

Aus der Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin
Campus Charité Mitte & Campus Virchow-Klinikum
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Der Einfluss von inhaliertem Nitrit auf die durch Surfactant-Depletion
induzierte akute Lungenschädigung**

zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Philipp Lothar
aus Anklam

Datum der Promotion: 18.12.2020

Vorwort

Teile der in der vorgelegten Arbeit enthaltenen Daten wurden in Poster-Präsentationen im Rahmen des *International Hypoxia Symposia* 2013 in Lake Louise, Alberta, Kanada und dem Kongress der *American Thoracic Society* (ATS) 2014 in San Diego, Kalifornien, USA vorgestellt und veröffentlicht (1).

Vorwort	I
<i>Tabellenverzeichnis</i>	<i>V</i>
<i>Abbildungsverzeichnis</i>	<i>V</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>VI</i>
Zusammenfassung	VIII
Abstract	X
1 Einleitung	1
1.1 Das akute Lungenversagen - Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)	1
1.1.1 Definition des ARDS nach Ashbaugh.....	1
1.1.2 Der Lung Injury Score nach Murray	1
1.1.3 Die Definition der American-European Consensus Conference (AECC)	2
1.1.4 Berlin-Definition des ARDS	3
1.2 Stickstoffmonoxid (NO)	4
1.2.2 Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) im Blut.....	6
1.2.3 Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) im Gewebe.....	6
1.3 Pathophysiologische Rolle und therapeutische Wirkung von Nitrit (NO₂⁻)	7
1.4 Konzept der Nitrit (NO₂⁻)-basierten Therapie bei ARDS und Entwicklung der Fragestellung	8
1.4.1 Hypothese 1	9
1.4.2 Hypothese 2	9
2 Material und Methoden	10
2.1 Nachweis von Nitrit (NO₂⁻)-Reduktase-unabhängig gebildetem Stickstoffmonoxid (NO)	10
2.1.1 Versuchsaufbau	10
2.1.2 Versuchsprotokoll	11
2.1.3 Durchführung	12
2.1.3.1 Datenanalyse	12
2.2 Nachweis von Stickstoffmonoxid (NO) bei inhalativer Gabe von Nitrit (NO₂⁻) bei Surfactant-depletierten Schweinen	13
2.2.1 Tierhaltung	13
2.2.2 Versuchsprotokoll	13
2.2.2.1 Vorbereitung der Versuchstiere	14
2.2.2.2 Beatmung der Versuchstiere	16
2.2.2.3 Induktion des Lungenschadens	16
2.2.2.4 Messung hämodynamischer Parameter.....	17
2.2.2.5 Messung des Urinvolumens	18
2.2.2.6 Messung respiratorischer Parameter	18
2.2.2.7 Messung von exhaliertem Stickstoff (NO _{ex}).....	18
2.2.2.8 Quantitative Laboranalyse	19

2.2.2.9	Quantifizierung des Lungenödems	20
2.2.2.10	Datenanalyse	21
3	Ergebnisse	22
3.1	<i>Nitrit (NO₂⁻)-Reduktase-unabhängige Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) in vitro</i>	22
3.2	<i>Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) bei inhalativer Gabe von Nitrit (NO₂⁻) bei Surfactant-depletierten Schweinen</i>	23
3.2.1	Exhaliertes Stickstoffmonoxid (NO _{ex})	23
3.2.2	Arterielle Fraktion des Methämoglobin (MetHb)	24
3.2.3	Arterieller Sauerstoffpartialdruck (P _a O ₂)	25
3.2.4	Arterieller Sauerstoffgehalt (C _a O ₂)	26
3.2.5	Arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck (P _a CO ₂).....	27
3.2.6	Mittlerer pulmonalerarterieller Blutdruck (MPAP).....	28
3.2.7	Pulmonalvaskulärer Widerstand (PVR)	29
3.2.8	Pulmonale wet-to-dry-Ratio	30
3.2.9	Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP).....	31
3.2.10	Systemischer Gefäßwiderstand (SVR).....	32
3.2.11	Zentralvenöser Druck (ZVD).....	33
3.2.12	Herzzeitvolumen (HZV).....	34
4	Diskussion	35
4.1	<i>Untersuchungen zur Nitrit (NO₂⁻)-bedingten Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion unter physiologischen Bedingungen.....</i>	35
4.1.1	Nitrit (NO ₂ ⁻)-Reduktase-unabhängige Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) in vitro	35
4.1.2	Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) bei inhalativer Gabe von Nitrit (NO ₂ ⁻) im experimentell induzierten akuten Lungenschaden bei Surfactant-depletierten Schweinen	36
4.2	<i>Untersuchungen zur Verbesserung der Oxygenierung während eines experimentell induzierten Lungenschadens bei Surfactant-depletierten Schweinen durch inhaliertes Nitrit (NO₂⁻)</i>	37
4.2.1	Einfluss von inhaliertem Nitrit (NO ₂ ⁻) auf Hämoglobin (Hb) und Methämoglobin (MetHb)	37
4.2.2	Einfluss von inhaliertem Nitrit (NO ₂ ⁻) auf den arteriellen Sauerstoffpartialdruck (P _a O ₂), den Sauerstoffgehalt (C _a O ₂) und den Kohlenstoffdioxidpartialdruck (P _a CO ₂)	38
4.2.3	Einfluss von inhaliertem Nitrit (NO ₂ ⁻) auf die pulmonale Hämodynamik und Ödembildung.....	39
4.2.4	Einfluss von Nitrit (NO ₂ ⁻) auf die systemische Hämodynamik	41
4.3	<i>Methodenkritik.....</i>	42
4.3.1	Der Versuchsaufbau der In-vitro-Versuche	42
4.3.2	Das Hausschwein als Modellorganismus	42
4.3.3	Das Surfactant-Depletionsmodell.....	42

5	Literaturverzeichnis	44
6	Eidesstattliche Versicherung.....	49
7	Anteilerklärung an erfolgten Publikationen	50
8	Lebenslauf.....	51
9	Publikationen.....	52
9.1	<i>Artikel</i>.....	52
9.2	<i>Poster/ Abstracts</i>	52
10	Danksagung	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Lung Injury Score nach Murray	2
Tabelle 2: Erweiterte Definitionskriterien der AECC 2005	3
Tabelle 3: Berlin Definition des ARDS	4
Tabelle 4: Charakteristika der NaNO ₂ -Inhalation	12

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stoffwechselwege zur Synthese von NO unter Normoxie und Hypoxie.....	5
Abbildung 2: Versuchsaufbau zur Überprüfung einer NO ₂ ⁻ -Reduktase-unabhängigen Bildung von NO mit einer Testlunge	11
Abbildung 3: Exhalierendes NO (NO _{ex}) einer beatmeten Testlunge unter Einleitung von verschiedenen Konzentrationen von NaNO ₂ in den Inspirationsschenkel.....	22
Abbildung 4: Bildung von exhalierendem NO (NO _{ex}) im zeitlichen Verlauf bei Surfactant-depletierten Schweinen der Interventions- und Kontrollgruppe	23
Abbildung 5: Anteil des arteriellen Methämoglobin (MetHb) im zeitlichen Verlauf bei Surfactant-depletierten Schweinen der Interventions- und Kontrollgruppe.....	24
Abbildung 6: Arterieller Sauerstoffpartialdruck (PaO ₂) im zeitlichen Verlauf bei Surfactant-depletierten Schweinen der Interventions- und Kontrollgruppe	25
Abbildung 7: Arterieller Sauerstoffgehalt (CaO ₂) im zeitlichen Verlauf bei Surfactant-depletierten Schweinen der Interventions- und Kontrollgruppe	26
Abbildung 8: Arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdrucks (PaCO ₂) im zeitlichen Verlauf bei Surfactant-depletierten Schweinen der Interventions- und Kontrollgruppe.....	27
Abbildung 9: Pulmonalarterieller Druck (MPAP) im zeitlichen Verlauf bei Surfactant-depletierten Schweinen der Interventions- und Kontrollgruppe	28
Abbildung 10: Pulmonalvaskulärer Widerstand (PVR) im zeitlichen Verlauf bei Surfactant-depletierten Schweinen der Interventions- und Kontrollgruppe	29
Abbildung 11: Pulmonale <i>wet-to-dry-Ratio</i> der Interventions- und Kontrollgruppe.....	30
Abbildung 12: Rechte Lunge nach Versuchsende.	30
Abbildung 13 Mittlerer arterieller Blutdruck im zeitlichen Verlauf bei Surfactant-depletierten Schweinen der Interventions- und Kontrollgruppe	31

Tabellen-, Abbildungs- und Abkürzungsverzeichnis

Abbildung 14: Systemischer Gefäßwiderstand (SVR) im zeitlichen Verlauf bei Surfactant-depletierten Schweinen der Interventions- und Kontrollgruppe	32
Abbildung 15: Zentralvenöser Druck (ZVD) im zeitlichen Verlauf bei Surfactant-depletierten Schweinen der Interventions- und Kontrollgruppe	33
Abbildung 16: Herzzeitvolumen (HZV) im zeitlichen Verlauf bei Surfactant-depletierten Schweinen der Interventions- und Kontrollgruppe	34

Abkürzungsverzeichnis

ABE	Base Excess
AECC	American-European Consensus Conference
ALI	akute Lungenschädigung
AMV	Atemminutenvolumen
AO	Aldehydoxidase
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
BGA	Blutgasanalyse
C_aO_2	Arterieller Sauerstoffgehalt
C_cO_2	pulmonal-kapillärer Sauerstoffgehalt
cO_2	Sauerstoffgehalt
COHb	Carboxyhämoglobin
CPAP	kontinuierlich positiver Beatmungsdruck
C_vO_2	Venöser Sauerstoffgehalt
DO_2	Sauerstoffangebot
eNOS	NO-Synthase in Endothelzellen
etCO ₂	expiratorisches Kohlenstoffdioxid
Fe^{2+}	zweiwertiges Eisen
Fe^{3+}	dreiwertiges Eisen
FEM	Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin der Charité
FiO_2	inspiratorische Sauerstofffraktion
FO ₂ Hb	Oxyhämoglobinfraktion
Hb	Hämoglobin
HCO_3^-	Bikarbonat
HZV	Herzzeitvolumen
i. m.	intramuskulär
i. v.	intravenös
I/R	Ischämie-/Reperfusionsschädigung
iNOS	induzierbare NO-Synthase
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
MetHb	Methämoglobin

Tabellen-, Abbildungs- und Abkürzungsverzeichnis

MPAP	mittlerer pulmonalarterieller Druck
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
NO _{ex}	exhalirtes Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
O ₂	Sauerstoff
OBC	Ozon-basierte Chemilumineszenz
P _a CO ₂	arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck
P _a O ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PaO ₂ / FiO ₂	Horovitz-Quotient
PAP	pulmonalarteriellen Druck
PCV-VG	druckkontrollierter-volumengarantierter Modus
PCWP	pulmonalarterieller Verschlussdruck
PEEP	positiver endexpiratorischer Druck
PVR	pulmonalvaskulärer Widerstand
Q _s / Q _t	Shuntfraktion
ROS	Sauerstoffradikale
sO ₂	unfraktionierte O ₂ -Sättigung
SVR	systemischer vaskulärer Widerstand
SVV	Schlagvolumenvariabilität
TIVA	total intravenöse Narkose
V / Q	Ventilations-Perfusions-Verhältnis
V _T	Tidalvolumen
XO	Xanthinoxireduktase
ZVD	zentralvenöser Druck

Zusammenfassung

Das akute Lungenversagen (engl.: Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS) ist nach der „Berlin Definition“ definiert als das Vorliegen bilateraler Infiltrate der Lunge ohne Herzversagen oder Hypervolämie, wenn bei gleichzeitiger Applikation eines positiv end-expiratorischen Atemwegsdruck (PEEP) von über 5 cmH₂O der Horovitz-Quotient < 300 mmHG liegt (2).

