

### 1.1 Die Hypoxisch Pulmonale Vasokonstriktion (HPV)

Die Hypoxisch Pulmonale Vasokonstriktion wurde erstmals 1894 von Bradford und Dean beschrieben [13] und später nach den Autoren einer Publikation eingehender Untersuchungsergebnisse von 1946 als „Von-Euler-Liljestrand-Reflex“ bezeichnet [121]. Hierunter versteht man die Konstriktion der pulmonalen Mikrozirkulation (Gefäßdurchmesser ca. 30 – 300  $\mu\text{m}$ ) als Antwort auf einen erniedrigten pulmonalen Sauerstoffpartialdruck. Die Existenz der HPV wurde bei allen bekannten Säugetieren nachgewiesen [23].

Durch die HPV kommt es zur regionalen Anpassung der pulmonalen Perfusion an die Ventilation. Besteht in einem Lungenareal eine Minderbelüftung, so wird durch den Mechanismus der HPV der Blutfluss in diesem gedrosselt und in andere, besser ventilerte, Areale umgeleitet. Dadurch entsteht eine Verminderung der intrapulmonalen Shuntperfusion und damit eine Optimierung des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks ( $\text{paO}_2$ ) [9, 23, 119]. Eine systemische Hypoxämie wird verhindert [131].

Durch Ventilation mit einem hypoxischen Gasgemisch kann experimentell eine Vasokonstriktion der präkapillären Arteriolen innerhalb von 30 – 60 Sekunden ausgelöst werden, die nach Minuten ein Maximum erzielt und über Stunden konstant gehalten werden kann [2, 46]. Diese Reaktion des pulmonalen Gefäßbettes steht im Gegensatz zur übrigen systemischen Zirkulation, wo eine Hypoxämie eine Vasodilatation zur Folge hat [89].

Das genaue Zusammenspiel zwischen Sensor und Effektor ist nach aktuellem Wissensstand nicht genau geklärt.

Bezüglich des Effektors der HPV konnten in den letzten Jahren einige Fortschritte verzeichnet werden und es wurde bekannt, dass den Kaliumkanälen eine zentrale Rolle zugesprochen werden kann.

Insbesondere die spannungsabhängigen Kaliumkanal-Untergruppen Kv1.5, Kv2.1, Kv1.2/Kv1.5 und Kv2.1/Kv9.3 sind hierbei zu erwähnen [4, 6, 33, 81, 84].

Unter Normoxie besitzen membranständige, O<sub>2</sub>-sensitive Kaliumkanäle eine hohe Leitfähigkeit und sind hierdurch entscheidend an der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotenzials der pulmonalen Gefäßmuskelzelle beteiligt.

Unter Hypoxie verändert sich die Kaliumleitfähigkeit der Muskelzelle. Sie nimmt ab, was zur Folge hat, dass vermehrt Kalium in der Zelle verbleibt und es zu einer Depolarisation der Zellmembran kommt. Hierdurch öffnen sich spannungsabhängige L-Typ-Kalzium-Kanäle mit nachfolgender Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration. In Folge dessen kommt es zu einer Konstriktion der pulmonalen glatten Gefäßmuskelzellen [33, 84, 128].

Bezüglich des Sensoreffektes herrschen nach aktuellem Wissensstand zwei Theorien. Einerseits wird die Beteiligung der Atmungskette, andererseits der Redoxstatus der Zelle als Sensor in Betracht gezogen [2, 3, 50, 65].

Insbesondere im Rahmen von Erkrankungen, wie der Pneumonie oder dem akuten Lungenversagen („acute respiratory distress syndrome“; ARDS), die mit einer ausgeprägten, vor allem entzündlichen Lungenschädigung, einhergehen, kann der Mechanismus der HPV beeinträchtigt werden [119]. Die daraus resultierende Shuntperfusion führt zu einer Hypoxämie, welche eine zusätzliche Verschlechterung des Krankheitszustandes zur Folge hat [137].

### **1.2 Das akute Lungenversagen (ARDS)**

Das akute Lungenversagen wurde als solches erstmals 1967 durch Ashbough et al. beschrieben [7]. Es bezeichnet eine akute Funktionsstörung des pulmonalen Gasaustausches, welche mit pulmonaler Flüssigkeitseinlagerung, Veränderungen der pulmonalen Hämodynamik und Abnahme der Compliance assoziiert ist [40].

Die Inzidenz liegt nach neueren Untersuchungen zwischen 1,5 und 8,3 pro 100.000 Einwohnern [51, 107, 117, 118], die Letalität, je nach Alter und Ursache des ARDS, zwischen 28% und 42% [72, 97, 138].

Einerseits können direkte Lungenparenchymschädigungen, wie Aspiration von Magensaft („Mendelson-Syndrom“), Kontusion, inflammatorische Prozesse (wie bei Sepsis) und schwere Pneumonie ein ARDS auslösen; andererseits können schwerwiegende

Schädigungen anderer extrapulmonaler Organsysteme sekundär zum ARDS führen. Typische Beispiele für extrapulmonale Organsysteme sind ein protrahiertes Schockgeschehen oder eine akute Pankreatitis [27, 45].

Trotz der Heterogenität der Ätiologie kommt es letztlich zur Ausbildung einer sich selbst unterhaltenden inflammatorischen Reaktion des Lungenparenchyms.

Eine einheitliche Definition des ARDS wurde auf der Konferenz des „American-European Consensus Committee on ARDS“ erarbeitet [12]. Kriterien für das Vorhandensein eines ARDS sind hiernach ein verminderter Quotient aus arteriellem Sauerstoff-Partialdruck ( $\text{PaO}_2$ ) und dem der inspiratorischen Sauerstofffraktion ( $\text{FiO}_2$ ) auf  $\leq 200$  mmHg (Oxygenierungsindex nach Horowitz). Neben dem akuten Beginn der respiratorischen Insuffizienz müssen außerdem im Röntgen-Thorax ausgeprägte, bilaterale Infiltrate sowie ein pulmonaler Kapillarverschlussdruck (PCWP, Wedge-Druck)  $\leq 18$  mmHg zum Ausschluss eines akuten oder chronischen Linksherzversagens vorhanden sein.

Es gibt keinen einheitlichen pathogenetischen Verlauf beim ARDS; allerdings mündet trotz der Vielzahl der involvierten humoralen Mediatoren (Eikosanoide, Sauerstoffradikale, Proteasen, Zytokine, Plättchenaktivierender-Faktor, Gerinnungs-Kaskade, Komplement-Kaskade und Kallikrein-Kinin-Kaskade) wie auch zellulären Effektoren (aktivierte Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen und Pneumozyten Typ II) das Geschehen in eine gemeinsame Endstrecke, die das vaskuläre, interstitielle und alveoläre Kompartiment der Lunge betrifft [133].

Die Pathogenese des ARDS kann man formal in eine Früh- und Spätphase einteilen.

In der frühen Phase besteht eine generalisierte Inflammation der Lunge. Hierbei kommt es wegen einer progredienten Permeabilitätserhöhung des Alveolar- und Kapillarendothels zum Einstrom proteinreicher Flüssigkeit in das Interstitium und den Alveolarraum [137].

Darüber hinaus kommt es unter anderem durch eine Verminderung der Surfactantbildung zu einer alveolären Instabilität mit Ausbildung von atelektatischen Lungenarealen und einer schwerwiegenden Störung des Ventilations-/Perfusionsverhältnisses ( $V_A/Q$ ) mit Ausbildung eines erhöhten intrapulmonalen Rechts-Links-Shunts ( $Q_s/Q_t$ ) [43, 95]. Infolge einer sich entwickelnden pulmonalen Hypertonie kommt es zur Verstärkung des interstitiellen Lungenödems und zum Cor pulmonale mit rechtsventrikulärer Dysfunktion [57, 96] bis hin zum Rechtsherzversagen [116, 118]. Neben der durch das Lungenödem verursachten Abnahme der pulmonalen Diffusionskapazität und sich ausbildenden

Atelektasen spielt die Zunahme der Shuntperfusion bei der Ausbildung einer schwerwiegenden Hypoxämie im Rahmen des ARDS eine wichtige Rolle [137].

Neben der kausalen Behandlung der Grunderkrankung werden supportive Behandlungsstrategien angewendet, die zwar die Symptomatik bessern, für die jedoch keine Letalitätssenkung gezeigt werden konnte [59].

Hierzu zählen die Negativbilanzierung des Patienten sowie die Therapie mit pulmonalen Vasodilatoren.

In der medikamentösen Therapie des ARDS wurden intravenöse Vasodilatoren, wie das Prostacyclin [85] zur Senkung der pulmonalen Hypertension erprobt. Intravenöse Vasodilatoren führen zwar zur Senkung des pulmonalarteriellen Drucks („PAWP; pulmonary artery wedge pressure“), jedoch auch zu einer Zunahme des intrapulmonalen Shunts und zu einer systemischen Vasodilatation mit Hypotension [123].

Demgegenüber kann durch eine selektive pulmonale Vasodilatation, z.B. durch inhalierbares Stickstoffmonoxid (iNO) eine Verbesserung der Oxygenierung, insbesondere beim schweren ARDS erreicht werden. Es zeigte sich jedoch, dass dies hauptsächlich bei septischen Patienten nur in ungefähr der Hälfte der Fälle möglich ist [126].

### 1.3 Die Häm-Oxygenase (HO)

Die Hämoxygenase wurde 1968 von Tenhunen et al. als das Schlüsselenzym des Häm-Abbaus beschrieben [104, 105].

Heute sind 3 Isoformen der Hämoxygenase – HO-1, HO-2 und HO-3 – bekannt.

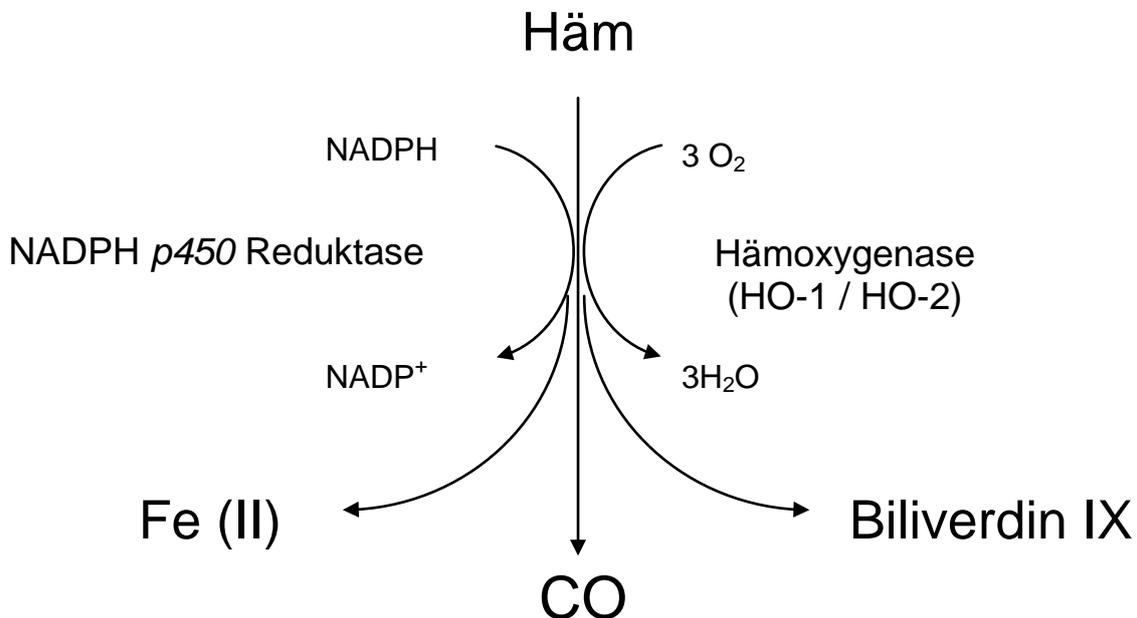
Von diesen sind HO-2 und HO-3 *konstitutiv* exprimiert [63, 64], während die HO-1 als Antwort auf bestimmte Stimuli induziert wird [54-56]. So führen verschiedenste zelluläre Noxen, wie Hitze, ultraviolette Strahlung, Endotoxin (LPS; Lipopolysaccharid), Schwermetalle, Hypoxie oder entzündliche Zustände zu einer Induktion der HO-1 [1, 53, 110, 115]

Neuere Untersuchungen belegen *in vitro* und *in vivo* die Annahme, dass die endogene Aktivierung der HO-1 potente zytoprotektive Effekte vermittelt [36, 98]. Diese Effekte sind in Studien, sowohl in Tierexperimenten (Maus, Ratte, Hase und Schwein), als auch in humanen Zellexperimenten nachgewiesen worden (siehe Tabelle 1)

<b>Effekt der Induktion der HO-1</b>	<b>Tiermodell/Zellart</b>	<b>Induktion der HO-1 durch</b>
<b>1. Anti-oxidativ und Anti-inflammatorisch</b>		
Verhinderung der Leukozyten-adhäsion	Ratten [39]	Vorbehandlung mit Hämin
Senkung der Pro-Inflammatorischen Antwort	Maus-Endothelzellen [48]	Vorbehandlung mit Hämin-Arginat
Unterbindung der iNOS Aktivität	Maus [114]	Vorbehandlung mit Hämin
Senkung der Mukosomalen Verletzung	Ratten [111]	Vorbehandlung mit Glutamin
Senkung der Zytokin-Proteine	Maus [136]	Transgenetische HO-1 Überproduktion
<b>2. Anti-apoptotisch</b>		
Unterdrückung der der Kaspase-3-Aktivierung	Maus [94]	Vorbehandlung mit Kobalt-Porphyrin
Senkung des apoptotischen Zelltods	Maus [25]	Vorbehandlung mit Endotoxin
Schutz vor TNF-induzierten Zelltod	Maus-Pankreas $\beta$ -Zellen [109]	Transfektion und Überproduktion von HO-1
Schutz vor Pseudomonas-induzierten Zelltod	Humane Epithelzellen von CF-Patienten [140]	Transfektion und Überproduktion von HO-1
<b>3. Schutz vor Ischämie/Reperfusion (I/R)</b>		
Verkleinerung des Herzinfarktgebietes	Ratten [37]	Vorbehandlung mit Hämin
Schutz vor mukosomalem I/R-Schaden	Ratten [8]	Vorbehandlung mit Hämin
<b>4. Schutz vor neurodegenerativen Veränderungen</b>		
Senkung der Aktivität der mitochondrialen Atemwegskette	Ratten-Astrozyten [18]	Vorbehandlung mit Acetyl-L-Carnitin
<b>5. Verschiedene Effekte</b>		
Zytoprotektion	Ratten [30]	Traumatische Hirnschädigung
Schutz vor letaler LPS-Dosis in der Lunge	Ratten [76]	Zugabe von Hämoglobin
Milderung der künstlich erzeugten Nephritis	Ratten [71]	Vorbehandlung mit Hämin
Schutz vor zellulärem Stress bei künstlich erzeugten Darmerkrankungen	Ratten [124]	Überproduktion durch Trinitrobenzen-sulfonsäure

**Tabelle 1:** Die Tabelle zeigt die Effekte durch Induktion der HO-1

Als mögliche Mediatoren dieser HO-1-Effekte kommen die beim Häm-Abbau entstehenden Nebenprodukte Kohlenmonoxid („carbon monoxide“; CO), Biliverdin sowie Ferritin in Frage (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Häm wird über die Hämoxygenase zu Kohlenmonoxid, Biliverdin und 2-wertiges Eisen (Fe(II)) abgebaut.