In der ARDS-Therapie ist die Inhalation von Stickstoffmonoxid (NO), welches den pulmonalen Blutfluss durch Vasodilatation beeinflusst (3) und sich so positiv auf die Oxygenierung auswirkt, eine etablierte Therapiemaßnahme. Nitrit (NO₂⁻) hat durch die Reduktion zu NO zytoprotektive Eigenschaften (4; 5; 6) und reduziert den pulmonal-arteriellen Druck (7; 8). Daher leiteten sich für die vorliegende Arbeit die Hypothesen ab, dass durch NO₂⁻-Inhalation bei Surfactant-depletierten Schweinen eine erhöhte NO-Konzentration expiratorisch messbar ist und inhaliertes NO₂⁻ die Oxygenierung während eines experimentell induzierten Lungenschadens verbessert.

Um die NO₂⁻-Reduktase-unabhängige Reduktion von NO₂⁻ zu NO *in vitro* zu prüfen, wurde Natriumnitrit (NaNO₂) über 20 min inhalativ in eine Testlunge appliziert (1,5 mg/min, 7,5 mg/min, 75 mg/min). Bei allen Konzentrationen kam es zu einer signifikanten Produktion von NO, sodass eine spontane Reduktion von NO₂⁻ zu NO ohne enzymatische Reaktion nachgewiesen werden konnte.

In vivo wurde die Bildung von NO bei NO₂⁻-Inhalation an weiblichen Hausschweinen untersucht. Bei allen Versuchstieren (N = 14) wurde eine Lavage der Lunge durchgeführt (9), um ein eine schwere Lungenschädigung zu etablieren. Die Kontrollgruppe (n = 7) wurde danach 5 h beobachtet. Bei der Interventionsgruppe (n = 7) erfolgten eine 20-minütige Inhalation (30 mg/min NaNO₂) nach Etablierung des Lungenschadens und eine 4 h 40-minütige Beobachtung. Bei allen Versuchstieren wurden expiratorische NO-Produktion, hämodynamische und Blutgasparameter gemessen sowie nach Versuchsende Proben der rechten Lunge entnommen.

In der Interventionsgruppe stieg das exhalierte NO *in vivo* während der Inhalation höher als *in vitro*. Dies zeigt, dass es *in vivo* zu einer Reduktion von NO₂⁻ zu NO während eines induzierten Lungenschadens kam.

Die Oxygenierung wurde durch die Inhalation von NO₂⁻ nicht verbessert. Met-Hämoglobin stieg signifikant an, blieb jedoch unter dem toxischen Grenzwert (10). Lokale Effekte von NO₂⁻ auf den mittleren pulmonalarteriellen Druck in der Interventionsgruppe waren nicht

Zusammenfassung

nachweisbar. Der pulmonalvaskuläre Widerstand und die Ödembildung wurden ebenfalls nicht beeinflusst. Systemisch wurde kein Effekt von inhaliertem NO_2^- auf den mittleren arteriellen Druck, zentralvenösen Druck oder das Herzzeitvolumen gemessen.

Die vorliegende Studie zeigt, dass die Applikation von NO_2^- in Form einer 20-minütigen Inhalation von 30 mg/min NaNO_2 die pulmonale und systemische Hämodynamik bei Surfactant-depletierten Hausschweinen nicht beeinflusst und die Oxygenierung unverändert bleibt.

Abstract

The *acute respiratory distress syndrome* (ARDS) is defined by the *Berlin ARDS Definition*. The characteristics of ARDS are an onset within one week, bilateral opacities of the lung, respiratory failure without cardiac fluid overload or failure, and a ratio between the partial pressure of oxygen (PaO_2) and the fraction of inspired oxygen (FiO_2) below 300 mmHg (2).

Nitric oxide (NO) is an established therapeutic option for ARDS therapy as NO influences the pulmonary blood flow via vasodilatation (3) and thus has positive effects on blood oxygenation. Of note, the reduction of nitrite (NO_2^-) to NO has cytoprotective characteristics (4; 5; 6) and also reduces elevated pulmonary arterial pressures (7; 8).

The hypotheses of this study are that expiratory concentrations of NO will be detected during inhalation of NO_2^- and that inhaled NO_2^- increases blood oxygenation in surfactant-depleted pigs with severe acute lung injury.

To test whether the reduction of NO_2^- to NO is independent of NO_2^- reductases, sodium nitrite (NaNO_2) was aerosolized and injected into an anorganic test lung system over 20 min (1,5 mg/min, 7,5 mg/min, 75 mg/min). A significant production of NO was measured with all concentrations, thus demonstrating a spontaneous non-enzymatic reduction of NO_2^- to NO in an anorganic environment.

In vivo production of NO during NO_2^- inhalation was tested in surfactant depleted female pigs after lung lavage (N = 14) (9). The intervention group (n = 7) received 20 min of 30 mg/min NaNO_2 inhalation after lung lavage. Observing control and intervention groups included measurement of expiratory NO production, hemodynamic and blood gas parameters. After euthanasia, tissue samples of the right lung were taken.

In the intervention group, exhaled NO was clearly higher than in *in vitro* tests. These results support that reduction of NO_2^- to NO occurs during nitrite inhalation in pigs with severe acute lung injury after surfactant-depletion.

Oxygenation did not change during NO_2^- inhalation. The met-hemoglobin level increased significantly, but remained below toxic thresholds (10). There was no local effect on mean pulmonary arterial pressure during the inhalation of NO_2^- . The pulmonary vascular resistance and lung edema formation were not changed. Global effects of inhaled NO_2^- on mean arterial pressure, central venous pressure, and cardiac output could not be found.

In summary, NO_2^- given as inhalation of 30 mg/min NaNO_2 over 20 min increased NO production in surfactant depleted pigs without effects on blood oxygenation or systemic and pulmonary hemodynamics.

1 Einleitung

1.1 Das akute Lungenversagen - *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS)

Bei dem *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) handelt es sich um einen Symptomkomplex, der im Deutschen als akutes Lungenversagen definiert ist. Es kann bei vorher lungengesunden Patient*innen durch heterogene Schädigungsmechanismen hervorgerufen werden (11).

1.1.1 Definition des ARDS nach Ashbaugh

Ashbaugh et al. beschrieben 1967 erstmalig bei einer Fallserie mit 12 Patient*innen die Manifestation eines schweren akuten Lungenversagens als akutes Einsetzen schwerer Dys- und Tachypnoe aufgrund einer Hypoxämie mit diffuser, bilateraler alveolärer Infiltration im Röntgen-Thorax ohne kardiale Ursache und mit Verlust der Dehnbarkeit der Lunge (12). Dieses wird als Compliance bezeichnet und gibt darüber Auskunft, wieviel Druck ausgeübt werden muss, bis ein bestimmtes Luftvolumen in die Lunge bewegt wird (11). Dieser ersten Definition des Symptomkomplexes als ARDS folgten ab den frühen 1980er Jahren weitere, die alle die folgenden vier klinischen Charakteristika beinhalteten:

- a) Hypoxämie (Ausprägungsgrad bestimmt individuellen Schweregrad des ARDS)
- b) Verringerte Compliance der Lunge
- c) Veränderungen im Röntgen-Thorax
- d) Physiologische Normalwerte des kapillären Verschlussdrucks in der Lunge (PCWP; unter Ausschluss eines Linksherzversagens) (2)

1.1.2 Der Lung Injury Score nach Murray

Eine der ersten gebräuchlichen Klassifizierungen des ARDS entwickelten Murray et al. 1988 mit dem *Lung Injury Score*. Dazu führten sie ein quantitatives Punktesystem ein, das je nach Punktwert eine milde, moderate oder schwere Form des Lungenschadens charakterisiert (siehe Tabelle 1). Als vier Einflussfaktoren wurden nach Murray die Veränderungen im Röntgen-Thorax, die Hypoxämie, die Höhe des positiv endexpiratorischen Drucks (*positive end expiratory pressure*, PEEP) bei der Beatmung von Patient*innen sowie die Compliance des respiratorischen Systems festgelegt, wobei das Vorhandensein der ersten beiden Kriterien obligat für eine Lungenschädigung ist. Die Beurteilung des PCWP schied als zu ungenaues Definitionskriterium aus. Jedes Kriterium wird zusätzlich hinsichtlich seiner Ausprägung mit ein bis maximal vier Punkten charakterisiert. Der endgültige Score ist der Quotient der Summe

Einleitung

der einzelnen Punkte und der Anzahl der vorhandenen Kriterien. Ein Punktwert von null beschreibt den Normalbefund einer gesunden Lunge, 0,1 bis 2,5 eine akute Lungenschädigung (*acute lung injury*, ALI) und Werte größer als 2,5 ein ARDS (13).

Tabelle 1: Lung Injury Score nach Murray übersetzt aus (2). Der *Lung Injury Score* ist der Quotient aus der Summe der Punktzahlen und der Gesamtzahl der vorhandenen Kriterien.

Kriterien	Ausprägungen	Punktzahl
Röntgen Thorax Index	Keine alveoläre Verdichtung	0
	Alveoläre Verdichtungen in einem Quadranten	1
	Alveoläre Verdichtungen in zwei Quadranten	2
	Alveoläre Verdichtungen in drei Quadranten	3
	Alveoläre Verdichtungen in vier Quadranten	4
Hypoxämie Index (mmHg)	$\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 \geq 300$	0
	$\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 225 - 299$	1
	$\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 175 - 224$	2
	$\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 100 - 174$	3
	$\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 < 100$	4
Compliance des respiratorischen Systems (unter Beatmung) (ml/cm H ₂ O)	≥ 80	0
	60 – 79	1
	40 – 59	2
	20 – 39	3
	19	4
positiver endexpiratorischer Druck (unter Beatmung) (cm H ₂ O)	≤ 5	0
	6 – 8	1
	9 – 11	2
	12 – 14	3
	≥ 15	4
Lung Injury Score	Keine Schädigung der Lunge	0
	Akute Lungenschädigung (ALI)	0.1–2.5
	Akutes Lungenversagen (ARDS)	> 2.5

1.1.3 Die Definition der American-European Consensus Conference (AECC)

Um eine weltweit einheitliche Definition des ARDS zu schaffen, fand 1994 die American-European Consensus Conference (AECC) zum ARDS statt. Dort einigte man sich darauf, dass ein Lungenversagen, das durch Inflammation und Permeabilitätssteigerung des Lungengewebes gekennzeichnet ist und mit klinischen, radiologischen und physiologischen Veränderungen einhergeht, als ARDS bezeichnet wird. Dies gilt, sofern arterielle oder pulmonale Hypertension als Ursache des ARDS ausgeschlossen sind (14). Zusätzlich wurden

Einleitung

das Fehlen von linksarterieller Hypertension ($PCWP \leq 18$ mmHg), das Vorliegen bilateraler Infiltrate im Röntgen-Thorax und ein Horovitz-Quotient ≤ 200 mmHg als klinische Diagnosekriterien eingeführt. Als Horovitz-Quotient wird dabei das Verhältnis zwischen dem Sauerstoffpartialdruck (PaO_2) im arteriellen Blut und dem fraktionierten Sauerstoffanteil (FiO_2) der Atemluft (PaO_2 / FiO_2) bezeichnet (11). Dieser neue einheitliche Standard für die Einteilung der akuten Lungenerkrankungen wurde von Kliniker*innen sowohl auf dem amerikanischen als auch auf dem europäischen Kontinent akzeptiert und angewendet (14).