Biliverdin selbst, wie auch das durch seinen Abbau entstehende Bilirubin, besitzen potente anti-oxidative Effekte. So konnte gezeigt werden, dass Biliverdin zu einer Absenkung der Inflammation in einem Colitis-Modell führte [11]. In einer Studie von Clark et al. konnte gezeigt werden, dass Bilirubin eine protektive Rolle bei ischämischem Herzinfarkt zugesprochen werden kann. Hierbei stellte Bilirubin einerseits die myokardiale Funktion wieder her, andererseits verringerte sich die Infarktgröße und der mitochondriale Schaden [20, 113]. In einem Modell, in welchem durch LPS ein akutes Lungenversagen induziert wurde, konnte der anti-inflammatorische Effekt von Bilirubin bewiesen werden [91].

Ferritin kann in einem Ischämie-Reperusionsmodell der Leber durch Hemmung der endothelialen Zell- und Hepatozyten-Apoptose die Leber schützen [10].

Das dritte Reaktionsprodukt des Häm-Abbaus, Kohlenmonoxid, besitzt auf zellulärer Ebene vielfältige Effekte, die im Folgenden beschrieben werden.

## 1.4 Kohlenmonoxid (CO)

Kohlenmonoxid (CO) ist ein farb-, geruch- und geschmackloses Gas, das aufgrund seiner, im Vergleich zu Sauerstoff, 217-fach höheren Bindungskapazität an Hämoglobin seit dem 18. Jahrhundert als ein toxisches, potenziell letales Gas bekannt ist [26, 83]. Aus diesem Grund wurde ihm keine therapeutische Bedeutung zugemessen.

Coburn et al. konnten im Jahr 1963 jedoch zeigen, dass CO endogen im Organismus von Tier und Mensch gebildet wird [22]. In den letzten Jahren rückte CO in den Vordergrund der Forschung, denn es stellte sich heraus, dass durch endogen generiertes CO wichtige physiologische Mechanismen gesteuert werden.

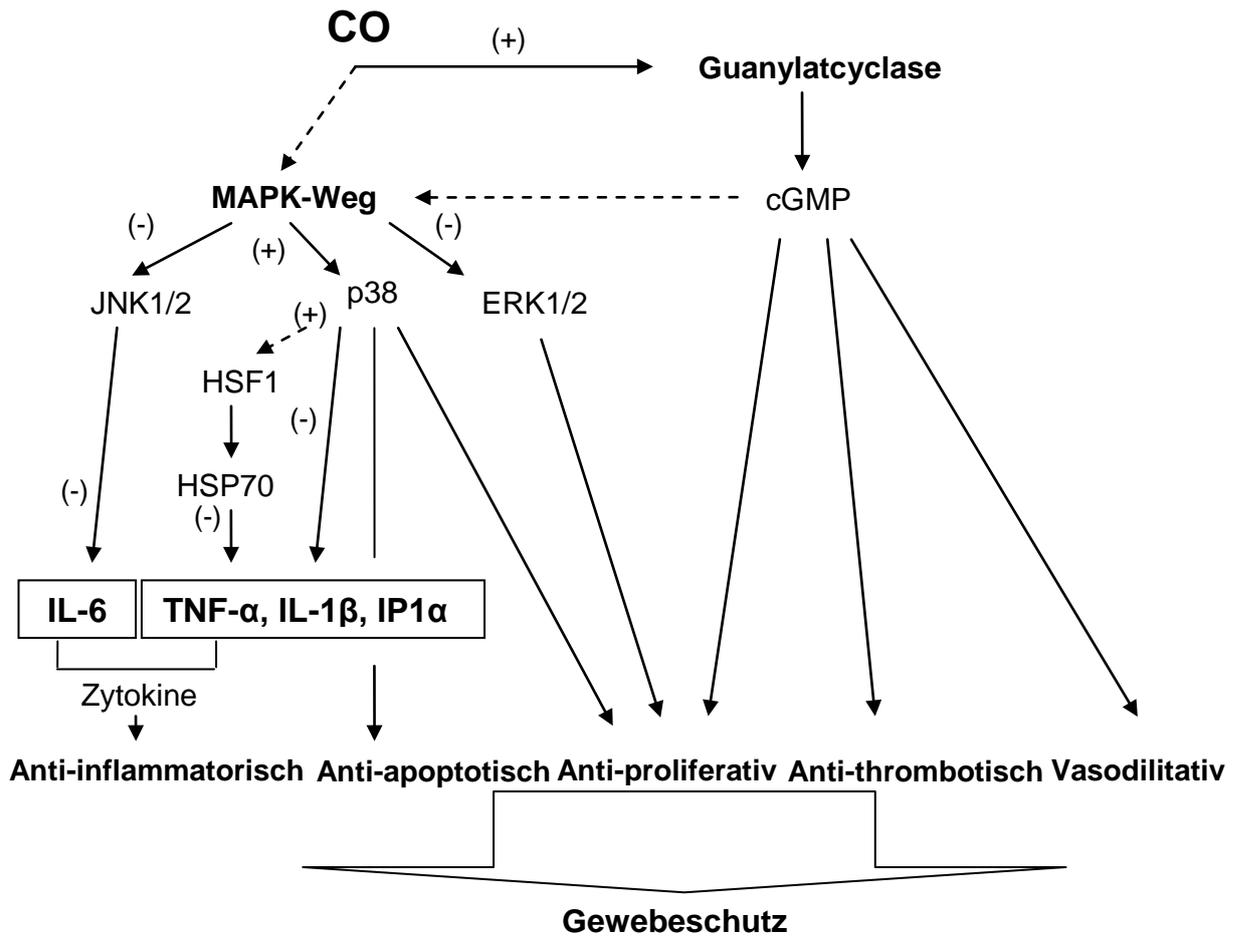
Aktuelle Forschungsdaten zeigen, dass CO grundlegenden Einfluss auf intrazelluläre Signalwege hat, welche vasoregulative, anti-inflammatorische, anti-proliferative, anti-apoptotische und anti-thrombotische Effekte mit sich bringen (Abbildung 2).

Die genauen Mechanismen für die physiologischen Signal-Effekte sind jedoch nur unvollständig bekannt. Es scheinen jedoch zwei entscheidende Wege für die Vermittlung des CO-Effekts verantwortlich. Einerseits die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase („soluble guanylate cyclase“; sGC) und die damit verbundene Stimulation der cGMP-Produktion (cyklisches Guanosinmonophosphat), welcher der am besten erforschte Mechanismus ist. Hierüber werden anti-proliferative, anti-thrombotische und vasodilatative Effekte vermittelt. Andererseits der MAPK (Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase)-Weg, der unabhängig von cGMP aktiviert wird, jedoch möglicherweise zusätzlich von cGMP beeinflusst werden kann. Anti-inflammatorische, anti-apoptotische und anti-proliferativ beeinflussen diese Aktivierung den CO-Effekt. Weitere Wege sind im Moment nicht bekannt (siehe Abbildung 2)

Effekte von CO über cGMP:

Wie der klassische Agonist der sGC, das NO, so bindet auch CO direkt an das Hämion der sGC und stimuliert so dessen Aktivität jedoch mit einer ca. 30-100 mal schwächeren als NO [31, 47, 55, 103]. Die Bedeutung von CO bei der Aktivierung der sGC steigt in Zellen oder Gewebe mit wenig endogener NO-Produktion. Diese Regulation der cGMP-Produktion konnte in glatten Gefäßmuskelzellen gezeigt werden [31].

Die vasodilatative Eigenschaft von CO hängt von der Stimulation der sGC und folglich von der Erhöhung der cGMP ab. Während Hypoxie wird vermehrt endogen CO produziert, wodurch es zur Vasodilatation kommt [68, 87].



**Abbildung 2:** Das Schaubild zeigt die möglichen Signalwege von CO, die zum Gewebeschutz beitragen.

CO kann einerseits, genau wie der klassische Regulator NO, die lösliche Guanylatcyclase aktivieren, wodurch cGMP entsteht.

Andererseits kann auch der MAPK-Weg mit seinen p38, ERK („extracellular signal regulated kinase“) und JNK („c-jun NH<sub>2</sub> terminal kinase) aktiviert werden. Diese Wege sind im Moment der Stand der Dinge, andere Wege können nicht ausgeschlossen werden. CO kann eine generelle Downregulation von proinflammatorisch-wirkenden Zytokinen über den p38-MAPK-abhängigen Weg erreichen, wodurch sein antiinflammatorischer Effekt zustande kommt. Der Hitzeschockfaktor 1 (HSF1) und das Hitzeschockprotein 70 (HSP70) wirken als mögliche Nebenfaktoren. Die möglichen physiologischen Effekte von CO sind ferner antiapoptotisch, anti-proliferativ, anti-thrombotisch und vasodilatativ.

Die Vasodilatation ist einerseits mit NO vergesellschaftet [108], andererseits ist CO auch in der Lage den Gefäßtonus durch die Hemmung des Vasokonstriktors Endothelin-1 zu verändern [66].

Der anti-thrombotische Effekt wurde in Zusammenhang mit einer Hemmung der Thrombozytenaggregation durch CO über eine Vervierfachung der cGMP-Werte beschrieben [16].

Der anti-proliferative Effekt vermittelt durch CO kann anhand der Vorgänge bei Hypoxie beschrieben werden. Hierbei führt das von glatten Gefäßmuskelzellen vermehrt gebildete CO zu einer Verhinderung der Proliferation. Wird jedoch, mittels Hämoglobin, das freie CO gebunden, so kommt es zur Proliferation der glatten Muskelzellen [67].

MAPK-Weg-vermittelte Effekte von CO:

Auch dieser Weg steuert anti-proliferative Effekte. In der Expirationsluft von Asthmatikern können erhöhte CO-Werte gemessen werden. In Untersuchungen von glatten Muskelzellen der menschlichen Atemwege von Asthmatikern konnten die erhöhten CO-Werte auf eine Hochregulierung der CO-Produktion zurückgeführt werden, wodurch eine Regulierung der Proliferation der Zellen bestand [100].

Der für diese Arbeit wichtigste und wohl am genauesten bekannte Effekt von CO, die anti-inflammatorische Komponente, konnte in verschiedenen Modellen der Sepsis, in Zellkulturen, wie auch in Mäusen nachgewiesen werden [70, 77]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass in vitro, bei durch LPS-induzierter Sepsis, durch HO-1 überproduzierende Zellen ein Absinken pro-inflammatorischer Enzyme, wie TNF- $\alpha$  und Interleukin-1 $\beta$  erreicht werden konnte. Um zu beweisen, dass dieser Effekt, bei dem es zeitgleich auch zu einem Anstieg von anti-inflammatorischen Enzymen, wie Interleukin-10 kam, auf CO und nicht auf den Effekt von Biliverdin zurückzuführen ist, wurde der Zellreihe exogenes CO zugeführt. Hierbei konnten die gleichen Beobachtungen gemacht werden [70, 77].

Der anti-apoptotische Effekt, der CO zugesprochen werden kann, wurde in Endothelzellen gezeigt. Hier kam es zur Unterbindung der TNF- $\alpha$ -induzierten Apoptose dank CO [15].

Exogen appliziertes CO wirkt bronchodilatativ, hemmt die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine in der Lunge, reduziert das konsekutive Lungenödem und vermindert die Proliferation pulmonalarterieller glatter Muskelzellen [61, 62, 73]. In verschiedenen Modellen des akuten Lungenversagens konnte gezeigt werden, dass exogen appliziertes CO eine Verminderung der Lungenschädigung und eine Verminderung der Entzün-

dungsreaktion bewirken kann und so letztendlich positiven Einfluss auf das Überleben hat [79, 80].

Des Weiteren konnte aufgezeigt werden, dass exogenes CO im Modell der Sepsis mit der Hemmung von Leukozyten und Makrophagen vergesellschaftet ist [92]. Überdies konnte in weiteren Sepsis-Modellen gezeigt werden, dass die pro-inflammatorischen Zytokine durch inhalatives CO gesenkt werden, anti-inflammatorische Zytokine gesteigert produziert werden und somit eine Verbesserung der Überlebenschancen gegeben ist [70, 75, 77, 93].

In den bisher durchgeführten Studien wurde der Einfluss von unterschiedlichen CO-Konzentrationen während Sepsis nicht untersucht.

In der aktuellen Literatur sind keine Daten bezüglich des Einflusses von inhaliertem CO auf die HPV während Sepsis vorhanden, weshalb sich die vorliegende Arbeit genau diesem Thema widmet.

## 1.5 Zielsetzung

Eine Verminderung der hypoxisch pulmonalen Vasokonstriktion (HPV), welche über ein Missverhältnis von Ventilation zu Perfusion zu zum Teil lebensbedrohlichen Hypoxämien führt, stellt eine der wesentlichen klinischen Probleme während der Behandlung von Patienten mit Sepsis oder ARDS dar.

Die Beschreibung einer anti-inflammatorischen Wirkung von inhaliertem CO (iCO) [77] führte zu der Grundhypothese der vorliegenden Arbeit:

Inhaliertes CO schützt vor der Entwicklung einer verminderten HPV während Sepsis.

In einem entsprechenden, bereits in der Arbeitsgruppe etabliertem Modell [102], wurde den folgenden spezifischen Fragestellungen nachgegangen:

1. Welchen Einfluss hat eine durch LPS induzierte Sepsis auf die HPV im isoliert perfundierten Mäusemodell?
2. Wird die HPV bei gesunden Versuchstieren durch die Applikation von CO beeinflusst?
3. Hat inhaliertes CO bei septischen Mäusen einen Einfluss auf die HPV? Gibt es eine signifikante Verbesserung der HPV gegenüber nicht CO-exponierten septischen Mäusen?
4. Gibt es eine Dosisabhängigkeit des inhalierten CO in Bezug auf die HPV?
5. Inwieweit wird der CO-Hb-Spiegel bei unterschiedlichen CO-Konzentrationen beeinflusst?

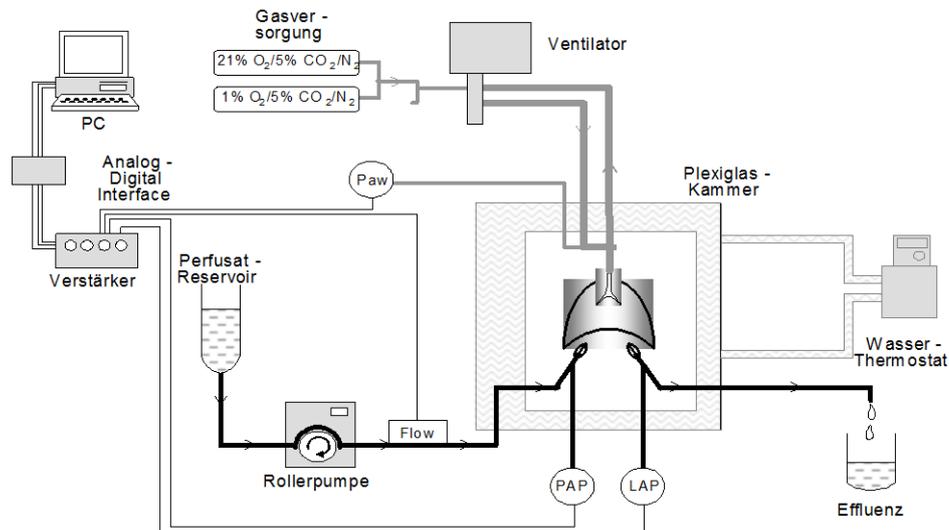
## 2 MATERIAL UND METHODIK

### 2.1 Tiere

Die vorliegende Arbeit wurde von der für Tierschutz zuständigen Behörde in Berlin (LAGetSI – Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit, Berlin, Tier-Genehmigungs-Nr. G0161/05 vom 28.12.2005) genehmigt. Es wurden im Modell der isoliert perfundierten Mäuselunge insgesamt 95 männliche Mäuse (C57BL/6) mit einem Körpergewicht von 20-32 g untersucht.