Dennoch zeigten sich in der Anwendung der AECC-Definition diverse Schwächen, sodass 2005 eine Überprüfung und Verbesserung der AECC-Definition (15) zu einer Reduktion auf sechs definierende Kriterien führte (siehe Tabelle 2). Erwähnenswert ist vor allem, dass die Beatmung mit $PEEP \geq 10$ mbar nun als Voraussetzung eingeschlossen und die radiologischen Veränderungen im Röntgen Thorax der Patient*innen a. p. auf mindestens zwei Quadranten der Lungen zur Definition eines ARDS gefordert wurden. Eine Entwicklung der Symptomatik musste binnen 72 h erfolgen (16).

Tabelle 2: Erweiterte Definitionskriterien der AECC 2005 übersetzt aus (2).

Nummer	Definierende Eigenschaft	Klinische Definition
1	Hypoxämie	$PaO_2 / FiO_2 < 200$ mmHg mit $PEEP \geq 10$ mbar
2	Akuter Beginn	Akuter Beginn binnen < 72 h
3	Radiologische Veränderungen	Bilaterale Belüftungsstörungen ≥ 2 Quadranten in der Röntgen Thorax Aufnahme
4	Nicht-kardiale Ursache	Keine klinischen Hinweise auf eine kongestive Herzinsuffizienz (einschließlich Nachweis via pulmonalarteriellen Katheter und/ oder Echokardiografie bei klinischer Indikation)
5	Fallende Compliance des respiratorischen Systems	Statische Compliance des respiratorischen Systems < 50 mL/cm H_2O (Patient*innen sediert; V_t 8 mL/kg KG, $PEEP \geq 10$ mbar)
6	Prädisposition	Direkte oder indirekte Faktoren, die mit einer Lungenschädigung verknüpft sind

1.1.4 Berlin-Definition des ARDS

Im Jahr 2011 trat ein internationales Expertenkomitee in Berlin zusammen, um die durch den AECC entworfene Definition erneut zu beurteilen und anzupassen. Dabei wurde festgelegt, dass das ARDS eine akute Lungenschädigung ist, die bei Patient*innen auftritt, die prädisponierende Faktoren (nicht durch die Lunge bedingte Sepsis, Pneumonie, Aspiration von saurem Mageninhalt, schwere Traumata, Pankreatitis, Schädigung der Lunge in Folge von Bluttransfusion) aufweisen (15). In der Berlin-Definition (siehe Tabelle 3) wurde der Begriff

Einleitung

des akuten Beginns von 72 h auf eine Woche ausgeweitet. Zusätzlich übernahm man den Begriff des ALIs aus vorherigen Definitionen nicht, sondern führte stattdessen den Begriff des milden ARDS bei einem $\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2$ zwischen 201 und 300 mmHg ein. Das moderate ARDS wurde durch einen $\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2$ von 101 bis 200 mmHg definiert. Das schwere ARDS wurde auf Werte ≤ 100 mmHg festgelegt (16). Zusätzlich wurde als therapeutisches Grundprinzip eine Beatmung mit $\text{PEEP} \geq 5$ cm H_2O festgelegt, der in der milden Form des ARDS auch über einen nicht-invasiven kontinuierlichen Beatmungsdruck (*continuous positive airway pressure* CPAP) appliziert werden kann (17; 18). Die Berlin-Definition ist die aktuell weltweit gültige Charakterisierung des ARDS.

Tabelle 3: Berlin Definition des ARDS übersetzt aus (2).

Kategorie	Ausprägung		
Zeitlicher Verlauf	Beginn der Symptomatik binnen einer Woche		
Radiologischer Befund	Bilaterale Verschattungen, die nicht ausschließlich auf kardiogen bedingte Ergüsse, Atelektasen und noduläre Infiltrate zurückzuführen sind		
Ursprung des respiratorischen Versagens	Respiratorisches Versagen, das nicht ausschließlich auf kardiogenes Versagen oder Flüssigkeitsüberladung zurückzuführen ist (hydrostatische Ödeme sind durch objektive Untersuchungsmethoden (z. B. Echokardiografie) bei nicht-vorhandenen Risikofaktoren auszuschließen)		
Schweregrad	Mild	Moderat	Schwer
Oxygenierung	$200 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mmHg}$	$100 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 \leq 200 \text{ mmHg}$	$\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 \leq 100 \text{ mmHg}$
	mit PEEP oder nicht-invasivem CPAP (kontinuierlich positiver Beatmungsdruck) ≥ 5 cm H_2O	mit $\text{PEEP} \geq 5$ cm H_2O	mit $\text{PEEP} \geq 5$ cm H_2O

1.2 Stickstoffmonoxid (NO)

Stickstoffmonoxid (NO) ist als ein wichtiges Signalmolekül an der Regulation vieler physiologischer Prozesse wie z.B. der Vasodilatation beteiligt ist (3). Die Synthese von NO findet durch Umwandlung von L-Arginin zu L-Citrullin statt. Diese Reaktion wird durch NO-Synthetasen (NOS) katalysiert. NOS kommen u.a. in Endothelzellen (eNOS), im Gehirn (nNOS) und bei Entzündungsreaktionen als induzierbare NOS (iNOS) im gesamten Körper vor (19). Der L-Arginin-NOS- Stoffwechselweg ist Sauerstoff (O_2)-abhängig (20). In biologischen Lösungen wird NO durch Komplexbildung stabilisiert oder zu Nitrit (NO_2^-) oxidiert. Nimmt die O_2 -Konzentration im Blut oder Gewebe ab, so werden NO_2^- und

Einleitung

Nitrat (NO_3^-) NOS-unabhängig zu NO reduziert. Die Bioverfügbarkeit der beiden Anionensalze begrenzt folglich die NO-Produktion des Nitrat-Nitrit-Stoffwechselweges.

Benjamin et al. wiesen 1994 die NOS-unabhängige physiologische Reduktion von NO_2^- zu NO im sauren Milieu des menschlichen Magenlumens nach (21). Auch im ischämischen Herzen, also ebenfalls unter sauren Bedingungen, ließ sich die NOS-unabhängige NO-Bildung durch NO_2^- -Reduktion beschreiben (22). Vor allem unter Hypoxie wurden mehrere Proteine nachgewiesen, die die NOS-unabhängige Synthese von NO aus NO_2^- katalysieren. Die hauptsächlich bekannten enzymatischen Reaktionen zur NO_2^- -Reduktion verlaufen mit Hilfe von Globinen (z.B. Häm- und Myo- oder Neuroglobin), Xanthinoxireduktasen, Aldehydoxidasen sowie durch Enzyme der mitochondrialen Atmungskette. Auch nicht-enzymatische Disproportionierungen, azidotische Reduktion sowie die NOS werden als weitere Wege zur NO-Produktion aus NO_2^- vermutet (23; 24).

Der L-Arginin-NOS- Stoffwechselweg und der Nitrat-Nitrit-Stoffwechselweg sind stets gleichzeitig aktiv. Dabei variiert der Anteil ihrer Aktivität O_2 -abhängig. Ist die O_2 -Konzentration reduziert, so sinkt die NOS-Aktivität. NO wird dadurch verstärkt durch NO_2^- -Reduktion erzeugt (siehe Abbildung 1). Bei Pathologien mit regionalen oder systemischen Ischämien ist es also vor allem der Nitrat-Nitrit-Stoffwechselweg, der vasodilatatives NO erzeugt und damit eine Verbesserung der Perfusion bewirkt. Folglich könnte eine pharmakologische Unterstützung der NO_2^- -Reduktion den Blutfluss bei ischämischen Prozessen steigern (23).

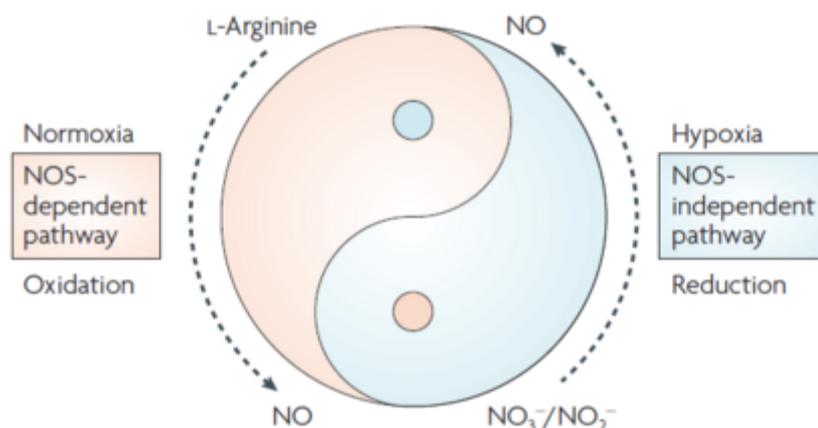


Abbildung 1: Stoffwechselwege zur Synthese von NO unter Normoxie und Hypoxie übernommen aus (23)

Einleitung

1.2.2 Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) im Blut

Hämoglobin (Hb) wirkt als allosterisch-regulierte NO_2^- -Reduktase (25) mit einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit bei einer Sauerstoffsättigung von 50 % des Hb (26). Ist Hb oxygeniert, hat es als NO-Scavenger die Eigenschaft NO „zu fangen“ (27). Wird Hb entlang der Kapillaren im peripheren Gewebe desoxygeniert, ist seine NO_2^- -Reduktaseaktivität gesteigert und es kommt zu einer vermehrten Produktion von NO (28). Cosby et al. konnten demonstrieren, dass eine hämoglobin-vermittelte Reduktion von Natriumnitrit (NaNO_2) zu NO vasodilatatorisch auf die Gefäße des menschlichen Unterarms und somit auf den systemischen Kreislauf wirkt (25). Hunter et al. konnten bei neugeborenen Lämmern zeigen, dass inhaliertes NaNO_2 bei niedriger Sauerstoffsättigung des Hb über Vasodilatation zur Verringerung einer pulmonalarteriellen Hypertension um ca. 65 % und einer erhöhten NO-Exhalation führt. Die Studie deutet also daraufhin, dass NO_2^- über die Reduktion zu NO vasodilatatorisch wirkt und somit eine potentielle Therapiemöglichkeit der pulmonalen Hypertension darstellt (7).