### 2.2 Isoliert perfundiertes und ventiliertes Mäusemodell

Das Modell der isoliert-perfundierten und ventilierten Mäuselunge ist schematisch in Abbildung 3 und das Labor-Setup in Abbildung 4 gezeigt.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung des Modells der isoliert perfundierten Mäuselunge (Details siehe Text)



**Abbildung 4:** Labor-Setup

Die Mäuse erhielten eine intraperitonealen letale Injektion von 400mg/Kg Körpergewicht Phenobarbital-Natrium (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) und wurden anschließend in eine 37 °C warme doppelwandige Kammer (Isoliert perfundierte Lunge Größe 1 Typ 839; Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) platziert.

Die Trachea wurde unter mikroskopischer Sicht (Mikroskop Leica MZ6 + Lichtquelle KL 1500LCD, Leica Microsystems AG, Wetzlar) frei präpariert, tracheotomiert, kanüliert und die Lunge mit einem Gasgemisch bestehend aus 21% Sauerstoff, 5% Kohlendioxid und 74% Stickstoff (Linde Gas AG, Leuna), mittels eines volumen-kontrollierten Beatmungsgerätes (MiniVent Type 845, Hugo Sachs, March-Hugstetten) bei einer Beatmungsfrequenz von 100/min, einem Tidalvolumen von 9 ml/kg KG und einem positiven endexpiratorischen Druck von 2 mmHg, beatmet.

Anschließend erfolgte eine Mittellinien-Sternotomie um die Lungen freizulegen, das Diaphragma mit einer feinen Schere eröffnet und 10 IE Heparin durch direkte Punktion des rechten Ventrikels injiziert.

Danach erfolgte die Anlage einer Ligatur um die aorto-pulmonale Ausflussbahn und der rechte Ventrikel wurde seitlich durch eine Inzision eröffnet. Die Pulmonalarterie wurde mit einer Edelstahl-Kanüle (interner Durchmesser 1 mm) über den rechten Ventrikel kanüliert. Um den linken Vorhof zu drainieren erfolgte die Kanülierung durch eine Edelstahl-Kanüle via linker Herzspitze und Mitralklappe. Als Perfusat diente eine modifizierte Pufferlösung („Hank's Balanced Salt Solution, Biochrom AG, Berlin), folgende Substanzen (in mM): 136,89 NaCl, 5,37 KCl, 0,34 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,44 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,26 CaCl<sub>2</sub>, 0,81 MgSO<sub>4</sub>, 5,56 D-Glucose, 4,17 NaHCO<sub>3</sub> enthaltend. Dem Perfusat wurde am Versuchstag 5% Dextran (Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen) und 5% bovines Albumin (Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen) zugesetzt. Zur Ödemvermeidung wurde des Weiteren 30 µM Indomethacin (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen) dem Perfusat beigemischt, um eine endogene Prostaglandin-Synthese zu unterbinden [38, 41, 102, 127]. Zur non-selektiven Blockade der endogenen NO-Synthese wurde dem Perfusat darüber hinaus 1 mM/L des NO-Syntheseantagonisten L-NAME (N<sup>ω</sup>-Nitro-L-Argininmethylester; Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen) [38, 44, 90, 127] hinzugefügt. Um einen pH-Wert zwischen 7,37-7,45 zu erhalten, erfolgte die Pufferung mit Natrium-Hydrogencarbonat 8,4% (B. Braun Melsungen AG, Melsungen).

Über einen Seitenanschluss der Perfusionskanülen wurde der pulmonal-arterielle Druck und der links-atriale Druck („left atrial pressure“; LAP) mittels kochsalz-gefüllten Membrandruckwandlern (Medex Medical GmbH & Co KG, Klein-Winterheim) und eines Verstärkers gemessen (DI-205-C, DATAQ Instruments, Akron, OH, USA). Diese Werte wurden mittels eines Analog-Digital-Wandlers (DI-700, DATAQ Instruments, Akron, OH, USA) an einem PC durch das Programm WinDaq™ Waveform Browser (DATAQ Instruments, Akron, OH, USA) aufgezeichnet.

Das komplette System wurde vor jeder Aufzeichnung geeicht. Durch eine Wasserfallvorrichtung wurde der LAP während der gesamten Länge der Experimente bei 2 mmHg konstant gehalten.

Die Lungen wurden über eine Rollen-Pumpe (ISM834A, IsmatecSA, Labortechnik-Analytik, Glattbrugg-Zürich, Schweiz) mit einem nicht-rezirkulierenden konstanten Fluss von 50 ml·kg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> bei 37,5°C im Wärmebad (Lauda E 100, Lauda GmbH, Lauda) perfundiert.

Zur Quantifizierung der pulmonalen Gefäßreaktion auf eine alveoläre Hypoxie wurden die Lungen mit einem hypoxischen Gasgemisch (1% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>-94% N<sub>2</sub>; Linde Gas AG, Leuna) beatmet.

Es wurden nur solche Lungen in die Studie aufgenommen, welche homogen weiß ohne Zeichen für Atelektasen waren und die einen stabilen Perfusionsdruck  $<8$  mmHg während der 10-minütigen Baseline-Phase hatten.

Aufgrund dieser beiden Kriterien mussten ~5 % ausgeschlossen werden.

### **2.3 Quantifizierung der hypoxisch pulmonalen Vasokonstriktion**

Zunächst wurden die Lungen mit einem konstanten Fluss von  $50 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  für 10 Minuten perfundiert und am Ende dieser „baseline-Periode“ registriert. Nach dieser 10-minütigen Baseline wurden die Lungen mit dem hypoxischen Gasgemisch ventiliert. Pilotversuche ( $n=10$ ) zeigten, dass der maximale Druckanstieg als Reaktion auf diese Hypoxie nach 7-9 Minuten erreicht wurde. Daher wurde die hypoxisch-pulmonale Vasokonstriktion gemessen als die Zunahme des PAP nach 8-minütiger hypoxischer Beatmung in Prozent des baseline-PAP ( $\Delta\text{PAP}$ ). Anschließend wurde die normoxische Ventilation wiederhergestellt, wodurch es wieder zu einem Absinken des PAP auf einen ca 10-15% höheren Ausgangswert kam. Ein typischer Versuchsablauf ist in Abbildung 5 dargestellt.

### **2.4 Bestimmung des CO-Hb**

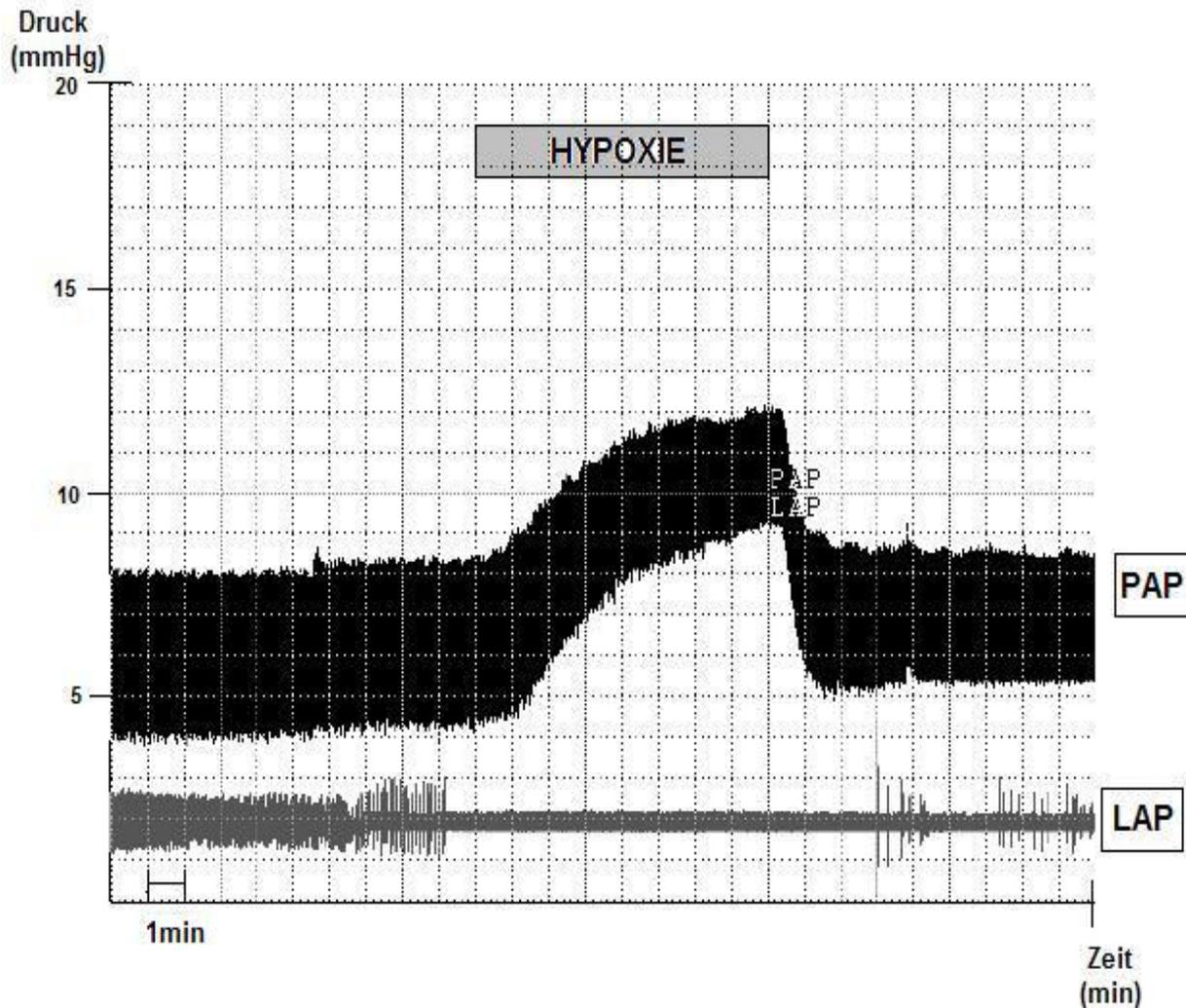
Um die während Air-Exposition und CO-Exposition herrschenden CO-Hb-Werte zu generieren, wurde nach Tracheotomie, Mittellinien-Sternotomie und Durchtrennung des Diaphragmas mit einer heparinisierten 1ml Spritze 0,5 ml Blut aus dem rechten Ventrikel entnommen. Die entnommenen Proben wurden auf ihren CO-Hb-Gehalt durch ein Blutgas-Analysegerät (Rapidlab 865; Chiron Diagnostics Corp., East Walpole, MA, USA) untersucht.

### **2.5 Modell der Endotoxinämie**

Als Modell einer Endotoxinämie diente das in der Arbeitsgruppe früher beschriebene Modell der intraperitonealen (i.p.) Injektion von 20 mg/kg Körpergewicht LPS (Lipopolysaccharides from *Escheria Coli* 0111:B4, SIGMA-Aldrich-Chemie, Steinheim) in NaCl

0,9% (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) gelöst. Als Kontrolle dienten Mäuse, die eine äquivalente Flüssigkeitsmenge NaCl 0,9% ebenfalls i.p. erhielten.

Die HPV wurde in allen Versuchsgruppen 21 Stunden nach Injektion im Modell der isoliert-perfundierten Mäuselunge, wie oben beschrieben, quantifiziert [102].



**Abbildung 5:** Original-Registrierung eines Versuchs (Details siehe Text)

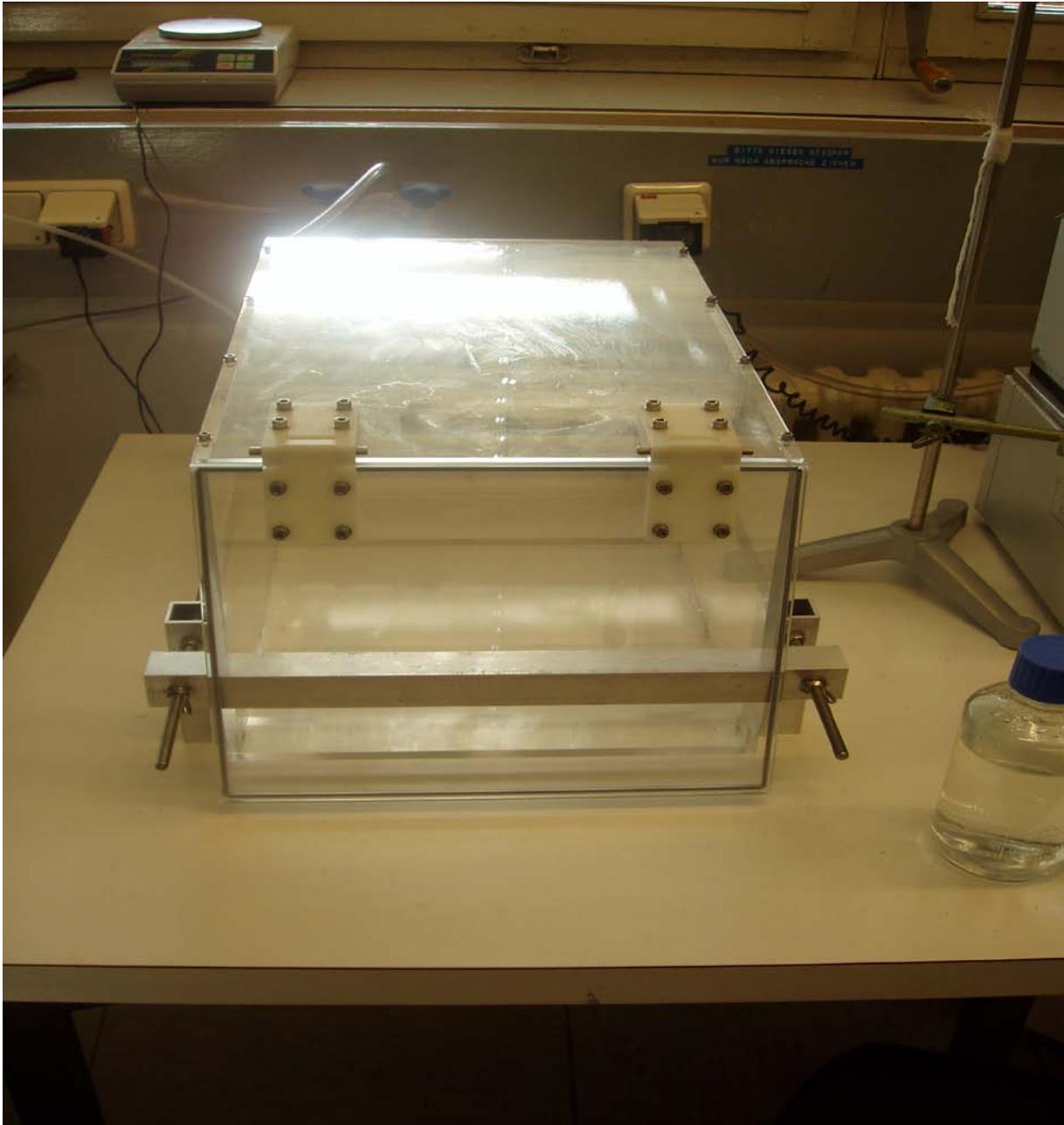
## 2.6 CO-Exposition

Zur Exposition von CO diente eine speziell dafür hergestellte Plexiglas-Expositionskammer (Innenmaße 48cm x 32cm x 25cm), in der bis zu 2, im Institut übliche, Mäusekäfige Platz hatten.