1.2.3 Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) im Gewebe

Im Gegensatz zur NO-Produktion im Blut wird die Reduktion von NO_2^- zu NO in Zellen des peripheren Gewebes nicht durch Hb sondern durch die Xanthinoxireduktase (XO) und die Aldehydoxidase (AO) katalysiert. Beide Enzyme gehören zur Familie der Molybdo-Flavoenzyme und sind in Bezug auf ihre Aminosäuresequenz zu 86 % identisch (29).

XO ist sowohl das Schlüsselenzym des Purin-Stoffwechsels als auch Produzent von Sauerstoffradikalen (ROS). Es reduziert NO_2^- zu NO sowohl unter normoxischen als auch hypoxischen Bedingungen (30), wobei Hypoxie die enzymatische Aktivität deutlich steigert (31; 32). *In vitro* konnte quantifiziert werden, in welchem Maße Blut und Gewebe bzw. XO und AO an der Bildung von NO aus NO_2^- beteiligt sind (33). Dabei zeigte sich, dass die NO-Syntheserate im Blut bzw. bei isoliertem Hb (Ratte) bei hohen Konzentrationen von NO_2^- ($500\mu\text{M}$) gering ist. In zerkleinertem Gewebe von Herz, Leber und Aorta wurde jedoch schon bei einem Fünftel der NO_2^- -Menge mehr NO erzeugt als im Blut. Unter der Zugabe von spezifischen Hemmstoffen gegenüber XO (Oxypurinol) und AO (Raloxifenchlorid) in diesen Geweben sank die NO-Syntheserate wiederum um 70 %. Die NO-Bildung findet also größtenteils im Gewebe und unter Beteiligung von XO und AO statt. Die Schlüsselrolle von XO konnte von Casey et al. bestätigt werden, indem zunächst anästhesierten Ratten NaNO_2 i. v. (intravenös) verabreicht und dadurch eine pulmonale Vasodilatation verursacht wurde. Durch das anschließende Hinzufügen des XO-Inhibitors Allopurinol wurde dieser pulmonale

Einleitung

vasodilatative Effekt wieder aufgehoben (34). Daraus lässt sich ableiten, dass XO ein bedeutender Katalysator bei der NO-Synthese im Gewebe ist.

Somit kann NO_2^- im zirkulierenden Blut aber vor allem im Gewebe zu NO reduziert werden. Wie sehr NO_2^- die Regulation des Blutflusses über die NO-bedingte Vasodilatation beeinflusst, ist bisher unklar. Ebenfalls unbekannt sind die Anteile der einzelnen Stoffwechselwege zur NO-Produktion. Zusätzlich sind die pulmonalen vasodilatatorischen Effekte des Nitrat-Nitrit-NO-Systems unter physiologischen Bedingungen bei Säugetieren bisher wenig untersucht.

1.3 Pathophysiologische Rolle und therapeutische Wirkung von Nitrit (NO_2^-)

Eine Reihe von Autoren haben berichtet, dass NO_2^- in Ischämie-/Reperfusionsschädigungsmodellen (I/R) bei Mäusen und Ratten die Gewebeschädigung im Gehirn (35), im Herz (4), in den Nieren (5) sowie bei Lebergeweben (6) vermindern kann. Die Mechanismen der zytoprotektiven Eigenschaften sind komplex. Sie beziehen die Vasodilatation, die Senkung der Apoptoserate, die Variation in der Zellatmung, hypoxiebedingte Signalkaskaden, das Eliminieren von ROS sowie anti-inflammatorische Effekte von NO mit ein (24). Vor allem die XO-vermittelte Reduktion von NO_2^- spielt eine wichtige Rolle in I/R-Modellen (4; 5).

Zuckerbraun et al. konnten nachweisen, dass inhaliertes NO_2^- gegen pulmonalarterielle Hypertension und Proliferation der pulmonalen vaskulären glatten Muskelzellen bei Nagern schützt. Bei hypoxisch und pharmakologisch induzierter (Monocrotalin) pulmonalarterieller Hypertension werden diese protektiven Effekte von NO durch die NO_2^- -Reduktase-Aktivität von XO in der Lunge reguliert (8).

Hunter et al. zeigten in einem Modell pulmonal-hypertensiver Lämmer, dass die Inhalation eines NaNO_2 -Aerosols zu einem signifikanten Anstieg des exhalierten NO, zu einer Senkung des pulmonalarteriellen Drucks (PAP) sowie damit einhergehend zu einer Senkung des pulmonalvaskulären Widerstands (PVR) führt (7). Hieraus kann geschlossen werden, dass NaNO_2 physiologisch zu NO umgewandelt wird und durch Vasodilatation den PAP senkt.

NO_2^- wirkt also als NO-Donor und könnte zur selektiven Vasodilatation und PAP-Senkung verwendet werden.

Rix et al. verabreichten NaNO_2 gesunden menschlichen Proband*innen inhalativ, um so Aussagen über mögliche therapeutische Nebenwirkungen treffen zu können. Bis auf einzelne Fälle von Orthostasereaktionen bzw. Hypotension in Kombination mit Tachykardie im höheren Dosisbereich ($> 120 \text{ mg}$) wurde die NO_2^- -Inhalation bei Menschen im Allgemeinen gut

Einleitung

vertragen. Über mögliche Effekte von inhaliertem NaNO_2 zur Senkung des PAP beim Menschen konnte bisher noch keine Aussage getroffen werden (18).

1.4 Konzept der Nitrit (NO_2^-)-basierten Therapie bei ARDS und Entwicklung der Fragestellung

Trotz zahlreicher Studien konnten bisher kaum pharmakologische Therapieansätze gefunden werden, die ein ARDS bei Patient*innen signifikant lindern können (36). Studien zur lungenprotektiven Beatmung mit geringen Tidalvolumina (V_T) zeigen zwar eine Senkung der Mortalität und eine Verkürzung der gesamten Beatmungsdauer bei den untersuchten Patient*innen (14), die Mortalität von ARDS-Patient*innen bleibt dennoch bei 35 bis 45 % (37). Neben der Beatmung mit niedrigen Tidalvolumina haben vor allem die Infekttherapie und eine frühzeitig durchgeführte Bauchlagerung (< 48 h nach Beginn ARDS) positive Effekte auf den Krankheitsverlauf (38).

Beim ARDS gibt es vermehrt kollabierte Lungenabschnitte, die als Atelektasen bezeichnet werden. Dadurch ist das am Gasaustausch beteiligte Lungengewebe stark reduziert. Es folgt daraus ein Anstieg des Blutanteils, der auf dem Weg vom rechten zum linken Herz im Lungenkapillarnetz nicht ausreichend oxygeniert wird. Dieser ist als intrapulmonaler Rechts-Links-Shunt definiert.

Als Folge des steigenden intrapulmonalen Rechts-Links-Shunts sinken das Ventilations-Perfusions-Verhältnis (V/Q) sowie der PaO_2 (39).

Bei der NO-Inhalation gelangt NO über die ventilierten Alveolen in die angrenzenden Kapillaren. Die Folge ist eine Dilatation dieser Blutgefäße und der Blutfluss in den ventilierten Lungenbereichen steigt an. Dadurch sinkt der intrapulmonale Rechts-Links-Shunt und das V/Q steigt. Somit kommt es zu einem Anstieg der Oxygenierung und des PaO_2 durch NO-Inhalation (40).

Trotz der signifikanten Verbesserung der arteriellen Oxygenierung bei ARDS-Patient*innen während einer inhalativen NO-Therapie konnte bisher keine signifikante Senkung der Mortalität nachgewiesen werden (41). Dabei gilt es zu beachten, dass bei der Mehrheit der ARDS-Patient*innen nicht die Hypoxämie, sondern das Multiorganversagen die Todesursache ist. Zusätzlich ist NO in der Lage, mit freien Radikalen wie Superoxid reaktive Stickstoffspezies wie beispielsweise Peroxynitrit zu bilden. Diese sind an der Schädigung von Gewebe und Gefäßen beteiligt (42). Somit vermittelt NO, obwohl es in physiologischen Mengen (nanomolarer Bereich) zytoprotektiv wirkt, in supraphysiologischen Mengen (hochmikromolarer/ milimolarer Bereich) zelluläre Nekrose bzw. Apoptose (43). Diese

Einleitung

Dualität zwischen protektivem und zytotoxischem Potential von NO lässt vermuten, dass die Effektivität von NO im akuten Lungenversagen stark von seiner Verfügbarkeit im bioaktiven Zustand abhängt.

NO_2^- ist im Vergleich zu NO ein stabileres Molekül und kann im Kreislauf transportiert sowie im Gewebe gespeichert werden. Daraus folgt eine einfachere Bereitstellung auch von kleineren Konzentrationen NO, die im besten Fall selektiv am geschädigten Gewebe erfolgt.

Bisher gelang die Senkung des PAP bei Ratten (8) und Lämmern (7) durch Inhalation von NO_2^- in der Darreichungsform von NaNO_2 (siehe 1.3). Die Kombination der PAP-Senkung mit den zytoprotektiven Effekten von entstandenem NO durch NO_2^- -Inhalation könnte neue Möglichkeiten der ARDS-Therapie eröffnen. In der vorliegenden Arbeit wird daher untersucht, ob in einem Modell der schweren akuten Lungenschädigung bei surfactant-depletierten Schweinen durch inhalative NO_2^- -Gabe NO gebildet wird. Weiterhin wird erhoben, in welchem Ausmaß die potentielle Bereitstellung von NO durch NO_2^- -Inhalation die Oxygenierungsstörung und somit die Schwere des induzierten Lungenschadens beeinflusst.

1.4.1 Hypothese 1

Die Inhalation von NO_2^- bei Surfactant-depletierten Schweinen führt zu einem Anstieg der expiratorisch gemessenen NO-Konzentration.

1.4.2 Hypothese 2

Inhalierendes NO_2^- verbessert die Oxygenierung während eines experimentell induzierten Lungenschadens bei Surfactant-depletierten Schweinen.

Zur Überprüfung der Hypothesen wurde NaNO_2 inhalativ bei Surfactant-depletierten Hausschweinen verabreicht und das expiratorische NO gemessen. Um zu überprüfen, ob NO unabhängig von NO_2^- -Reduktasen gebildet werden kann, wurde NaNO_2 inhalativ bei einer Kunstlunge appliziert und die expiratorische NO-Konzentration ermittelt.

2 Material und Methoden

2.1 Nachweis von Nitrit (NO_2^-)-Reduktase-unabhängig gebildetem Stickstoffmonoxid (NO)

2.1.1 Versuchsaufbau

Um eine NO_2^- -Reduktase-unabhängige Bildung von NO zu überprüfen bzw. zu quantifizieren, wurden zunächst *in-vitro*-Versuche mit NaNO_2 in vier verschiedenen Konzentrationen an einer Testlunge (Test lung 180, Maquet GmbH, Rastatt, Deutschland) durchgeführt. Wie in Abbildung 2 dargestellt, wurde die Testlunge über ein Beatmungsschlauchsystem (RT380 Evaqua 2[©], Fisher & Paykel Healthcare Limited, Auckland, Neuseeland) mit einem Beatmungsgerät (Engström Carestation, GE Healthcare, Chalfont St Giles, Großbritannien) im druckkontrollierten-volumengarantierten Modus (PCV-VG) verbunden. Um NO-freie Inspirationsluft zu erzeugen, eliminierte ein Nullluftgenerator alle Verunreinigungen durch NO (CLD 780 TR, ECO PHYSICS GmbH, München, Deutschland), bevor reiner Sauerstoff und Druckluft in das Beatmungsgerät eingespeist wurden.

Zwischen Testlunge und Beatmungsgerät wurde ein Vernebler (Aeroneb[®] Solo Vernebler-System, Bochum, Deutschland) in den Atemkreis eingefügt, um NaNO_2 -Aerosol in die Inspirationsluft zu applizieren. Ein Palladiumnetz im Vernebler schwingt mit 128000 Hz, so dass die jeweilige NaNO_2 -Lösung in 1 bis 5 μm kleine Partikel zerstäubt wurde. Gleichzeitig hat diese Vibration auch eine Pumpfunktion (44). Damit wurde NaNO_2 kontinuierlich in ein Aerosol überführt.

Ein Katheter (Connector for nitric oxide, Covidien[™], Dublin, Irland) wurde an den Inspirationsschenkel direkt hinter dem Beatmungsgerät angeschlossen, um die NO-Konzentration in der Inspirationsluft mittels Ozon-basierter Chemilumineszenz (OBC) zu quantifizieren (Sievers[®] NOA 280i, Analytix Limited, Durham, UK). Durch diese Kontrollmessung wurde vor jeder Versuchsreihe überprüft, ob die Inspirationsluft trotz Verwendung eines Nullluftgenerators mit NO verunreinigt war und somit die Messergebnisse verfälscht werden könnten. Das Messsystem wurde vor jeder Anwendung nach den Angaben des Herstellers kalibriert.

Am Expirationsschenkel wurde der Katheter (Connector for nitric oxide, Covidien[™], Dublin, Irland) vor dem PEEP-Ventil des Beatmungssystems angeschlossen. Von dort erfolgte die NO-Analyse kontinuierlich. Um Verunreinigungen durch mögliche kristalline Ablagerungen zu verhindern, wurden zwischen Katheter und Testlunge drei Filter (Ultipor[™], PALL Medical, Fribourg, Schweiz) und eine Wasserfalle (Trachealabsaugatz, EXTRUDAN Surgery ApS,

Birkerød, Dänemark) installiert (siehe Abbildung 2). Dadurch wurde die NO-Konzentration gemischt exhalier bestimmt. Eine NO-Bestimmung einzelner Atemzüge ist bei diesem Versuchsaufbau nicht möglich.

Jede Konzentration von NaNO₂ wurde mehrfach getestet. Alle Werte wurden mit dem Programm LabChart 7 (Version 7.3.7, ADInstruments, Dunedin, Neuseeland) aufgezeichnet und abgespeichert.

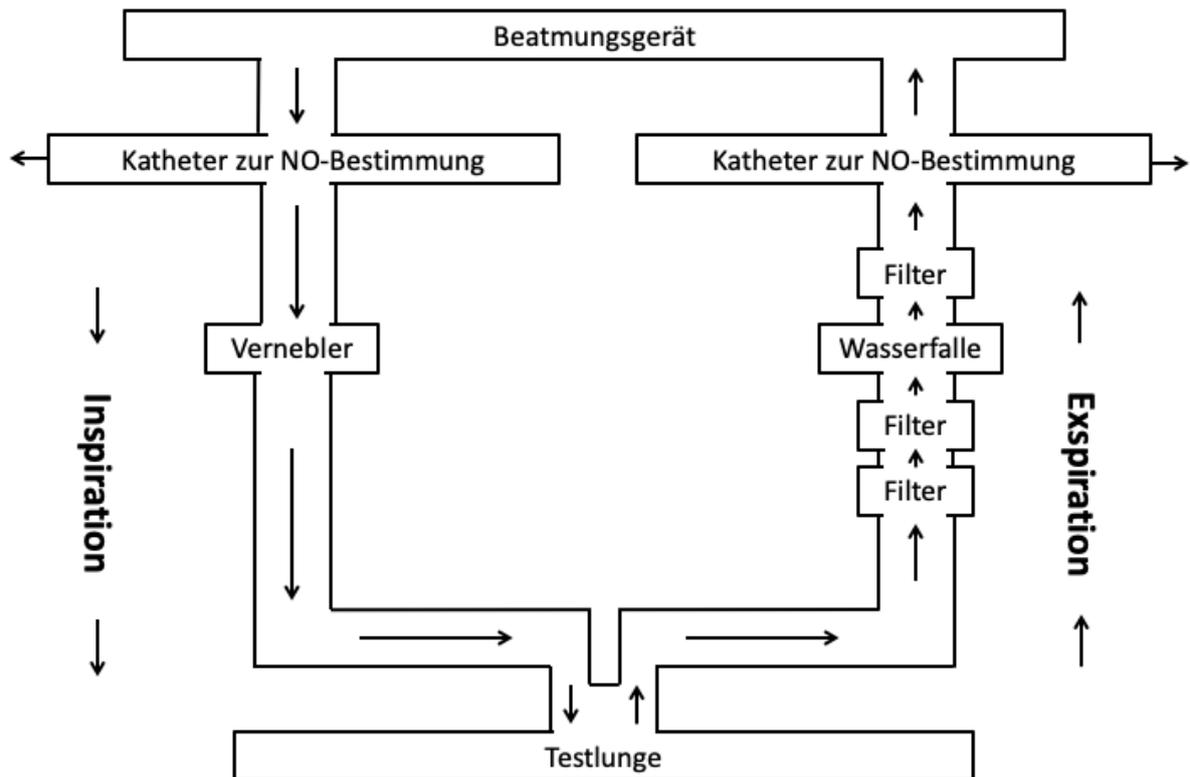


Abbildung 2: Versuchsaufbau zur Überprüfung einer NO₂-Reduktase-unabhängigen Bildung von NO mit einer Testlunge. Das Einspeisen von Sauerstoff und Druckluft erfolgte nach Befreiung von NO durch einen Nullluftgenerator.

2.1.2 Versuchsprotokoll

Für die Inhalation verschiedener Mengen NaNO₂ pro Minute wurden drei Lösungen aus verschiedenen Mengen NaNO₂ (Natrium nitrite, Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, USA) mit je 50 ml steriler NaCl-Lösung (0,9 %) vermischt. Außerdem wurde ein Kontrollansatz ohne NaNO₂ verwendet. Diese vier Inhalationslösungen wurden mehrfach getestet (siehe Tabelle 4).

Material und Methoden

Tabelle 4: Charakteristika der NaNO₂-Inhalation. Eingesetzte Menge NaNO₂, resultierende Konzentration in 50 ml steriler NaCl-Lösung (0,9 %), resultierende NaNO₂ Dosis zur Inhalation und Anzahl der Messungen pro Dosis.

Eingesetzte Menge NaNO ₂ in mg	Konzentration NaNO ₂ in 0,9 % NaCl in mg/ml	Resultierende NaNO ₂ Dosis zur Inhalation in mg/min	Anzahl Messungen n
300	6	1,5	5
1500	30	7,5	5
15000	300	75	10
0	0	0	1

Es wurden für jeden Versuch neue Beatmungsschläuche, Wasserfallen und Filter benutzt. Die Katheter und der Vernebler wurden nach gründlicher Reinigung mehrfach verwendet. Für alle Versuche nutzten wir dieselbe Testlunge.

Die Beatmung der Testlunge erfolgte mit folgenden Beatmungseinstellungen:

Atemfrequenz AF:	30 /min
Tidalvolumen V _T :	240 ml
Inspirations- / Exspirationsverhältnis I:E:	1:1
Positiver endexpiratorischer Druck PEEP:	7 cm _{H2O}
Modus:	druckkontrolliert-volumengarantiert PCV-VG

2.1.3 Durchführung

Zu Beginn jedes Versuches wurden die jeweiligen NaNO₂-Lösungen hergestellt, der NO-Analysator kalibriert und die einzelnen Teile des Versuchsaufbaus miteinander verbunden.

Die Inhalation erfolgte über 20 min. Mit dem Start der Inhalation begann auch die Beobachtungszeit.

2.1.3.1 Datenanalyse

Während der 20-minütigen Inhalation in der Testlunge wurde das exhalierete NO kontinuierlich gemessen und die Messwerte in Intervallen von 1 min notiert. Für jede NaNO₂-Dosis wurden für jeden Messzeitpunkt der Mittelwert des NO_{ex} mit Standardabweichung bestimmt.

2.2 Nachweis von Stickstoffmonoxid (NO) bei inhalativer Gabe von Nitrit (NO₂) bei Surfactant-depletierten Schweinen

2.2.1 Tierhaltung

Die Versuche wurden an narkotisierten weiblichen Hausschweinen (38,5 kg ± 3,74) der Deutschen Landrasse durchgeführt. Die Versuchstiere stammten aus der Zucht von Wolfgang Günther (Am Krankenhaus 13a, 15366 Neuenhagen). Ankauf, Bezug und tierschutzgerechte Haltung erfolgten durch die Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin der Charité (FEM).

Der Gesundheitszustand jedes Versuchstiers wurde durch die zuständige Tierschutzbeauftragte der FEM direkt nach Ankunft überprüft und danach regelmäßig kontrolliert und protokolliert. Es wurden ebenfalls Protokolle zur Fütterung und Gewichtsentwicklung angelegt. Die Ernährung der Versuchstiere erfolgte für mindestens sieben Tage vor Versuchsbeginn standardisiert, um möglichst gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen. Jedes Tier erhielt 30 g/kg Körpergewicht (KG) HEMO U130 Trockenfutter (Fa. Hemo Mohr GmbH, Schweden, Deutschland) aufgequollen in 60 ml/kg KG Wasser. Die Fütterungen wurden im 12 h-Rhythmus durchgeführt.

Die Tierhaltung in der FEM erfolgte unter Quarantäne. Der minimale zeitliche Mindestabstand zwischen Anlieferung und Versuchsbeginn betrug sieben Tage. Die letzte Nahrungsaufnahme war am Vorabend des Versuches. Um zu verhindern, dass die Versuchstiere Nahrung aufnehmen, wurden sie am Vortag der Versuche strohfrei gehalten. Flüssigkeitsaufnahme in Form von Wasser war jederzeit möglich. Die Experimente wurden durch die Tierversuchskommission des Landesamtes für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigt (Genehmigungs-Nummer: G 0116/10).