Die CO-Exposition erfolgte über ein zuführendes System aus vorgemischten Spezialgasen (jeweils 50 ppm (ppm, „parts per million“), 125 ppm, 250 ppm und 500 ppm in 21%

O<sub>2</sub> Rest N<sub>2</sub>, 500 ppm in 50% O<sub>2</sub> Rest N<sub>2</sub>; Linde Gas Leuna; siehe Versuchsprotokoll) mit einem konstanten Fluss von 5 l/min.

Als Kontrolle diente Druckluft (Abbildung 6). Diese war mit einem zuführenden und abführenden System ausgestattet. Sonst war die Kammer luftdicht verschlossen.



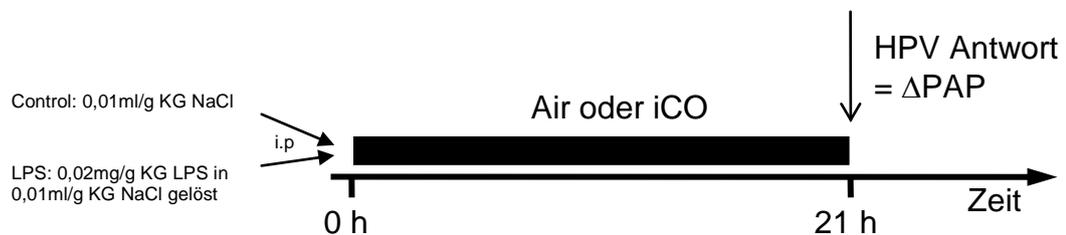
**Abbildung 6:** Expositionskammer

## 2.7 Versuchsprotokoll

Die Versuchstiere wurden einerseits in 6 Gruppen LPS-injizierter Tiere und andererseits 6 Kontrollgruppen mit 50 ppm CO, 125 ppm CO, 250 ppm CO, 500 ppm CO in 21% O<sub>2</sub>, 500 ppm CO in 50% O<sub>2</sub> bzw. Air aufgeteilt. (siehe Abbildung 7)

### Studiendesign

<b>Air</b>	control ∅ LPS ▼	} n = 18
<b>50 ppm iCO in 21% O<sub>2</sub></b>	control ∅ LPS ▼	} n = 18
<b>125 ppm iCO in 21% O<sub>2</sub></b>	control ∅ LPS ▼	} n = 17
<b>250 ppm iCO in 21% O<sub>2</sub></b>	control ∅ LPS ▼	} n = 20
<b>500 ppm iCO in 21% O<sub>2</sub></b>	control ∅ LPS ▼	} n = 13
<b>500 ppm iCO in 50% O<sub>2</sub></b>	control ∅ LPS ▼	} n = 9



**Abbildung 7:** Die Abbildung zeigt das Studiendesign:

Die zu untersuchenden Versuchstiere wurden in jeweils eine Kontroll- und eine LPS-Gruppe unterteilt. Zum Zeitpunkt 0h wurden den Versuchstieren entweder NaCl (Kontrollgruppe) oder LPS (LPS-Gruppe) injiziert. Eine Exposition mit Air oder CO in unterschiedlicher Dosis wurde für 21h durchgeführt.

Danach erfolgte die Präparation.

## 2.8 Nass-/Trocken-Anteil der Lungen

Nach Beendigung jedes Versuches wurde die Lungen ohne hiläre Strukturen freipräpariert und gewogen (Nassgewicht). Anschließend erfolgte die Trocknung in einer Mikrowelle bei 600 Watt für 15 Minuten, und eine erneute Messung des Gewichts (Trockengewicht). Der Nass-/Trocken-Anteil der Lunge wurde durch die Division des Nassanteils durch den Trockenanteil berechnet [127].

## 2.9 Statistische Analyse

Alle Werte wurden als Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD) ermittelt und dargestellt. Um die gebildeten Gruppen zu vergleichen wurde eine Varianzanalyse (two-sided ANOVA) durchgeführt. Wurden signifikante Unterschiede mit Hilfe der ANOVA detektiert, kam ein post-hoc „least-significant-difference“ (LSD) Test zum Einsatz (Statistica for Windows, SatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

Statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert  $< 0.05$  angenommen.

### 3 ERGEBNISSE

LPS-behandelte Mäuse zeigten deutliche Krankheitszeichen wie Lethargie, aufgeplustertes Fell und Verkotung. Diese Zeichen erschienen allenfalls geringfügig weniger in den CO-exponierten und LPS-behandelten Mäusegruppen. Nicht LPS-behandelte Kontroll-Mäuse waren augenscheinlich nicht in ihrem Habitus oder ihrem Verhalten durch CO-Exposition mit 50 bis 500 ppm über 21 Stunden alteriert.

Weder eine LPS-Vorhandlung, noch die Exposition mit inhaliertem CO – gleich welche Dosierung – oder deren Kombination hatte einen signifikanten Einfluss auf den Ausgangsperfusiondruck („baseline PAP“) während Ventilation mit dem normoxischen Gasgemisch (Normoxie) (Tabelle 2).

	Normoxie (PAP in mmHg)	Hypoxie (PAP in mmHg)
0 ppm iCO (Air)		
Kontrolle	5,7 ± 0,6	8,8 ± 0,8
LPS	6,7 ± 0,8	7,1 ± 0,9*
50 ppm iCO		
Kontrolle	5,4 ± 0,3	8,3 ± 1,4
LPS	5,7 ± 0,3 <sup>†</sup>	8,6 ± 1,6 <sup>†</sup>
125 ppm iCO		
Kontrolle	6,2 ± 0,4	9,8 ± 0,9
LPS	6,3 ± 0,5	8,7 ± 1,1 <sup>†</sup>
250 ppm iCO		
Kontrolle	5,6 ± 0,8	8,3 ± 1,9
LPS	5,8 ± 0,7 <sup>†</sup>	6,9 ± 0,6*
500 ppm iCO		
Kontrolle	5,5 ± 0,2	7,7 ± 1,3
LPS	5,8 ± 1,0 <sup>†</sup>	6,5 ± 1,6

**Tabelle 2:** Perfusionsdruck (PAP) während Normoxie und Hypoxie.

Die Werte entsprechen MW ± SD.

\* p<0,05 vs. Control; † p<0,05 vs. 0 ppm iCO.

### **3.1 Einfluss von Endotoxin (LPS) auf die HPV**

Unbehandelte und nicht-CO-exponierte Kontrollmäuse reagierten auf eine hypoxische Ventilation mit einer pulmonalen Vasokonstriktion, die sich in einem Anstieg des Perfusionsdrucks ( $\Delta$ PAP) um  $55 \pm 5\%$  vom Ausgangswert zeigte. Im Gegensatz dazu kam es in Lungen von LPS-behandelten Mäusen zu einem signifikant geringeren hypoxiebedingten Anstieg des PAP ( $\Delta$ PAP:  $7 \pm 5\%$ ), welcher sich signifikant von dem nicht-LPS-behandelten Tiere unterschied ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 8).

### **3.2 Einfluss von inhaliertem CO auf die HPV**

Um den Einfluss von inhaliertem CO auf den pulmonalarteriellen Widerstand zu untersuchen, wurden LPS- und nicht-LPS-behandelte Mäuse einer Exposition mit unterschiedlichen CO-Dosen ausgesetzt.

#### **3.2.1 Alleinige Exposition mit CO (nicht-LPS-behandelte Mäuse)**

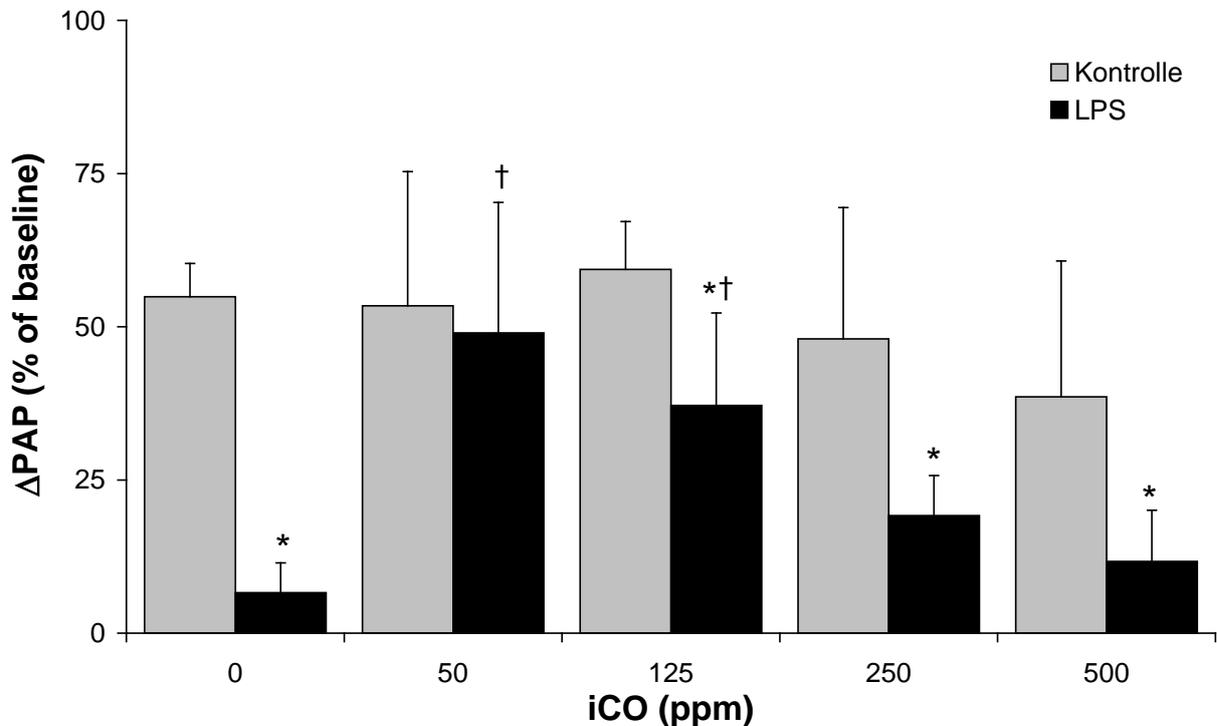
Die Exposition mit aufsteigenden Dosen CO (50, 125, 250 und 500 ppm iCO) über einen Zeitraum von 21 Stunden hatte keinen signifikanten Einfluss auf den Perfusionsdruck (PAP) während hypoxischer Ventilation (Tabelle 2), sowie auf den hypoxiebedingten Anstieg desselben ( $\Delta$ PAP) im Modell der isoliert-perfundierten Mäuselunge bei nicht-LPS-behandelten Mäusen (Abbildung 8).

Anhand der Abbildung 8 scheint eine Exposition mit 500 ppm iCO zu einer Verminderung der HPV zu führen; dieser Effekt bleibt jedoch nur eine Tendenz, erreicht jedoch keine Signifikanz ( $p = 0,053$ ).

#### **3.2.2 CO-Exposition bei LPS-behandelten Mäusen**

Um den Einfluss von inhaliertem CO auf die HPV bei durch LPS verursachter Sepsis bei Mäusen zu untersuchen, wurde in einem weiteren Studienabschnitt die Wirkung von aufsteigenden Dosen (Dose-Response) untersucht.

Hierzu wurde nach intraperitonealer LPS-Injektion eine Exposition der Mäuse mit 50, 125, 250 bzw. 500 ppm CO über den gesamten Zeitraum bis zur Quantifizierung der HPV im Modell der isoliert-perfundierten Mäuselunge (21 Stunden) durchgeführt.



**Abbildung 8:** Der hypoxie-bedingte Anstieg des Perfusionsdruckes ( $\Delta$ PAP) in der isoliert-perfundierten Mäuselunge von LPS-behandelten und nicht-LPS-behandelten Mäusen unter Air-Exposition (0 ppm CO) und unterschiedlicher CO-Dosen.

Die Werte entsprechen MW  $\pm$  SD.

\* $p < 0,05$  vs. Control; †  $p < 0,05$  vs. 0 ppm iCO.

Bei Exposition mit 50 ppm iCO kam es nicht zu einem Verlust der HPV bei LPS-behandelten im Vergleich zu nicht-LPS-behandelten Mäusen ( $\Delta$ PAP  $49 \pm 21$  % versus  $53 \pm 22$  %,  $p = 0,54$ , Abbildung 8).

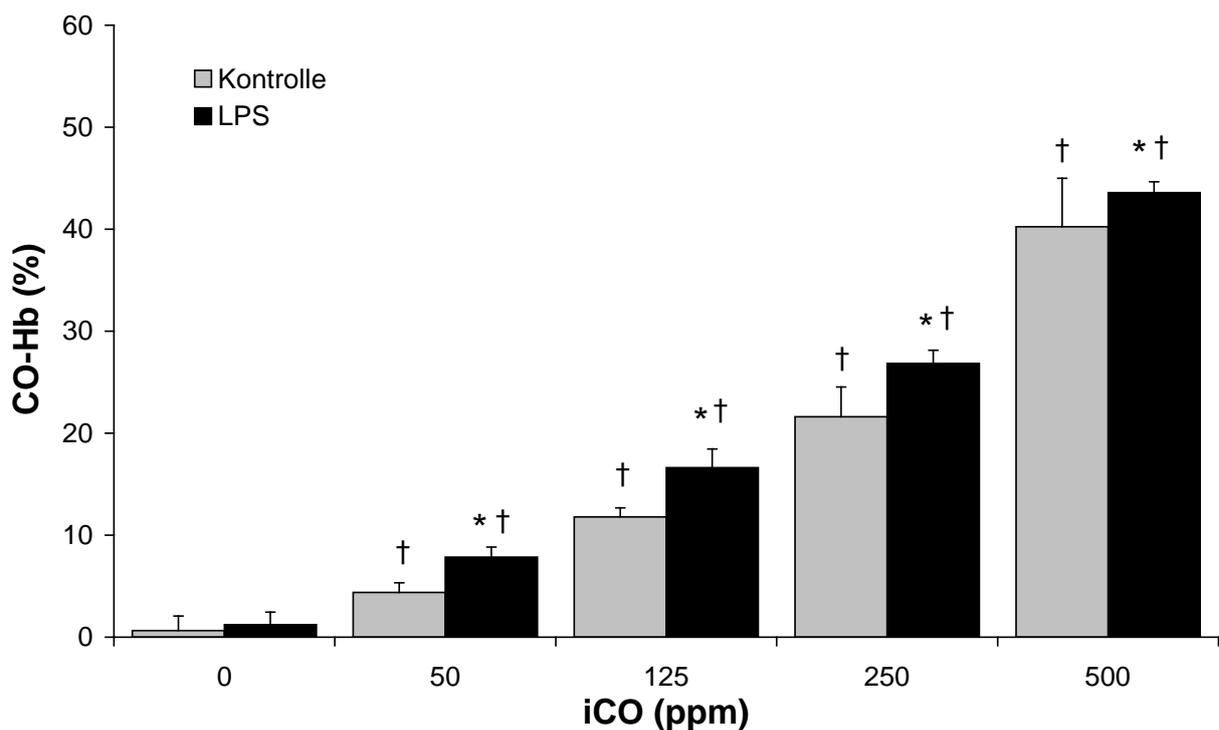
Dementsprechend ergab sich eine siebenfach höhere hypoxie-bedingte pulmonale Vasokonstriktion durch Exposition mit 50 ppm gegenüber 0 ppm CO bei den LPS-behandelten Mäusen.