2.2.2 Versuchsprotokoll

Die Versuchstiere (N = 14) wurden durch Losverfahren in eine Interventions- (30 mg/min NaNO₂ in Inspirationsluft; n = 7) und eine Kontrollgruppe (kein NaNO₂ in Inspirationsluft; n = 7) unterteilt.¹

Zunächst erhielten alle Versuchstiere eine medikamentöse Prämedikation und wurden anschließend narkotisiert und intubiert. Ein peripherer und ein zentraler Venenkatheter, zwei

¹ Die Messergebnisse der Kontrollgruppen wurden zusätzlich für weitere Versuche genutzt, in dem zwei anderen Interventionsgruppen NaNO₂ in unterschiedlichen Konzentrationen i. v. verabreicht wurde. Die Ergebnisse dieser Versuche werden an anderer Stelle ausgewertet und veröffentlicht.

Material und Methoden

arterielle Katheter, ein pulmonalarterieller Katheter sowie ein Blasenkatheter wurden eingeführt. Anschließend erfolgte eine einstündige hämodynamische Stabilisierungsphase. Die an deren Ende gemessenen Werte wurden als *baseline* definiert.

Nun erfolgte die Induktion des Lungenschadens bei allen Versuchstieren durch Lavage der Lunge (45; 46) (modifiziert nach (9)). Das Ziel der Lavagen war es, den P_aO_2 / F_iO_2 über 60 min < 100 mmHg zu halten, um so eine stabile, schwere Lungenschädigung zu etablieren, die mit einem schweren ARDS vergleichbar ist. Je nach Anzahl der zur Erreichung des Lungenschadens erforderlichen repetitiven Lavagen dauerte die Lavagephase zwischen zwei bis vier Stunden.

Sobald bei den Versuchstieren der Interventionsgruppe 60 min ein $P_aO_2 / F_iO_2 < 100$ mmHg bestand, wurde mit der inhalativen Gabe von 30 mg/min $NaNO_2$ in die Inspirationsluft begonnen. Mittels eines Verneblers (Aeroneb® Solo Vernebler-System, Bochum, Deutschland) wurde eine $NaNO_2$ -Lösung mit 15 ml/h über 20 min appliziert. Danach folgten 4 h 40 min Beobachtungszeit. Bei Tieren der Kontrollgruppe folgten auf 60 min $P_aO_2 / F_iO_2 < 100$ mmHg fünf Stunden Beobachtungszeit ohne Intervention. Hämodynamische Messungen und Blutgasanalysen (BGA) wurden halbstündlich durchgeführt.

Nach Versuchsende wurden die Tiere durch i. v. Applikation von 40 mval Kaliumchlorid (KCl 7,45 % B. Braun, Melsungen, Deutschland) in tiefer, ununterbrochener Narkose getötet. Danach folgten die Eröffnung des Brustkorbes und eine Probenentnahme vom Ober-, Mittel- und Unterlappen der rechten Lunge jeweils apikal, medial und basal, sodass pro Versuchstier 9 Gewebeproben entnommen wurden. Zur Quantifizierung des Lungenödems ermittelten wir die Nass- und Trockengewichte der Proben.

2.2.2.1 Vorbereitung der Versuchstiere

Jedes Experiment begann mit der medikamentösen Prämedikation des Versuchstiers. Diese erfolgte in den Tierstallungen durch eine intramuskuläre Applikation (i. m.) von Ketamin (26 mg/kg KG; Urostamin®, Serumwerk, Bernberg, Deutschland), Xylazin (3 mg/kg KG; Rompun 2 %®, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland), Azaperon (120 mg; Stresnil®, JANSSEN Animal Health, Neuss, Deutschland) und Atropin (0,5 mg; Atropin®; B. Braun, Melsungen, Deutschland). Es schloss sich eine Ruhezeit von ca. 15 bis 20 min an, um sicherzustellen, dass die Medikation beim jeweiligen Versuchstier die gewünschte Wirkung entfaltete und der weitere Ablauf bis zur i. v. Narkose (TIVA) möglichst stressarm war.

Nach der Gewichtsbestimmung wurde das Versuchstier mittels Rolltrage und Abschirmung gegenüber äußeren Reizen in den Versuchsraum gebracht und in Bauchlage auf dem permanent

Material und Methoden

mit 37° C beheizten Operationstisch positioniert. Dort wurde ein peripherer Venenkatheter (Braunüle® 20G, B. Braun, Melsungen, Deutschland) in eine oberflächliche Ohrvene eingeführt und Pulsoxymetrie (SpO₂ Animal Clip, MLT 323, ADInstruments, Dunedin, Neuseeland) am rechten Ohr gemessen. Über eine speziell für Schweineschnauzen angefertigte Beatmungsmaske erfolgte die Präoxygenierung mit 100 % O₂ (ca. 10 l/min Frischgasfluss). Danach wurde die Narkose mit Fentanyl (2 µg/kg KG; Fentanyl-Janssen, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) und Propofol (2 – 3 mg/kg KG; Propofol-Lipuro 10mg/ml, B. Braun, Melsungen, Deutschland) eingeleitet. Die Intubation erfolgte durch Laryngoskopie (gecuffter Endotrachealtubus 7,5 – 8,0 ID; Mallinckrodt™, Covidien™, Dublin, Irland).

Ab diesem Zeitpunkt erfolgte die Beatmung des Versuchstieres kontinuierlich durch das Beatmungsgerät (Engström Carestation, GE Healthcare, Chalfont St Giles, Großbritannien) im PCV-VG über den Endotrachealtubus.

Im Anschluss wurde das Versuchstier auf den Rücken gelegt und die Gliedmaßen Richtung kaudal in physiologischer Form gelagert und fixiert. Gewichtsadaptiert wurden dann eine TIVA mittels kontinuierlicher Infusionen von Propofol (3 mg/kg/h) und Fentanyl (12 – 18 µg/kg/h) verabreicht.

Es folgte die Katheterisierung der rechten Arteria femoralis (20 G; Leadercath®, Vygon GmbH & Co. KG, Aachen, Deutschland) zur kontinuierlichen Bestimmung des Blutdrucks und für arterielle Blutentnahmen. Zusätzlich wurde in der Femoralarterie der Gegenseite ein weiterer arterieller Katheter (PULSIOCATH®, Pulsion Medical Systems, Feldkirchen, Deutschland) mit einem kalibrierten Pulskonturanalyseverfahren verwendet (PiCCO2®, Pulsion Medical Systems, Feldkirchen, Deutschland).

Im Anschluss wurde die Vena jugularis interna rechts freipräpariert und eine Schleuse (Arrow-Flex® 6 French, Prod. Nr.: SI-09600, Arrow international, Reading, USA) in Seldingertechnik eingeführt. Darüber wurde ein Swan-Ganz-Katheter (Swan-Ganz®, 5 French, Edwards Lifescience LLC, Irvine, USA) zur Messung des PAP, Bestimmung des Herzzeitvolumens (HZV) und Entnahme gemischt-venösen Blutes eingeschwenkt. Danach wurde ebenfalls in Seldingertechnik ein zentraler Venenkatheter (Multicath 5, Vygon GmbH & Co. KG, Aachen, Deutschland) in dasselbe Gefäß zur Applikation von Medikamenten (Fentanyl, Propofol) sowie die Bestimmung des zentralvenösen Drucks (ZVD) eingebracht. Nach Sicherstellung einer adäquaten Narkosetiefe wurde zur Vermeidung von Spontanatmungsbemühungen aufgrund von Hyperkapnie nach Lungenschädigung die Muskulatur medikamentös relaxiert (0,1 mg/kg Pancuroniumbromid als Bolus, Pancuronium-

Material und Methoden

ratiopharm; Ratiopharm GmbH, Ulm). Danach schloss sich eine kontinuierliche Infusion zur Muskelrelaxation (0,3 – 0,36 mg/kg/h Pancuroniumbromid) an.

Das Versuchstier wurde tracheotomiert und eine gekürzte Trachealkanüle (9,0 ID, Mallinckrodt™, Covidien™, Dublin, Irland) wurde eingelegt.

Abschließend erfolgte beim Versuchstier eine transurethrale Katheterisierung der Harnblase.

Nach der Intubation wurden dem Versuchstier 500 ml Sterofundin ISO (Sterofundin®, B. Braun, Melsungen, Deutschland) i. v. über ca. 30 min zugeführt. Die Infusion wurde anschließend kontinuierlich mit 4 ml/kg KG fortgesetzt. Stieg die Schlagvolumenvariabilität (SVV) über 12 % im Verlauf des Versuchs, erhielt das Versuchstier einen Sterofundinbolus von 200 ml.

2.2.2.2 *Beatmung der Versuchstiere*

Nach der Tracheotomie wurden alle Versuchstiere für die restliche Dauer des Experiments im PCV-VG-Modus beatmet (Engström Carestation, GE Healthcare, Chalfont St Giles, Großbritannien). Um NO-freie Inspirationsluft zu erzeugen und so Kontaminationen des Atemgasgemisches vorzubeugen, eliminierte ein Nullluftgenerator alle Verunreinigungen durch NO (CLD 780 TR, ECO PHYSICS GmbH, München, Deutschland), bevor Sauerstoff und Druckluft in das Beatmungsgerät eingespeist wurden.

Bis zur Durchführung der Lavage lag das V_T bei 9 ml/kg KG. Der PEEP war 7 cmH₂O. Die F_{iO_2} lag bei 1,0. Das I:E-Verhältnis war 1:2. Danach wurde das V_T auf 6 ml/kg KG gesenkt und das I:E wurde auf 1:1 umgestellt. Die AF wurde in Abhängigkeit vom arteriellen Kohlenstoffdioxidpartialdruck (P_aCO_2) so verändert, dass sich Werte zwischen 40 und 50 mmHg einstellten. Jedoch wurde dies auf eine maximale AF von 35 /min begrenzt.

2.2.2.3 *Induktion des Lungenschadens*

Zur Induktion des Lungenschadens wurde ein Modell der Lavage-induzierten Surfactant-Depletion angewendet (45; 46). Dazu wurde bei einer F_{iO_2} von 1,0 die Trachealkanüle vom Beatmungsgerät diskonnektiert und auf 37,0° C gewärmte NaCl-Lösung (0,9 %, B. Braun, Melsungen, Deutschland) passiv in die Lunge eingefüllt. Nach vollständiger Flüssigkeitszufuhr in die Lunge wurde die NaCl-Lösung drainiert, sobald der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) < 50 mmHg fiel. Das für jedes Versuchstier individuell benutzte Volumen der Flüssigkeit entsprach 50 ml/kg KG. Danach wurde das Beatmungsgerät rekonnektiert und der Kreislauf der Versuchstiere stabilisierte sich. Danach wurde mit engmaschigen arteriellen BGA begonnen.

Material und Methoden

Gelang es, den P_aO_2 / FiO_2 beim Versuchstier über 60 min < 100 mmHg zu halten und somit eine stabile, schwere Lungenschädigung zu etablieren, die mit einem schweren ARDS vergleichbar ist, folgte der Handlungsablauf gemäß Protokoll (siehe 2.2.2). Stieg der P_aO_2 / FiO_2 jedoch > 100 mmHg, wurde eine weitere Lavage durchgeführt. Diese Zeitspanne des Experiments war bei jedem Versuchstier individuell und zwischen zwei und vier Stunden lang.