Eine Erhöhung der CO-Dosis hob den protektiven Effekt, wie er für 50 ppm gezeigt wurde, dosisabhängig auf, sodass sich das  $\Delta$ PAP bei 500 ppm CO Exposition und 0 ppm Exposition LPS-behandelter Mäuse nicht signifikant unterschied ( $p = 0,50$ ).

Nach Exposition mit 500 ppm CO zeigten LPS-behandelte Mäuse ein signifikant niedrigeres  $\Delta$ PAP als nicht-LPS-behandelte Kontrollmäuse ( $p < 0,05$ ).

### 3.3 CO-Hb während CO Exposition

Um einen Ausgangswert zur Bestimmung des Einflusses von unterschiedlichen iCO-Anteilen in synthetischer Luft zu erhalten, wurden den Air-exponierten Mäusen im Verlauf des Versuches 0,5 ml gemischt-venöses Blut aus dem rechten Ventrikel entnommen.



**Abbildung 9:** Grafische Darstellung der CO-Hb-Werte bei unterschiedlichen CO-Anteilen an synthetischer Luft.

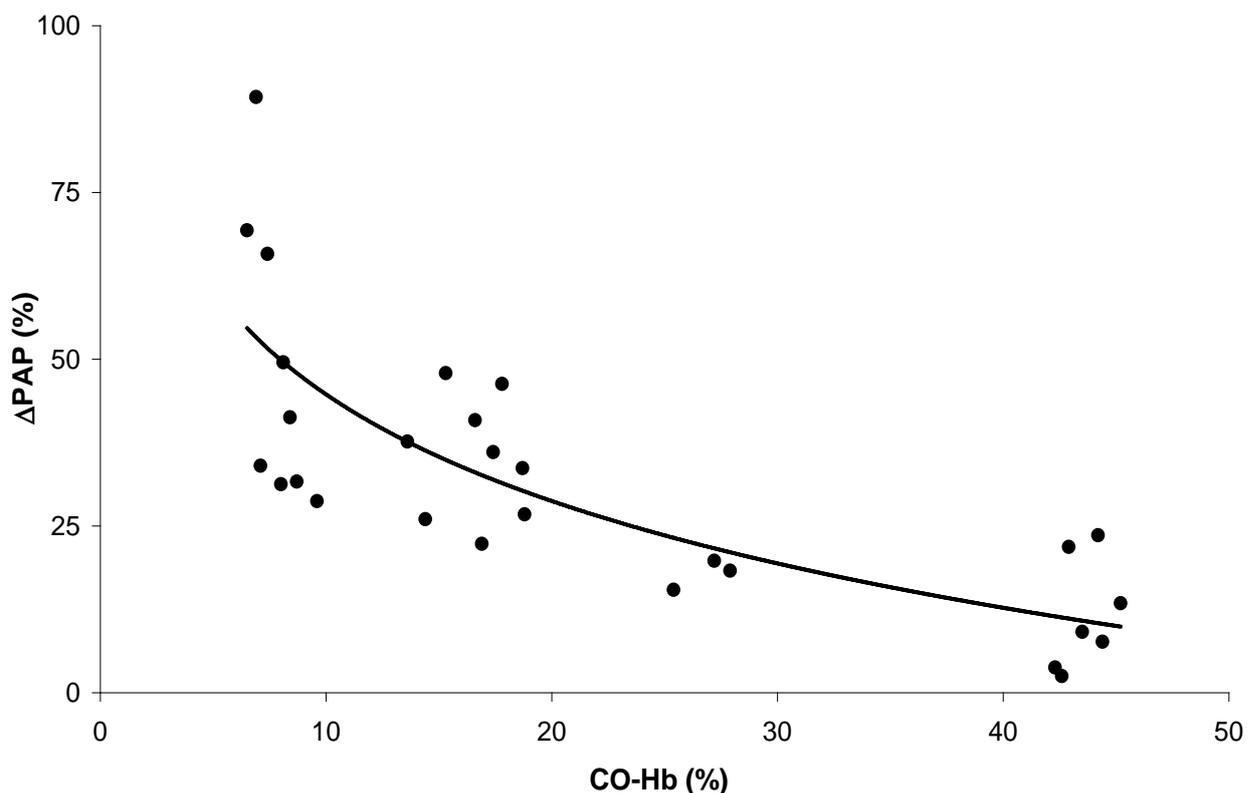
Die Werte entsprechen  $MW \pm SD$ .

\*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle; †  $p < 0,05$  vs. 0 ppm iCO.

Exposition mit unterschiedlichen CO-Konzentrationen bei ansteigenden CO-Dosen nicht-septischer und septischer Mäuse während 21h CO Exposition führte zu ansteigenden CO-Hb-Werten (siehe Abbildung 9).

Der Anstieg auf den Maximalwert von  $43,6 \pm 1,4$  % wurde bei 500 ppm iCO beobachtet. Im Gruppenvergleich zwischen septischen und nicht-septischen Mäusen ergab sich für alle untersuchten iCO-Dosen ein signifikanter Unterschied in den CO-Hb-Werten ( $p < 0,05$ ).

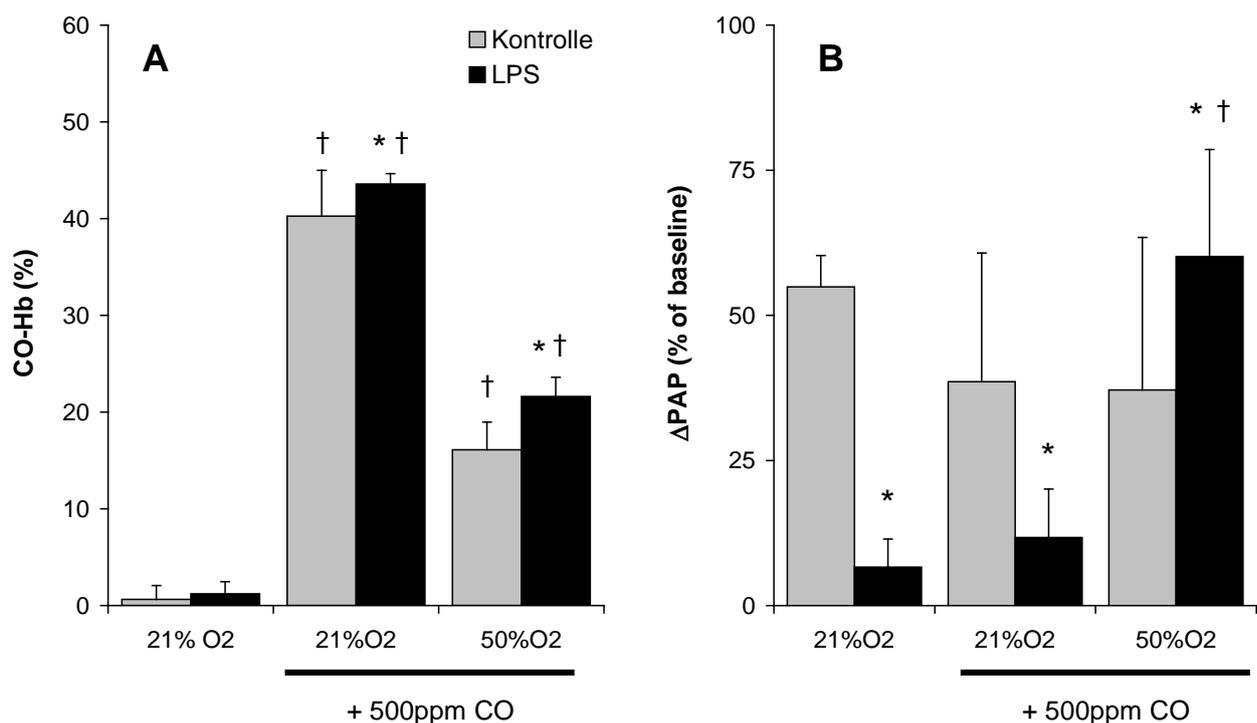
Die unerwartete Abnahme der hypoxisch pulmonalen Vasokonstriktion mit ansteigenden CO-Expositionsdosen bei septischen Mäusen korrelierte signifikant mit den gemessenen erhöhten CO-Hb Werten ( $\Delta\text{PAP} = -23,1 \times \ln(\text{CO-Hb}) + 97,8$ ;  $r^2 = 0,61$ ;  $p < 0,05$ ; Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Diese Abbildung zeigt die Korrelation zwischen  $\Delta\text{PAP}$  und den dazugehörigen CO-Hb-Werten bei septischen CO-exponierten Versuchstieren. Die Werte entsprechen  $\text{MW} \pm \text{SD}$ .

### 3.4 CO Exposition in 50% Sauerstoff versus in Air

Die oben gezeigte Korrelation zwischen CO-Hb-Werten und dem Ausmaß der HPV während Sepsis legte die Hypothese nahe, dass die mit steigender CO-Dosis zunehmenden CO-Hb-Werte für den bei 500 ppm CO Exposition nicht mehr nachweisbaren Effekt in der septischen Gruppe ursächlich sei. Daher wurde in zusätzlichen Experimenten die HPV bei septischen Tieren nach Exposition mit 500 ppm CO in 50% Sauerstoff gemessen und mit den entsprechenden Werten nach Exposition mit und ohne 500 ppm CO in Air verglichen. Es zeigte sich, dass die CO-Hb-Werte durch die Erhöhung des Sauerstoffanteiles in septischen, wie nicht-septischen Mäusen halbiert werden konnten (Abbildung 11A). Dies ging mit einer signifikanten Verbesserung der HPV bei septischen Mäusen einher (Abbildung 11B).



**Abbildung 11:** Der CO-Hb-Anteil (A) und der Anstieg des  $\Delta$ PAP (B) in der isoliert-perfundierten Mäuselunge von LPS-behandelten und nicht-LPS-behandelten Mäusen unter Air-Exposition (0 ppm iCO) und unterschiedlichen Sauerstoffanteilen bei einer CO-Dosis von 500 ppm. Die Werte entsprechen  $MW \pm SD$ .

\*  $p < 0,05$  vs. Control; †  $p < 0,05$  vs. 21%O<sub>2</sub> ohne iCO

In nicht-septischen Mäusen führte die Erhöhung des Sauerstoffanteils zu einer nicht signifikanten Änderung der Antwort auf eine hypoxie bedingte Vasokonstriktion.

### 3.5 Nass-/Trocken-Verhältnis der Lungen

Um ein mögliches pulmonales Ödem zu detektieren, wurde am Ende eines jeden Versuches das Verhältnis zwischen Nass- und Trockenanteil der Lungen erhoben.

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen untersuchten Gruppen gezeigt werden (siehe Tabelle 3).

	Nass-/Trocken- Verhältnis der Lungen
0 ppm iCO (Air)	
Kontrolle	4,4 ± 0,6
LPS	3,7 ± 0,5
50 ppm iCO	
Kontrolle	4,2 ± 0,8
LPS	4,0 ± 0,3
125 ppm iCO	
Kontrolle	4,3 ± 0,8
LPS	4,0 ± 0,4
250 ppm iCO	
Kontrolle	4,1 ± 0,4
LPS	3,8 ± 0,4
500 ppm iCO	
Kontrolle	4,3 ± 0,4
LPS	3,8 ± 0,2

**Tabelle 3:** Die Tabelle veranschaulicht den Nass-/Trocken-Anteil der Lunge bei Air- und CO-exponierten Versuchstieren.

Die Werte entsprechen MW ± SD.

\* p<0,05 vs. Control; † p<0,05 vs. Air.

## 4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Inhalation von Kohlenmonoxid die Entwicklung einer verminderten HPV während Sepsis verhindern kann. Entgegen der ursprünglichen Annahme zeigte sich, dass dieser Effekt mit steigenden iCO-Dosen schwächer wird. Zusätzlich durchgeführte Experimente lassen darauf schließen, dass dies mit zunehmenden CO-Hb-Werten korreliert.

### 4.1 Die Verminderung der HPV während Endotoxämie

Im Gegensatz zu den Gefäßen des systemischen Kreislaufs konstringieren die Gefäße der Lunge bei niedriger Sauerstoffspannung (Hypoxie) [57]. Dieser Vorgang, genannt hypoxisch pulmonale Vasokonstriktion, bewirkt physiologischerweise die Drosselung des pulmonalen Blutflusses in Regionen verminderter Ventilation hin zu besser ventilerten Lungenabschnitten [131]. Es kommt so zu einer Anpassung der regionalen Perfusion an die regionale Ventilation („Ventilations-Perfusions-Match“) [119].

Während entzündlicher Prozesse, wie bei einer Pneumonie oder Sepsis, kann die HPV vermindert werden und es kommt zu einer intrapulmonalen Shuntperfusion mit reduzierter Oxygenierung. Dies wurde sowohl bei Tieren [17, 28, 35, 88, 106, 112, 130], wie auch bei Patienten gezeigt [58].

Übereinstimmend mit anderen Studien in isoliert perfundierten Mäuselungen [5, 102, 127, 129] zeigten auch die Versuche der vorliegenden Arbeit eine ausgeprägte Konstriktion der Lungengefäße bei Ventilation mit einem hypoxischen Gasgemisch. Der resultierende Anstieg des Perfusionsdruckes ( $\Delta$ PAP) betrug  $55 \pm 5\%$  (Abbildung 8, Tabelle 2). Durch den im Experiment konstant gehaltenen Perfusionsfluss ist bei konstant gehaltenem linksatrialen (Ausfluss-) Druck (LAP) der Anstieg des Perfusionsdruckes (PAP) während hypoxischer Ventilation mit einem Anstieg des pulmonalvaskulären Widerstandes gleichzusetzen (Abbildung 5). Das Ausmaß der HPV war in unserem Modell etwas geringer als in vergleichbaren Studien an isoliert-perfundierten Mäuselungen [102, 129]. Weissmann et al. fanden jedoch eine unterschiedliche Ausprägung der HPV bei verschiedenen Mäuse-Spezies [129].

Wie bereits früher von unserer Arbeitsgruppe gezeigt [101, 102] führt auch in der vorliegenden Studie die Injektion von LPS intraperitoneal zu einer Verminderung der HPV 21 Stunden nach LPS-Gabe.

#### **4.2 Der protektive Effekt von Kohlenmonoxid**

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Einfluss von inhaliertem Kohlenmonoxid auf die verminderte HPV während Sepsis untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Kohlenmonoxid-Exposition von LPS-behandelten Mäusen eine Verminderung der hypoxisch pulmonalen Vasokonstriktion während Endotoxinämie verhindert. Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass die Aktivierung der HO-1, und damit der endogenen CO-Produktion, zu einem Gewebeschutz vor Verletzungen durch Oxidation führt. Ein anti-inflammatorischer, anti-apoptotischer und anti-proliferativer Effekt wurde von Morse et al. beschrieben, der genaue Wirkungsmechanismus bleibt jedoch ungeklärt [69]. Die zytoprotektiven Effekte werden möglicherweise von den Nebenprodukten der Katalyse von Häm durch HO-1, Biliverdin, Eisen und CO vermittelt [78].

In der vorliegenden Studie konzentrierten wir uns aufgrund der hohen klinischen Relevanz auf die während Sepsis verminderte hypoxisch pulmonale Vasokonstriktion. Diese ist jedoch als ein Symptom einer generellen pulmonalen Hyporeagibilität der pulmonalen Strombahn zu sehen; so zeigten Weimann et al., dass auch die pulmonale Vasodilatation auf inhaliertes Stickstoffmonoxid (NO) während Sepsis alteriert ist [127]. Damit handelt es sich hier um wesentliche (patho-)physiologische Folgesymptome der LPS-induzierten Organschäden. Die hier gezeigte protektive Wirkung von inhaliertem CO kann daher als organprotektiver Effekt interpretiert werden, was durch eine stetig steigende Zahl weiterer Studien bezüglich verschiedener Organsysteme und verschiedener Tierspezies unterstützt wird [19, 24, 29, 52, 79, 80, 99, 141]. Die unterschiedlichen Mechanismen, durch die CO zur Protektion vor Organschädigung beiträgt, sind derzeit Gegenstand intensiver Forschung.

Im Mäusemodell konnte Fujita et al. zeigen, dass im Modell einer ischämischen Lungenschädigung, die exogene Applikation von 1.000 ppm CO über 24 Stunden zu einer Suppression der Gencodierung des Plasminogen-Aktivierungs-Inhibitor führt, folglich die Fibrinbildung verringert wird. Die Fibrinolyse wird durch inhaliertes CO aktiviert und trägt somit zum Schutz vor ischämisch-bedingter Organschädigung bei [29]. Ein

weiterer möglicher Mechanismus, wie inhaliertes CO protektiv wirkt, konnte in der Studie von Zhang et al. gezeigt werden. Hierbei führte die exogene Applikation von CO *in vitro* von 15 ppm CO-Exposition über 24 Stunden an Rattenzellen, wie auch *in vivo* bei 500 ppm CO über 2 ½ Stunden an Mäusen zu einem anti-apoptotischen Effekt [139]. Andere Autoren fanden eine Verminderung der Induktion pro-inflammatorischer Zytokine nach LPS-Gabe durch exogenes CO *in vivo* in der Ratte [52] und der Maus [70, 77], wie auch *in vitro* bei isolierten Makrophagen [70, 77, 92].

Unterschiedliche CO-Dosen und Expositionszeiträume wurden gewählt. Die Vorbehandlung mit 250 ppm CO in 21% O<sub>2</sub> von LPS-behandelten C57BL/6 Mäusen für 1 Stunde und anschließender Untersuchung der Zytokinlevel nach 5 Stunden zeigte eine Verminderung der IL-1β- und IL-6-Werte. In derselben Studie wurden auch isolierte Makrophagen mit 50-500 ppm CO in 21% O<sub>2</sub> exponiert, was zu einer IL-6 Senkung bei steigender CO-Dosis führte [70]. Zu gleichen Ergebnissen kam eine andere Studie, in der ebenfalls isolierten Makrophagen-Zellreihen denselben CO-Dosen in 21% O<sub>2</sub> ausgesetzt wurden, obwohl ein anderer Expositions- und Untersuchungszeitraum gewählt wurde (2 Stunden Vorbehandlung und Untersuchung nach 1 Stunde). Ferner wurde der anti-inflammatorische IL-10-Level nach 16 Stunden bestimmt, welcher im Vergleich zur Air-exponierten Gruppe in der CO-exponierten Gruppe in ansteigender Dosis erhöht war. Die Exposition von Mäusen wurde nach derselben Methode wie der der Arbeitsgruppe um Morse et al. durchgeführt. Der Vorbehandlungszeitraum war derselbe (1 Stunde) und die Blutuntersuchung nach 1 Stunde (TNF-α) bzw. 16 Stunden (IL-10) durchgeführt. Auch hier zeigten sich bei zunehmender CO-Dosis abnehmende pro-inflammatorische und zunehmende anti-inflammatorische Werte [77].

Im Gegensatz zu diesen gezeigten protektiven Eigenschaften von exogen appliziertem CO, konnte in der Arbeit von Ghosh et al. kein positiver Effekt von inhaliertem CO auf die Inflammation während Sepsis in verschiedenen Modellen des LPS- und Ölsäure-induzierten Lungenschadens gezeigt werden [34]. Hier wurden keine Veränderung der Zytokinwerte oder der Neutrophilen-Zahl durch die Inhalation von CO gesehen. In diesem Versuchsaufbau wurde 500 ppm CO in 98% O<sub>2</sub> gelöst und die C57BL/6-Mäuse für 1 Stunde vorbehandelt. Danach erfolgte die weitere Beatmung der Tiere für bis zu 3 Stunden, je nach Sepsis-Modell, mit der gleichen CO-Dosis.

Interessanterweise zeigte eine Studie von Clayton et al., in der CO-Dosen von 50-500 ppm CO in O<sub>2</sub> in einem Expositionszeitraum über 60 Stunden verwendet wurden, ebenfalls keine positiven Veränderungen der durch Hyperoxie bedingten Lungenschädigung

gen in der Ratte [21]. Entgegen diesen Ergebnissen konnten Otterbein et al., bei 250 ppm CO in 98% O<sub>2</sub> in einem Expositionszeitraum über 54 Stunden in der Ratte geringere Schädigungen des Lungenparenchyms und geringerer Neutrophilenzahl nachweisen [79]. Hier zeigen sich grundlegende Differenzen zwischen den einzelnen Studien. Einerseits wurden unterschiedliche Spezies verwendet, andererseits wurden verschiedene Expositionsschemata bei unterschiedlichen CO-Dosen verwendet. Obendrein wurden die verwendeten CO-Dosen entweder in 21% O<sub>2</sub> oder in 98% O<sub>2</sub> gelöst. Ob die Inhalation von 500 ppm CO die Ursache für diese negativen Ergebnisse ist, scheint eine mögliche Erklärung zu sein, denn in anderen dosisabhängigen Vergleichsstudien konnte gezeigt werden, dass bereits 10-50 ppm CO einen anti-inflammatorischen Effekt ausüben können [24, 77, 79]. Jedoch werden bei noch höheren CO-Dosen positive Effekte von exogenem CO beschrieben [29, 100].

### **4.3 Dosiseffekt von Kohlenmonoxid**

Die in dieser Arbeit verwendeten CO-Anteile von 50-500 ppm in 21% O<sub>2</sub> zeigen unterschiedliche Beeinflussung der verminderten HPV während Sepsis. Der Dosisbereich entspricht damit dem weitgehend in der Literatur verwendeten [19, 21, 24, 42, 49]. Während nur in wenigen Studien bisher überhaupt verschiedene CO-Dosen bezüglich ihrer Wirkung untersucht wurden, legen die, in denen dies getan wurde, eine proportionale Dosis-Wirkungsbeziehung nahe. So konnte in einer Studie von Otterbein et al. aufgezeigt werden, dass die Erhöhung der CO-Dosis von 50-500ppm CO zu einer Verringerung der inflammatorischen Antwort führt. Die Zahl der Neutrophilen nimmt mit zunehmender CO-Dosis ab. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Letalität ebenfalls abnimmt [79]. Weitere Untersuchungen wiesen die gleichen Effekte, wie in der Arbeit von Otterbein auf [70]. Daher war es für uns umso überraschender, dass wir in unserer Studie eine negative Korrelation von Dosis und Wirkung beobachteten: der protektive Effekt von CO war bei 50 ppm maximal, nahm mit steigender Dosis ab und war bei 500 ppm nicht mehr nachweisbar (Tabelle 2 und Abbildung 8). Vergleichsstudien zum Effekt einer CO-Exposition liegen derzeit nicht vor.

Eine Umverteilung des Gleichgewichts zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen hin zur anti-inflammatorischen Seite scheint ein möglicher Erklärungsansatz zu sein.

Ein weiterer möglicher Ansatzpunkt für die differente Datenlage könnte die unterschiedliche Expositionsdauer bzw. Expositions-Dosis sein. In unserer Studie wurde für 21 Stunden CO exponiert. In anderen Arbeiten wurde Expositionszeiträume von 2 Stunden Vorbehandlung mit 250 ppm [19] bis zu 72 Stunden Exposition mit 250 ppm CO [80] beschrieben; jedoch wurde zumeist nur eine Dosis gewählt oder der Expositionszeitraum und die CO-Dosis entsprach nicht unseren.

Ob eine geringere CO-Dosis eine weitere Änderung der HPV mit sich bringen würde, ließ sich in der vorliegenden Arbeit nicht klären, da eine technische Realisierung eines Gasgemischs von kleiner als 50 ppm in 21% O<sub>2</sub> wegen der Instabilität des Gasgemisches momentan nicht möglich ist. Die Mischung des CO-Anteils in höheren O<sub>2</sub>-Anteilen wie in verschiedenen Studien verwendet [34, 79] scheint ein, für das Modell der Sepsis sinnvoller Ansatz zu sein. Das Ventilations-Management beim ALI/ARDS sieht einen hohen inspiratorischen O<sub>2</sub>-Wert vor, sodass diese Mischung für die HPV von Vorteil sein könnte, jedoch sei in diesem Zusammenhang vor einer Schädigung durch Hyperoxie, wie von Clayton et al. beschrieben, gewarnt [21]. Hierbei könnte der positive Einfluss von CO auf die HPV beeinflusst werden, weshalb eine Lösung in 50% O<sub>2</sub> sinnvoll erscheint und in dieser Arbeit auch verwendet wurde.

### 4.4 CO-Hb

Die Toxizität von Kohlenmonoxid ist in der Literatur vielfach dargestellt. Während Nichtraucher einen CO-Hb-Wert von etwa 1% aufweisen, sind Raucher mit höheren CO-Hb-Werten belastet. Eine Spannbreite von 3-8% ist hierbei beschrieben [86]. Die ersten Vergiftungssymptome werden ab CO-Hb-Werten >10% erläutert, wobei hier eine Belastungsdyspnoe und eine Dilatation von Kapillaren beschrieben werden. Mit zunehmenden CO-Hb-Werten kommt es zu kardiovaskulären, pulmonalen und zerebralen Veränderungen. Koma, Bradykardie, Krampfanfälle und Hypotonie werden ab CO-Hb-Werten von >50% beschrieben. Konzentrationen oberhalb 70% haben letale Folgen [120, 132, 135].

Bezüglich des Einflusses der Exposition von CO in unterschiedlichen Dosen wurden in dieser Arbeit zusätzliche Messungen von Carboxyhämoglobinwerte durchgeführt. Es zeigte sich, dass es bei Exposition über einen Zeitraum von 21 Stunden in den septischen und nicht-septischen Gruppen zu einem Anstieg der CO-Hb-Werte bei zuneh-

mendem CO-Anteil in 21% O<sub>2</sub> kam; es wurden Werte bis zu 50% CO-Hb gefunden (Abbildung 9).

In der aktuellen Literatur sind keine Untersuchungen zu finden, die sich mit dem CO-Hb-Verlauf während CO-Exposition in der Maus beschäftigen. Die bisher in Studien gewonnenen CO-Hb-Werte sind jeweils für einen kurzen Zeitraum oder über mehrere Tage erhoben worden. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass sich bei Exposition mit 1.000 ppm CO in 21% O<sub>2</sub> über 24 Stunden einen CO-Hb-Wert von 24,8% in einem ischämischen Lungenschädigungsmodell [29], 35% bei einer CO-Dosis von 250 ppm CO in 98% O<sub>2</sub> über 24 Stunden bei Hyperoxie [80] und bei 500 ppm in 98% O<sub>2</sub> für 1 Stunde CO-Hb-Werte von 10,7% im ALI einstellen [34]. Bei durch Hyperventilation ausgelöster Lungenschädigung in der Ratte unterschieden sich diese Werte wiederum von Werten in Mäusen, was auf einen Speziesunterschied hinweist, jedoch muss auch der unterschiedliche Expositionszeitraum berücksichtigt werden (bei 250 ppm CO in 21% O<sub>2</sub> für 4 Stunden CO-Hb-Werte von 14,2% [24]). Der Speziesunterschied wird auch durch Untersuchungen im gesunden Menschen sehr deutlich. Hier konnten bei Inhalation von 500 ppm CO für 1 Stunde oder 250 ppm für 2 Stunden die gleichen CO-Hb-Werte von 7% gemessen werden [60].

Eine Erklärung für den Speziesunterschied lässt sich durch die Eigenschaften des CO vermuten. Die Affinität von CO zu Hämoglobin in Mäusen ist nur 50-fach höher als die von Sauerstoff [14]. Im Menschen ist sie 217-fach-höher [26]. Des Weiteren besteht eine unterschiedliche Halbwertszeit von CO-Hb in der Maus und beim Menschen. Während 50% des CO-Hb bei der Maus bereits innerhalb von 30 Minuten nach Expositionsende abgebaut ist, benötigt der menschliche Organismus 10mal solange dafür (5 Stunden) [122, 125]. Darüber hinaus gibt es unzählige physiologische Unterschiede, wie Herzfrequenz und Atemfrequenz, zwischen Menschen und Tieren. Die CO-Sättigung und Dissoziation ist in der Maus deutlich schneller als im Menschen. Hieraus lässt sich schließen, dass bei längerer Applikation von 500 ppm CO niedrigere CO-Hb-Werte als beim Menschen gefunden werden sollten. Dies würde auch mit den erwarteten CO-Hb-Werten, die die Arbeit von Peterson et al. bestimmten Coburn-Forster-Kane-Gleichgewichts, welches die Absorption und Exkretion von CO beschreibt, übereinstimmen [82]. Jedoch würde der menschliche Organismus auch länger mit dem Abbau des CO-Hb-Wertes beschäftigt sein.

Da die Arbeit von Ghosh et al., ein dem unseren sehr ähnliches Modell verwendet und sie im Gegensatz zu anderen Studien keinen Einfluss auf pro- oder antiinflammatori-

schen Zytokine, bei CO-Hb-Werten von 11% bei 500 ppm CO in 98% O<sub>2</sub> für 4 Stunden Exposition zeigten, stellt sich die Frage, ob erhöhte CO-Hb-Werte Ursache für die verminderte Wirksamkeit von inhaliertem CO sein könnten.

Um dieser Frage nachzugehen, untersuchten wir zusätzlich, ob eine Erhöhung des Sauerstoffanteils von 21% auf 50% einen Effekt auf die Wirkung einer Exposition mit 500 ppm CO haben würde. In der Tat konnten wir zeigen, dass dadurch sowohl die gemessenen CO-Hb-Werte signifikant vermindert, aber auch die HPV verbessert werden konnte. Dies legt nahe, dass die Verminderung der protektiven Wirkung von CO mit steigenden Dosen nicht nur einfach mit gleichzeitig ansteigenden CO-Hb-Werten korreliert, sondern hier möglicherweise ein kausaler Zusammenhang besteht. Wir wollen in weiteren Studien dieser Frage nachgehen.