2.2.2.4 Messung hämodynamischer Parameter

Zur Messung hämodynamischer Parameter wurden Einmaldrucksysteme (LogiCal®, Smiths Medical International Ltd. Rossendale, Großbritannien) verwendet. Diese wurden vor Beginn des jeweiligen Experiments an die einzelnen Druckwandler angeschlossen (MX960, Smiths Medical International Ltd. Rossendale, Großbritannien) und mit Hilfe eines analogen Manometers geeicht. Jeder Druckwandler wurde von Beginn an auf die Höhe des rechten Vorhofs des Versuchstieres positioniert.

Über die in das Versuchstier eingebrachten Katheter wurden der systolische arterielle Blutdruck, der diastolische arterielle Blutdruck und somit auch der MAP kontinuierlich gemessen. Außerdem wurde der ZVD, der systolische, der diastolische PAP und der mittlere PAP (MPAP) abgeleitet.

Zur Messung des PCWP wurde der Ballon des Swan-Ganz-Katheters mit Luft gefüllt. Danach wurde der Katheter in die Pulmonalarterie vorgeschoben, bis der Ballon einen kleinen Ast der Pulmonalarterie verschloss. Über die Katheterspitze distal des Ballons konnte dann ein Druck gemessen werden, der den Druckverhältnissen im kleinen Kreislauf und im linken Vorhof entspricht. Dieser Wert ist identisch mit der Vorlast des linken Ventrikels.

Alle Werte wurden mit der Software LabChart 7 (Version 7.3.7, ADInstruments, Dunedin, Neuseeland) erfasst und auf einem Monitor dargestellt.

Das HZV wurde halbstündlich durch Thermodilution mittels eines Computers (Vigilance®, Typ VGS1, Baxter, Edwards Lifesciences LLC, Irvine, USA) gemessen. Es erfolgten fünf Injektionen von je 5 ml eisgekühlter steriler NaCl-Lösung in den proximalen Port des Swan-Ganz-Katheters. Der höchste und niedrigste Wert wurden von weiteren Berechnungen ausgeschlossen. Von den restlichen drei Werten wurde der Mittelwert bestimmt, um eine Mittelung über den Atemzyklus zu ermöglichen.

Der systemische vaskuläre Widerstand (SVR; Formel 1) und PVR (Formel 2) wurden mittels Standardformeln wie folgt berechnet.

$$SVR = \frac{(MAP - ZVD) \times 80}{HZV} \quad \text{Formel 1}$$

$$PVR = \frac{(MPAP - PCWP) \times 80}{HZV} \quad \text{Formel 2}$$

SVR	=	Systemischer vaskulärer Widerstand	[dyn x sec x cm ⁻⁵]
MAP	=	Mittlerer arterieller Blutdruck	[mmHg]
ZVD	=	Zentral-venöser Blutdruck	[mmHg]
HZV	=	Herzzeitvolumen	[l/min]
PVR	=	Pulmonal-vaskulärer Widerstand	[dyn x sec x cm ⁻⁵]
MPAP	=	Mittlerer pulmonal-arterieller Druck	[mmHg]
PCWP	=	Pulmonal-kapillärer Verschlussdruck	[mmHg]
80	=	Faktor zur Einheitenkorrektur	

Zusätzlich wurde ein PiCCO System zur kontinuierlichen Pulskonturanalyse etabliert. Die nötige Kalibrierung wurde stündlich durch die Injektion von 3 x 5 ml NaCl durchgeführt.

2.2.2.5 Messung des Urinvolumens

Die Urinausscheidung über den Blasenkatheter wurde regelmäßig kontrolliert und stündlich quantifiziert.

2.2.2.6 Messung respiratorischer Parameter

Das Beatmungsgerät zeichnete die inspiratorischen und expiratorischen V_T , die AF, das Atemminutenvolumen (AMV), die Höhe des PEEP und das expiratorische Kohlenstoffdioxid (etCO₂) automatisch auf und stellte die Werte zusätzlich auf dem Monitor des Gerätes dar. Über ein Differenzialdruckmessgerät (PowerLab 8/35, ADInstruments, Dunedin, Neuseeland) wurden die Werte der Atemwegsdrücke ebenfalls an die LabChart Software übermittelt und aufgezeichnet.

2.2.2.7 Messung von exhalierem Stickstoff (NO_{ex})

Während der gesamten Versuchsdauer wurde das exhalierete NO (NO_{ex}) kontinuierlich gemessen. Durch den Anschluss eines Katheters an den Expirationsschenkel vor dem PEEP-Ventil des Beatmungssystems wurde die exhalierete Luft einem NO-Analysator (Sievers® NOA 280i, Analytix Limited, Durham, UK) zugeführt. Die Analyse erfolgt via OBC, wodurch eine

Material und Methoden

sofortige quantitative Bestimmung von NO auf 0,1 ppb genau erreicht wurde. Diese Art der Messung ist die sensitivste, genaueste und daher allgemein gebräuchlichste Methode zur Bestimmung von NO für experimentelle Zwecke (47). Die gemessenen Werte wurde ebenfalls durch die LabChart Software dargestellt und dokumentiert.

2.2.2.8 *Quantitative Laboranalyse*

Halbstündlich wurden Blutproben aus dem arteriellen Katheter und dem distalen Lumen des Swan-Ganz-Katheters entnommen. Diese wurden mittels BGA-Messgerät (ABL 800®, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) untersucht. Damit konnten die Werte des pH, der Elektrolyte, der PaO₂ und PaCO₂, der Bikarbonatkonzentration (HCO₃⁻) und der aktuellen Basenabweichung (*Base Excess*, ABE) im arteriellen und gemischt-venösen Blut alle 30 min bestimmt und dokumentiert werden.

Die Konzentration des Hb, die unfraktionierte O₂-Sättigung (sO₂) sowie Met- (MetHb) und Carboxyhämoglobin (COHb) wurden durch ein auf Schweineblut geeichtes Hämoxymeter (COSM3®, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) ermittelt. Die Oxyhämoglobinfraktion (FO₂Hb) wurde aus der sO₂, MetHb und COHb nach Formel 3 abgeleitet. Durch BGA konnten der Sauerstoffgehalt (cO₂) (Formel 4) und näherungsweise die Shuntfraktion (Q_s / Q_t) (Formel 5) berechnet werden. Zur Bestimmung des pulmonal-kapillären Sauerstoffgehaltes (C_cO₂) wurde eine sO₂ von 100 % angenommen.

$$FO_2Hb = sO_2 - MetHb - COHb \quad \text{Formel 3}$$

$$cO_2 = 1,34 \times Hb \times FO_2Hb + 0,0031 \times PO_2 \quad \text{Formel 4}$$

$$\frac{Q_s}{Q_t} = \frac{C_cO_2 - C_aO_2}{C_cO_2 - C_vO_2} \quad \text{Formel 5}$$

FO ₂ Hb	=	Oxyhämoglobinfraktion	[%]
sO ₂	=	Unfraktionierte Sauerstoffsättigung	[%]
MetHb	=	Methämoglobin	[%]
COHb	=	Carboxyhämoglobin	[%]
cO ₂	=	Sauerstoffgehalt	[ml/dl]
1,34	=	Hüfner-Zahl	[ml/g]
Hb	=	Hämoglobin	[g/dl]
0,0031	=	Sauerstofflöslichkeitskoeffizient	[ml/dl x mmHg]
PO ₂	=	Sauerstoffpartialdruck	[mmHg]
Q _s / Q _t	=	Shuntfraktion	[%]
C _c O ₂	=	Pulmonal-kapillärer Sauerstoffgehalt	[ml/dl]
C _a O ₂	=	Arterieller Sauerstoffgehalt	[ml/dl]
C _v O ₂	=	Venöser Sauerstoffgehalt	[ml/dl]

2.2.2.9 Quantifizierung des Lungenödems

Nach Versuchsende wurde in tiefer, ununterbrochener Narkose die Euthanasie der Versuchstiere durch i. v.-Applikation von 40 mval KCl (7,45 % B. Braun, Melsungen, Deutschland) durchgeführt. Es folgte die Eröffnung des Brustkorbes und eine Probenentnahme vom Ober-, Mittel- und Unterlappen der rechten Lunge jeweils apikal, medial und basal. Pro Versuchstier wurden 9 Gewebeproben entnommen.

Als etabliertes Maß zur Quantifizierung eines Lungenödems ermittelten wir die *wet-to-dry-Ratio* nach Peterson et. al. (48). Dazu wurde das Gewicht der Gewebeproben direkt nach Entnahme bestimmt. Im Anschluss erfolgten mehrere Trocknungsschritte in einer Mikrowelle (600 W) für jede Gewebeprobe aufeinander folgend für 3 x 1 min, 2 x 2 min, 3 x 3 min und 1 x 5 min. Anschließend wurden 15-minütige Trocknungsschritte so oft wiederholt, bis der Gewichtsverlust gegenüber dem vorherigen Trocknungsschritt weniger als 1 mg betrug. Das

Material und Methoden

Verhältnis des Probengewichts zum Entnahmezeitpunkt zum Gewicht nach der vollständigen Trocknung ergibt die *wet-to-dry-Ratio*.

2.2.2.10 Datenanalyse

Die statistische Analyse der respiratorischen und hämodynamischen Parameter wurden mit dem Programm GraphPad Prism Version 6 für Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA) durchgeführt.

Die respiratorischen und hämodynamischen Parameter wurden über vier Stunden alle 30 min erhoben, sobald über 60 min der $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 100$ mmHg lag. Es resultierten acht Messzeitpunkte. Aufgrund der kleinen Stichprobengröße lag keine Normalverteilung vor. Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zu den jeweiligen Messzeitpunkten sowie innerhalb einer Versuchsgruppe über die Zeit wurden mit einer zweifachen Varianzanalyse (*two-way analysis of Variance, ANOVA*) mit *post hoc* Bonferroni-Test untersucht. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt, bei einer Power von 80 %. Starben Tiere vor Ende der vierstündigen Versuchszeit, wurden ihre Werte bis zum Zeitpunkt des Todes in die Analyse miteinbezogen.

Die Werte der *wet-to-dry-Ratio* wurden mit einem Mann-Whitney-Test ausgewertet. Wenn nicht anders bezeichnet, wurden Ergebnisse als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Nitrit (NO_2^-)-Reduktase-unabhängige Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) *in vitro*

Die Versuchsreihen mit einer Testlung wurden durchgeführt, um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die Reduktion von NO_2^- auch spontan und im anorganischen Milieu, also NO_2^- -Reduktase-unabhängig, erfolgen kann.

Es kam in der Kontrolle (ohne NaNO_2 -Applikation) zu keiner signifikanten NO-Produktion. Bei allen Versuchen mit NO_2^- -Inhalation wurde exhalierteres NO nachgewiesen.

Bei einer NaNO_2 -Zufuhr von 1,5 mg/min wurde die maximale exhalierete NO-Konzentration nach 4 Minuten erreicht und lag bei 33,7 ppb. Danach wurde im gesamten Beobachtungszeitraum ein stetiger Abfall von exhalierendem NO gemessen.