### **4.5 Was bedeutet das für die Klinik?**

Die verschiedenen anti-inflammatorischen, anti-apoptotischen und anti-proliferativen Eigenschaften von inhaliertem CO sind derzeit Gegenstand intensiver Forschung und im Tiermodell bereits gut etabliert. Auch in der vorliegenden Studie fanden wir neue Hinweise, dass die Gabe von inhaliertem CO während Sepsis einen positiven Effekt auf klinisch relevanten pathophysiologischen Veränderungen haben kann. Damit wird für Patienten mit einer inflammatorischen Lungenschädigung, wie Pneumonie, oder ALI / ARDS, inhaliertes CO zu einer attraktiven Behandlungsmethode. Es darf jedoch nicht vergessen werden, dass vor einer klinischen Anwendung noch viele Fragen offen sind: So ist eine Dosis-Wirkungsbeziehung nicht deutlich definiert, die potentiell erreichbaren CO-Hb-Werte während Exposition in ihrer Wertigkeit nicht abschätzbar und Untersuchungen zur Langzeittoxikologie stehen ebenfalls aus.

Zusammenfassend lässt sich anhand dieser Ergebnisse sagen, dass inhaliertes CO in der Lage ist, die verminderte HPV während Sepsis in der Maus in Abhängigkeit von Dosierung und Sauerstofffraktion wiederherzustellen. Dabei ergab sich eine umgekehrte Dosis-Wirkungsbeziehung, welche jedoch möglicherweise durch hohe CO-Hb-Werte während der Exposition zu erklären sind.

#### 4.6 Kritische Auseinandersetzung mit dem experimentellen Ansatz

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Modell der isoliert perfundierten Mäuselunge verwendet, um die pulmonale Vasoreaktivität als Antwort auf alveoläre Hypoxie in der LPS-behandelten septischen Maus zu quantifizieren. Weiterhin eignet sich das Modell um den Einfluss von exogenem Kohlenmonoxid in unterschiedlichen Dosen und den CO-Hb-Wert zu untersuchen. Es bestehen verschiedene limitierende Faktoren beim Versuch die Daten auf humane Bedingungen zu übertragen. Eine einzige LPS-Injektion lässt sich mit dem langsamen Vorgang einer Sepsis im Menschen nur bedingt vergleichen. Während es sich hier um ein „one-hit“-Modell handelt, sieht man klinisch eher einen kontinuierlich zunehmenden inflammatorischen Prozess bis zur Kontrolle des die Infektion bedingenden Fokuses.

Jedoch ermöglicht dieses Modell eine gute Reproduzierbarkeit einer systemischen Inflammation, welches in vorangegangenen Studien bezüglich der Reaktion der pulmonalen Gefäßstrombahn auf vasoaktive Stimuli, gezeigt werden konnte [112, 127].

Die unterschiedliche Reaktion auf eine Inflammation der Lunge wurde im Review von Winkler bereits beschrieben [134]

Des Weiteren wurde im vorliegenden Modell Blut als Perfusat durch eine Pufferlösung ersetzt, die konstante Säure-Basen-Verhältnisse herstellt. Im menschlichen Organismus sind Säure-Basen-Verhältnisse unter Hypoxie Schwankungen unterworfen [32, 74]. Weiterhin ist der menschliche Lungenkreislauf mit seiner Vielzahl sich verzweigender Gefäße, mit verschiedenen Gefäßdurchmessern und unterschiedlichen regionalen Oxygenierungsverhältnissen, nur durch komplizierte Modelle näherungsweise zu beschreiben. Solche Ansätze beinhalten eine große Anzahl an Parametern, die durch einfache Perfusionsdruck-Fluss-Daten allein nicht zu Ergebnissen führen [17].

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Während schwerer inflammatorischer Lungenschädigungen, wie Sepsis oder ARDS, kommt es zur Verminderung der hypoxisch pulmonalen Vasokonstriktion (HPV). Dies trägt zur weiteren Entwicklung eines Perfusions-Ventilations-Mismatches und damit einer Hypoxämie bei. Die zugrunde liegenden Pathomechanismen sind weitgehend unbekannt. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass exogen zugeführtes, inhaliertes Kohlenmonoxid (iCO) anti-inflammatorische Wirkungen hat und so auch lungenprotektiv wirken kann. In der vorliegenden Studie wurde daher der Effekt einer CO-Exposition auf die Entwicklung einer verminderten HPV in einem Sepsis-Modell an der Maus untersucht.

Es zeigte sich, dass eine CO-Exposition über 21 Stunden vollständig die Entwicklung einer verminderten HPV verhindern konnte. Dabei fand sich eine deutliche Dosis-Wirkungsbeziehung, wobei die geringste Dosis CO (50 ppm in 21% O<sub>2</sub>) den größten Effekt hatte. Zusätzliche Experimente ergaben, dass eine Erhöhung der CO-Dosis mit einer Zunahme der CO-Hämoglobin-Werte im Blut korrelierte. Dabei ging eine Erhöhung der O<sub>2</sub>-Konzentration im Gasgemisch von 21% auf 50% nicht nur mit einer Verminderung der CO-Hb-Werte, sondern auch mit einer Verbesserung der HPV einher.

Zusammenfassend kann also gefolgert werden, dass die Inhalation von niedrigdosiertem CO in dem hier verwendeten Sepsis-Modell an der Maus die Entwicklung einer verminderten HPV verhindert. Höhere Dosen CO haben dabei weniger Effekt, wobei dies möglicherweise auf die dabei entstehenden toxischen CO-Hb-Werte zurückzuführen ist. Damit könnte die Inhalation von CO einen neuen Therapieansatz zur Behandlung des akuten inflammatorischen Lungenschadens darstellen.

## 6 LITERATURVERZECHNIS

1. Applegate LA, Luscher P, Tyrrell RM: Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells. *Cancer Res* 1991;51:974-978.
2. Archer S, Michelakis E: The mechanism(s) of hypoxic pulmonary vasoconstriction: potassium channels, redox O(2) sensors, and controversies. *News Physiol Sci* 2002;17:131-137.
3. Archer SL, Huang J, Henry T, et al.: A redox-based O<sub>2</sub> sensor in rat pulmonary vasculature. *Circ Res* 1993;73:1100-1112.
4. Archer SL, London B, Hampl V, et al.: Impairment of hypoxic pulmonary vasoconstriction in mice lacking the voltage-gated potassium channel Kv1.5. *Faseb J* 2001;15:1801-1803.
5. Archer SL, Reeve HL, Michelakis E, et al.: O<sub>2</sub> sensing is preserved in mice lacking the gp91 phox subunit of NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:7944-7949.
6. Archer SL, Souil E, Dinh-Xuan AT, et al.: Molecular identification of the role of voltage-gated K<sup>+</sup> channels, Kv1.5 and Kv2.1, in hypoxic pulmonary vasoconstriction and control of resting membrane potential in rat pulmonary artery myocytes. *J Clin Invest* 1998;101:2319-2330.
7. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, et al.: Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967;2:319-323.
8. Attuwaybi BO, Kozar RA, Moore-Olufemi SD, et al.: Heme oxygenase-1 induction by hemin protects against gut ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 2004;118:53-57.
9. Barthels H: Glossary on respiration and gas exchange. *J Appl Physiol* 1973;34:549-558.
10. Berberat PO, Katori M, Kaczmarek E, et al.: Heavy chain ferritin acts as an antiapoptotic gene that protects livers from ischemia reperfusion injury. *Faseb J* 2003;17:1724-1726.
11. Berberat PO, Yi AR, Yamashita K, et al.: Heme oxygenase-1-generated biliverdin ameliorates experimental murine colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:350-359.
12. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, et al.: The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:818-824.

13. Bradford J, Dean H: The pulmonary circulation. *J Physiol* 1894;16:34-96.
14. Brittain T, Sutherland J, Greenwood C: A study of the kinetics of the reaction of ligands with the liganded states of mouse embryonic haemoglobins. *Biochem J* 1986;234:151-155.
15. Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, et al.: Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* 2000;192:1015-1026.
16. Brune B, Ullrich V: Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase. *Mol Pharmacol* 1987;32:497-504.
17. Bshouty Z, Younes M: Distensibility and pressure-flow relationship of the pulmonary circulation. II. Multibranched model. *J Appl Physiol* 1990;68:1514-1527.
18. Calabrese V, Ravagna A, Colombrita C, et al.: Acetylcarnitine induces heme oxygenase in rat astrocytes and protects against oxidative stress: involvement of the transcription factor Nrf2. *J Neurosci Res* 2005;79:509-521.
19. Chapman JT, Otterbein LE, Elias JA, et al.: Carbon monoxide attenuates aeroallergen-induced inflammation in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281:L209-216.
20. Clark JE, Foresti R, Sarathchandra P, et al.: Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278:H643-651.
21. Clayton CE, Carraway MS, Suliman HB, et al.: Inhaled carbon monoxide and hyperoxic lung injury in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281:L949-957.
22. Coburn RF, Blakemore WS, Forster RE: Endogenous carbon monoxide production in man. *J Clin Invest* 1963;42:1172-1178.
23. Cutaia M, Rounds S: Hypoxic pulmonary vasoconstriction. Physiologic significance, mechanism, and clinical relevance. *Chest* 1990;97:706-718.
24. Dolinay T, Szilasi M, Liu M, et al.: Inhaled carbon monoxide confers antiinflammatory effects against ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:613-620.
25. Dorman RB, Bajt ML, Farhood A, et al.: Heme oxygenase-1 induction in hepatocytes and non-parenchymal cells protects against liver injury during endotoxemia. *Comp Hepatol* 2004;3 Suppl 1:S42.
26. Engel RR, Rodkey FL, O'Neal JD, et al.: Relative affinity of human fetal hemoglobin for carbon monoxide and oxygen. *Blood* 1969;33:37-45.

27. Fowler AA, Hamman RF, Good JT, et al.: Adult respiratory distress syndrome: risk with common predispositions. *Ann Intern Med* 1983;98:593-597.
28. Frank DU, Lowson SM, Roos CM, et al.: Endotoxin alters hypoxic pulmonary vasoconstriction in isolated rat lungs. *J Appl Physiol* 1996;81:1316-1322.
29. Fujita T, Toda K, Karimova A, et al.: Paradoxical rescue from ischemic lung injury by inhaled carbon monoxide driven by derepression of fibrinolysis. *Nat Med* 2001;7:598-604.
30. Fukuda K, Richmon JD, Sato M, et al.: Induction of heme oxygenase-1 (HO-1) in glia after traumatic brain injury. *Brain Res* 1996;736:68-75.
31. Furchgott RF, Jothianandan D: Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood Vessels* 1991;28:52-61.
32. Galley HF, Webster NR: Acidosis and tissue hypoxia in the critically ill: how to measure it and what does it mean. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1999;36:35-60.
33. Gelband CH, Gelband H: Ca<sup>2+</sup> release from intracellular stores is an initial step in hypoxic pulmonary vasoconstriction of rat pulmonary artery resistance vessels. *Circulation* 1997;96:3647-3654.
34. Ghosh S, Wilson MR, Choudhury S, et al.: Effects of inhaled carbon monoxide on acute lung injury in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;288:L1003-1009.
35. Graham LM, Vasil A, Vasil ML, et al.: Decreased pulmonary vasoreactivity in an animal model of chronic *Pseudomonas pneumonia*. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:221-229.
36. Hancock WW, Buelow R, Sayegh MH, et al.: Antibody-induced transplant arteriosclerosis is prevented by graft expression of anti-oxidant and anti-apoptotic genes. *Nat Med* 1998;4:1392-1396.
37. Hangaishi M, Ishizaka N, Aizawa T, et al.: Induction of heme oxygenase-1 can act protectively against cardiac ischemia/reperfusion in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279:582-588.
38. Hasegawa J, Wagner KF, Karp D, et al.: Altered pulmonary vascular reactivity in mice with excessive erythrocytosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:829-835.
39. Hayashi S, Takamiya R, Yamaguchi T, et al.: Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. *Circ Res* 1999;85:663-671.

40. Hedenstierna G: Mechanics of the respiratory system in ARDS. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* 1991;95:29-33; discussion 33-24.
41. Held HD, Uhlig S: Mechanisms of endotoxin-induced airway and pulmonary vascular hyperreactivity in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1547-1552.
42. Hoetzel A, Dolinay T, Schmidt R, et al.: Carbon monoxide in sepsis. *Antioxid Redox Signal* 2007;9:2013-2026.
43. Holm BA, Notter RH: Effects of hemoglobin and cell membrane lipids on pulmonary surfactant activity. *J Appl Physiol* 1987;63:1434-1442.
44. Holzmann A, Manktelow C, Taut FJ, et al.: Inhibition of nitric oxide synthase prevents hyporesponsiveness to inhaled nitric oxide in lungs from endotoxin-challenged rats. *Anesthesiology* 1999;91:215-221.
45. Hudson LD, Milberg JA, Anardi D, et al.: Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:293-301.
46. Johansen B, Melsom MN, Flatebo T, et al.: Time course and pattern of pulmonary flow distribution following unilateral airway occlusion in sheep. *Clin Sci (Lond)* 1998;94:453-460.
47. Kajimura M, Goda N, Suematsu M: Organ design for generation and reception of CO: lessons from the liver. *Antioxid Redox Signal* 2002;4:633-637.
48. Kawamura K, Ishikawa K, Wada Y, et al.: Bilirubin from heme oxygenase-1 attenuates vascular endothelial activation and dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:155-160.
49. Kohmoto J, Nakao A, Kaizu T, et al.: Low-dose carbon monoxide inhalation prevents ischemia/reperfusion injury of transplanted rat lung grafts. *Surgery* 2006;140:179-185.
50. Kozlowski RZ: Ion channels, oxygen sensation and signal transduction in pulmonary arterial smooth muscle. *Cardiovasc Res* 1995;30:318-325.
51. Lewandowski K, Metz J, Deutschmann C, et al.: Incidence, severity, and mortality of acute respiratory failure in Berlin, Germany. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1121-1125.
52. Liu SH, Ma K, Xu B, et al.: Carbon monoxide inhalation protects lung from lipopolysaccharide-induced injury in rat. *Sheng Li Xue Bao* 2006;58:483-489.

53. Maeshima H, Sato M, Ishikawa K, et al.: Participation of altered upstream stimulatory factor in the induction of rat heme oxygenase-1 by cadmium. *Nucleic Acids Res* 1996;24:2959-2965.
54. Maines MD: Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *Faseb J* 1988;2:2557-2568.
55. Maines MD: The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:517-554.
56. Maines MD, Trakshel GM, Kutty RK: Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem* 1986;261:411-419.
57. Marshall BE, Hanson CW, Frasch F, et al.: Role of hypoxic pulmonary vasoconstriction in pulmonary gas exchange and blood flow distribution. 2. Pathophysiology. *Intensive Care Med* 1994;20:379-389.
58. Marshall BE, Marshall C, Frasch F, et al.: Role of hypoxic pulmonary vasoconstriction in pulmonary gas exchange and blood flow distribution. 1. Physiologic concepts. *Intensive Care Med* 1994;20:291-297.
59. Martin GS: Fluid balance and colloid osmotic pressure in acute respiratory failure: emerging clinical evidence. *Crit Care* 2000;4 Suppl 2:S21-25.
60. Mayr FB, Spiel A, Leitner J, et al.: Effects of carbon monoxide inhalation during experimental endotoxemia in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:354-360.
61. Mazzola S, Forni M, Albertini M, et al.: Inhaled carbon monoxide (CO) prevents lung oedema induced by endotoxic shock. *Vet Res Commun* 2004;28 Suppl 1:209-212.
62. Mazzola S, Forni M, Albertini M, et al.: Carbon monoxide pretreatment prevents respiratory derangement and ameliorates hyperacute endotoxic shock in pigs. *Faseb J* 2005;19:2045-2047.
63. McCoubrey WK, Jr., Ewing JF, Maines MD: Human heme oxygenase-2: characterization and expression of a full-length cDNA and evidence suggesting that the two HO-2 transcripts may differ by choice of polyadenylation signal. *Arch Biochem Biophys* 1992;295:13-20.
64. McCoubrey WK, Jr., Huang TJ, Maines MD: Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 1997;247:725-732.

65. Monaco JA, Burke-Wolin T: NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mechanisms of guanylate cyclase activation in oxygen-dependent responses of rat pulmonary circulation. *Am J Physiol* 1995;268:L546-550.
66. Morita T, Kourembanas S: Endothelial cell expression of vasoconstrictors and growth factors is regulated by smooth muscle cell-derived carbon monoxide. *J Clin Invest* 1995;96:2676-2682.
67. Morita T, Mitsialis SA, Koike H, et al.: Carbon monoxide controls the proliferation of hypoxic vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1997;272:32804-32809.
68. Morita T, Perrella MA, Lee ME, et al.: Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:1475-1479.
69. Morse D, Choi AM: Heme oxygenase-1: the "emerging molecule" has arrived. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;27:8-16.
70. Morse D, Pischke SE, Zhou Z, et al.: Suppression of inflammatory cytokine production by carbon monoxide involves the JNK pathway and AP-1. *J Biol Chem* 2003;278:36993-36998.
71. Mosley K, Wembridge DE, Cattell V, et al.: Heme oxygenase is induced in nephrotoxic nephritis and hemin, a stimulator of heme oxygenase synthesis, ameliorates disease. *Kidney Int* 1998;53:672-678.
72. Network TARDS: Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. *N Engl J Med* 2000;342:1301-1308.
73. Ning W, Choi AM, Li C: Carbon monoxide inhibits IL-17-induced IL-6 production through the MAPK pathway in human pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;289:L268-273.
74. O'Regan RG, Majcherczyk S: Role of peripheral chemoreceptors and central chemosensitivity in the regulation of respiration and circulation. *J Exp Biol* 1982;100:23-40.
75. Ott MC, Scott JR, Bihari A, et al.: Inhalation of carbon monoxide prevents liver injury and inflammation following hind limb ischemia/reperfusion. *Faseb J* 2005;19:106-108.
76. Otterbein L, Sylvester SL, Choi AM: Hemoglobin provides protection against lethal endotoxemia in rats: the role of heme oxygenase-1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;13:595-601.

77. Otterbein LE, Bach FH, Alam J, et al.: Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 2000;6:422-428.
78. Otterbein LE, Choi AM: Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:L1029-1037.
79. Otterbein LE, Mantell LL, Choi AM: Carbon monoxide provides protection against hyperoxic lung injury. *Am J Physiol* 1999;276:L688-694.
80. Otterbein LE, Otterbein SL, Ifedigbo E, et al.: MKK3 mitogen-activated protein kinase pathway mediates carbon monoxide-induced protection against oxidant-induced lung injury. *Am J Pathol* 2003;163:2555-2563.
81. Patel AJ, Lazdunski M, Honore E: Kv2.1/Kv9.3, a novel ATP-dependent delayed-rectifier K<sup>+</sup> channel in oxygen-sensitive pulmonary artery myocytes. *Embo J* 1997;16:6615-6625.
82. Peterson JE, Stewart RD: Predicting the carboxyhemoglobin levels resulting from carbon monoxide exposures. *J Appl Physiol* 1975;39:633-638.
83. Piantadosi CA: Biological chemistry of carbon monoxide. *Antioxid Redox Signal* 2002;4:259-270.
84. Post JM, Hume JR, Archer SL, et al.: Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol* 1992;262:C882-890.
85. Radermacher P, Santak B, Becker H, et al.: Prostaglandin E1 and nitroglycerin reduce pulmonary capillary pressure but worsen ventilation-perfusion distributions in patients with adult respiratory distress syndrome. *Anesthesiology* 1989;70:601-606.
86. Radford EP, Drizd TA: Blood carbon monoxide levels in persons 3-74 years of age: United States, 1976-80. *Adv Data* 1982;17:1-24.
87. Ramos KS, Lin H, McGrath JJ: Modulation of cyclic guanosine monophosphate levels in cultured aortic smooth muscle cells by carbon monoxide. *Biochem Pharmacol* 1989;38:1368-1370.
88. Reeves JT, Grover RF: Blockade of acute hypoxic pulmonary hypertension by endotoxin. *J Appl Physiol* 1974;36:328-332.
89. Reeves JT, Rubin LJ: The pulmonary circulation: snapshots of progress. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:S101-108.

90. Resta TC, O'Donoghue TL, Earley S, et al.: Unaltered vasoconstrictor responsiveness after iNOS inhibition in lungs from chronically hypoxic rats. *Am J Physiol* 1999;276:L122-130.
91. Sarady-Andrews J, Liu F, Gallo D, et al.: Biliverdin Administration Protects against Endotoxin-Induced Acute Lung Injury in Rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005.
92. Sarady JK, Otterbein SL, Liu F, et al.: Carbon monoxide modulates endotoxin-induced production of granulocyte macrophage colony-stimulating factor in macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;27:739-745.
93. Sarady JK, Zuckerbraun BS, Bilban M, et al.: Carbon monoxide protection against endotoxic shock involves reciprocal effects on iNOS in the lung and liver. *Faseb J* 2004;18:854-856.
94. Sass G, Soares MC, Yamashita K, et al.: Heme oxygenase-1 and its reaction product, carbon monoxide, prevent inflammation-related apoptotic liver damage in mice. *Hepatology* 2003;38:909-918.
95. Seeger W, Elssner A, Gunther A, et al.: Lung surfactant phospholipids associate with polymerizing fibrin: loss of surface activity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993;9:213-220.
96. Sibbald WJ, Driedger AA, Myers ML, et al.: Biventricular function in the adult respiratory distress syndrome. *Chest* 1983;84:126-134.
97. Sloane PJ, Gee MH, Gottlieb JE, et al.: A multicenter registry of patients with acute respiratory distress syndrome. Physiology and outcome. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:419-426.
98. Soares MP, Lin Y, Anrather J, et al.: Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. *Nat Med* 1998;4:1073-1077.
99. Song R, Kubo M, Morse D, et al.: Carbon monoxide induces cytoprotection in rat orthotopic lung transplantation via anti-inflammatory and anti-apoptotic effects. *Am J Pathol* 2003;163:231-242.
100. Song R, Mahidhara RS, Liu F, et al.: Carbon monoxide inhibits human airway smooth muscle cell proliferation via mitogen-activated protein kinase pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;27:603-610.
101. Spohr F, Busch CJ, Reich C, et al.: 4-Aminopyridine restores impaired hypoxic pulmonary vasoconstriction in endotoxemic mice. *Anesthesiology* 2007;107:597-604.

102. Spohr F, Cornelissen AJ, Busch C, et al.: Role of endogenous nitric oxide in endotoxin-induced alteration of hypoxic pulmonary vasoconstriction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H823-831.
103. Stone JR, Marletta MA: Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* 1994;33:5636-5640.
104. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R: The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1968;61:748-755.
105. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R: Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem* 1969;244:6388-6394.
106. Theissen JL, Loick HM, Curry BB, et al.: Time course of hypoxic pulmonary vasoconstriction after endotoxin infusion in unanesthetized sheep. *J Appl Physiol* 1991;70:2120-2125.
107. Thomsen GE, Morris AH: Incidence of the adult respiratory distress syndrome in the state of Utah. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:965-971.
108. Thorup C, Jones CL, Gross SS, et al.: Carbon monoxide induces vasodilation and nitric oxide release but suppresses endothelial NOS. *Am J Physiol* 1999;277:F882-889.
109. Tobiasch E, Gunther L, Bach FH: Heme oxygenase-1 protects pancreatic beta cells from apoptosis caused by various stimuli. *J Investig Med* 2001;49:566-571.
110. Tyrrell RM, Applegate LA, Tromvoukis Y: The proximal promoter region of the human heme oxygenase gene contains elements involved in stimulation of transcriptional activity by a variety of agents including oxidants. *Carcinogenesis* 1993;14:761-765.
111. Uehara K, Takahashi T, Fujii H, et al.: The lower intestinal tract-specific induction of heme oxygenase-1 by glutamine protects against endotoxemic intestinal injury. *Crit Care Med* 2005;33:381-390.
112. Ullrich R, Bloch KD, Ichinose F, et al.: Hypoxic pulmonary blood flow redistribution and arterial oxygenation in endotoxin-challenged NOS2-deficient mice. *J Clin Invest* 1999;104:1421-1429.
113. Vachharajani TJ, Work J, Issekutz AC, et al.: Heme oxygenase modulates selectin expression in different regional vascular beds. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278:H1613-1617.

114. Vicente AM, Guillen MI, Habib A, et al.: Beneficial effects of heme oxygenase-1 up-regulation in the development of experimental inflammation induced by zymosan. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;307:1030-1037.
115. Vile GF, Tyrrell RM: Oxidative stress resulting from ultraviolet A irradiation of human skin fibroblasts leads to a heme oxygenase-dependent increase in ferritin. *J Biol Chem* 1993;268:14678-14681.
116. Villar J, Blazquez MA, Lubillo S, et al.: Pulmonary hypertension in acute respiratory failure. *Crit Care Med* 1989;17:523-526.
117. Villar J, Slutsky AS: The incidence of the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1989;140:814-816.
118. Vlahakes GJ, Turley K, Hoffman JI: The pathophysiology of failure in acute right ventricular hypertension: hemodynamic and biochemical correlations. *Circulation* 1981;63:87-95.
119. Voelkel NF: Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am Rev Respir Dis* 1986;133:1186-1195.
120. Von Burg R: Carbon monoxide. *J Appl Toxicol* 1999;19:379-386.
121. von Euler US, Liljestrand G: Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta Physiol Scand* 1946;12:301-320.
122. Vreman HJ, Mahoney JJ, Stevenson DK: Carbon monoxide and carboxyhemoglobin. *Adv Pediatr* 1995;42:303-334.
123. Wagner PD, Saltzman HA, West JB: Measurement of continuous distributions of ventilation-perfusion ratios: theory. *J Appl Physiol* 1974;36:588-599.
124. Wang WP, Guo X, Koo MW, et al.: Protective role of heme oxygenase-1 on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G586-594.
125. Watson ES, Jones AB, Ashfaq MK, et al.: Spectrophotometric evaluation of carboxyhemoglobin in blood of mice after exposure to marijuana or tobacco smoke in a modified Walton horizontal smoke exposure machine. *J Anal Toxicol* 1987;11:19-23.
126. Weimann J, Bauer H, Bigatello L, et al.: ABO blood group and inhaled nitric oxide in acute respiratory distress syndrome. *Lancet* 1998;351:1786-1787.
127. Weimann J, Bloch KD, Takata M, et al.: Congenital NOS2 deficiency protects mice from LPS-induced hyporesponsiveness to inhaled nitric oxide. *Anesthesiology* 1999;91:1744-1753.

128. Weir EK, Archer SL: The mechanism of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: the tale of two channels. *Faseb J* 1995;9:183-189.
129. Weissmann N, Akkayagil E, Quanz K, et al.: Basic features of hypoxic pulmonary vasoconstriction in mice. *Respir Physiol Neurobiol* 2004;139:191-202.
130. Weissmann N, Zeller S, Schafer RU, et al.: Impact of mitochondria and NADPH oxidases on acute and sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;34:505-513.
131. West JB, Wagner PD: Pulmonary gas exchange. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:S82-87.
132. Widdop B: Analysis of carbon monoxide. *Ann Clin Biochem* 2002;39:378-391.
133. Wiener-Kronish JP, Gropper MA, Matthay MA: The adult respiratory distress syndrome: definition and prognosis, pathogenesis and treatment. *Br J Anaesth* 1990;65:107-129.
134. Winkler GC: Review of the significance of pulmonary intravascular macrophages with respect to animal species and age. *Exp Cell Biol* 1989;57:281-286.
135. Winter PM, Miller JN: Carbon monoxide poisoning. *Jama* 1976;236:1502.
136. Zampetaki A, Minamino T, Mitsialis SA, et al.: Effect of heme oxygenase-1 overexpression in two models of lung inflammation. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003;228:442-446.
137. Zapol WM, Snider MT: Pulmonary hypertension in severe acute respiratory failure. *N Engl J Med* 1977;296:476-480.
138. Zapol WM, Snider MT, Hill JD, et al.: Extracorporeal membrane oxygenation in severe acute respiratory failure. A randomized prospective study. *Jama* 1979;242:2193-2196.
139. Zhang X, Shan P, Alam J, et al.: Carbon monoxide differentially modulates STAT1 and STAT3 and inhibits apoptosis via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and p38 kinase-dependent STAT3 pathway during anoxia-reoxygenation injury. *J Biol Chem* 2005;280:8714-8721.
140. Zhou H, Lu F, Latham C, et al.: Heme oxygenase-1 expression in human lungs with cystic fibrosis and cytoprotective effects against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:633-640.
141. Zuckerbraun BS, Chin BY, Wegiel B, et al.: Carbon monoxide reverses established pulmonary hypertension. *J Exp Med* 2006;203:2109-2119.

## 7 Lebenslauf

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

## 8 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die durch Ihre Hilfe zum Ermöglichen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Hierbei sind folgende Personen besonders zu erwähnen:

Besonderen Dank gebührt Herrn Prof. Dr. med. J. Weimann für das freundliche Überlassen des Themas und die ausgezeichnete Betreuung der Arbeit.

Seine konstruktiven Ratschläge, die gemeinsamen Diskussionen, die intensive Zusammenarbeit, seine Kritik und sein Zeitaufwand muss erwähnt werden, ohne die an ein Gelingen der Arbeit nicht zu denken gewesen wäre. Auch die über die Arbeit hinausgehende Unterstützung in studientechnischen Belangen und Zukunftsplanung muss gewürdigt werden. Eine solche Betreuung kann sich jeder Doktorand nur erhoffen.

Ich danke meinen Eltern für die finanzielle und psychische Unterstützung während der Arbeit und des gesamten Studiums.

Ich danke meiner Schwester Isabel und Lukas Eberle für Ihre freundliche Durchsicht und der damit verbundenen orthographischen Kontrolle der Arbeit.

Dank gebührt auch Herrn Dr. med. H. Abele für die freundliche Durchsicht und die konstruktive Kritik an der Arbeit und den damit verbundenen Korrekturen.

Außerdem Herrn Prof. Dr. med. Pries für die freundliche Möglichkeit der Nutzung der Laborräume während der Versuche.

Des Weiteren Frau Silvia May, Frau Ursula Hilse und Frau Sabine Hahn für ihr Organisationsgeschick und die Hilfe bei Materialbeschaffung vor, während und nach den Versuchen.

## 9 Erklärung an Eides Statt

„Ich, Daniel David Oswald, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Einfluss von inhaliertem Kohlenmonoxid auf die hypoxisch pulmonale Vaso-  
konstriktion (HPV) während Sepsis im Modell der isoliert perfundierten Mäuselunge“  
selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt,  
ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer  
Arbeiten dargestellt habe.“

15. April 2008

Daniel David Oswald