Bei einer NaNO_2 -Zufuhr von 7,5 mg/min wurde die maximale exhalierete NO-Konzentration nach 12 min erreicht und betrug 36,6 ppb. Die NO-Konzentration blieb für den gesamten Beobachtungszeitraum konstant auf hohem Niveau.

Bei einer Zufuhr von 75 mg/min NaNO_2 wurde eine NO-Konzentration 35,1 ppb nach 3 min erreicht. Das gemessene NO sank in den folgenden 3 min auf 32,4 ppb und stieg danach bis zum Ende der Beobachtungszeit auf 41,2 ppb an (siehe Abbildung 3).

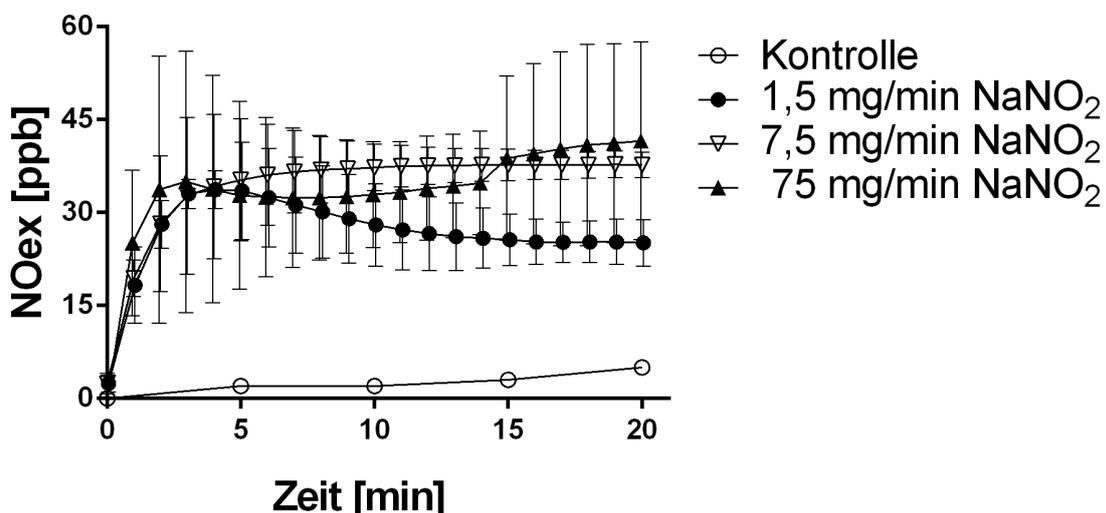


Abbildung 3: Exhalierteres NO (NOex) einer beatmeten Testlung unter Einleitung von verschiedenen Konzentrationen von NaNO_2 in den Inspirationsschenkel (Mittelwert + Standardabweichung) über 20 min.

3.2 Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) bei inhalativer Gabe von Nitrit (NO₂⁻) bei Surfactant-depletierten Schweinen

Die Versuchsreihen mit inhaliertem NO₂⁻ wurden durchgeführt, um eine Aussage darüber treffen zu können, ob eine Verbesserung der Oxygenierung während eines experimentell induzierten Lungenschadens bei Surfactant-depletierten Schweinen durch NO-abhängige Mechanismen erfolgt.

3.2.1 *Exhalirtes Stickstoffmonoxid (NO_{ex})*

In der Kontrollgruppe wurde während der Versuche keine gesteigerte NO-Produktion gemessen. In der Interventionsgruppe stieg das NO_{ex} ab Beginn der Inhalation über 60 ppb und fiel während des Beobachtungszeitraums bis unter 40 ppb ab. Es kam zu einem signifikanten Anstieg des NO_{ex} im gesamten Beobachtungszeitraum (siehe Abbildung 4).

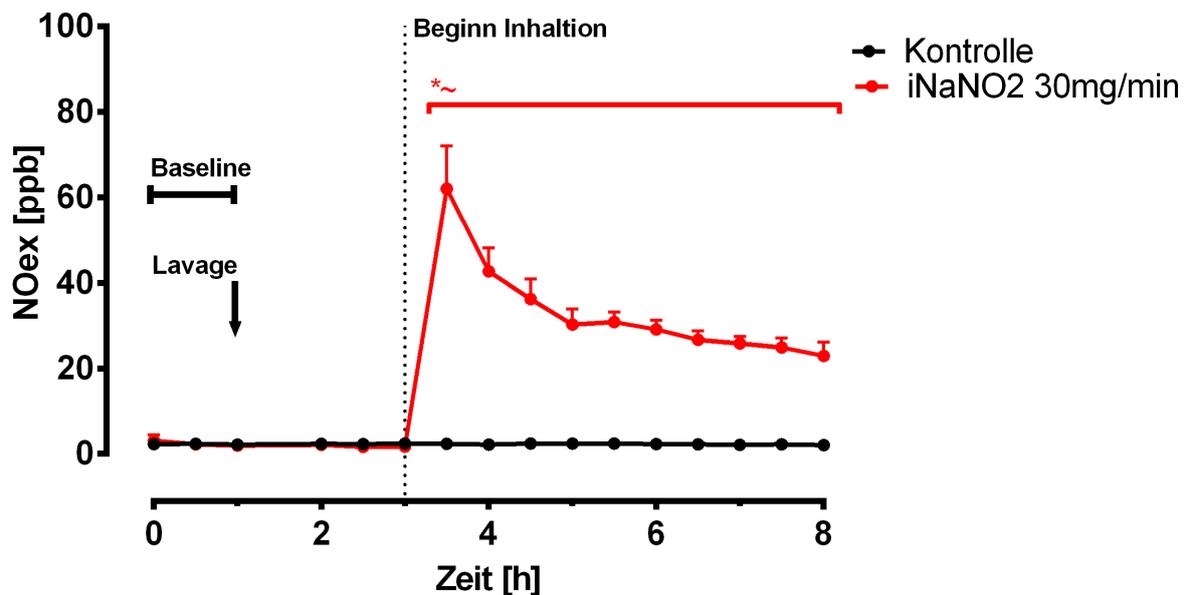


Abbildung 4: Bildung von exhaliertem NO (NO_{ex}) im zeitlichen Verlauf bei Surfactant-depletierten Schweinen der Interventions- und Kontrollgruppe (Mittelwert + Standardfehler). Bei der Interventionsgruppe erfolgt zum Zeitpunkt 3 h eine 20-minütige Inhalation von NaNO₂. Vergleich Interventions- und Kontrollgruppe:

*: $p < 0,05$ zum gleichen Zeitpunkt; ~: $p < 0,05$ vs. Zeitpunkt 3 h.

Ergebnisse

3.2.2 Arterielle Fraktion des Methämoglobin (MetHb)

Der Anteil des MetHb lag vor der Lavage bei 0 %.² Nach der Lavage lag der Anteil des MetHb sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Interventionsgruppe zwischen 0 und 1 %. Der MetHb-Anteil in der Kontrollgruppe veränderte sich im Beobachtungszeitraum nicht. In der Interventionsgruppe stieg der MetHb-Anteil nach Beginn der Inhalation von NO_2^- auf 6,7 % signifikant an, fiel im Verlauf der Beobachtungszeit auf 2,8 % ab und war weiterhin signifikant höher als die MetHb-Werte vor der Inhalation sowie der MetHb-Wert der Kontrolle zum gleichen Messzeitpunkt (siehe Abbildung 5).

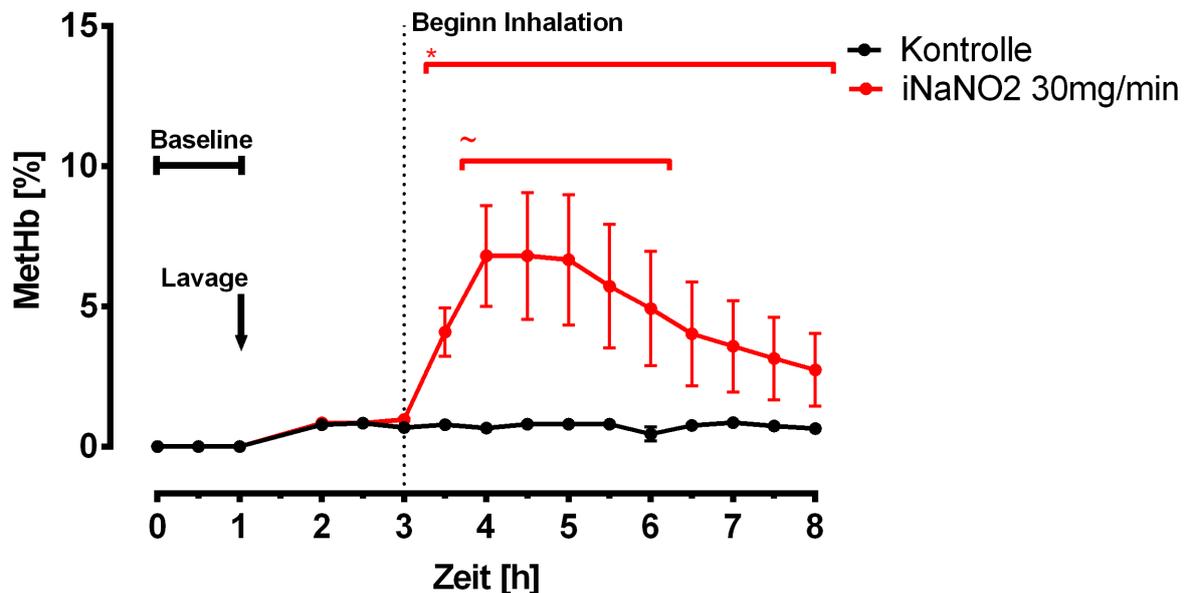


Abbildung 5: Anteil des arteriellen Methämoglobin (MetHb) im zeitlichen Verlauf bei Surfactant-depletierten Schweinen der Interventions- und Kontrollgruppe (Mittelwert + Standardfehler). Bei der Interventionsgruppe erfolgt zum Zeitpunkt 3 h eine 20-minütige Inhalation von NaNO_2 . Vergleich Interventions- und Kontrollgruppe: *: $p < 0,05$ zum gleichen Zeitpunkt; ~: $p < 0,05$ vs. Zeitpunkt 3 h; Negative Messwerte (0 h, 0,5 h, 1 h, 1,5 h) wurden als 0 % dargestellt.

² Zu den Messzeitpunkten 0 h, 0,5 h, 1 h und 1,5 h wurden teilweise negative Werte ermittelt. Da es sich hier vermutlich um einen Messfehler handelt, wird davon ausgegangen, dass der MetHb-Anteil bei 0 % lag.

Ergebnisse

3.2.3 Arterieller Sauerstoffpartialdruck (P_aO_2)

Vor der Lavage konnte ein P_aO_2 im arteriellen Blut aller Versuchstiere von über 500 mmHg bei Beatmung mit reinem O_2 erreicht werden. Durch die Lavage sank sowohl in der Kontroll- als auch in der Interventionsgruppe der P_aO_2 unter 100 mmHg. Im Verlauf der Beobachtungszeit stieg der arterielle P_aO_2 bei der Kontroll- und der Interventionsgruppe bis über 100 mmHg an. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen konnte dabei nicht festgestellt werden (siehe Abbildung 6).

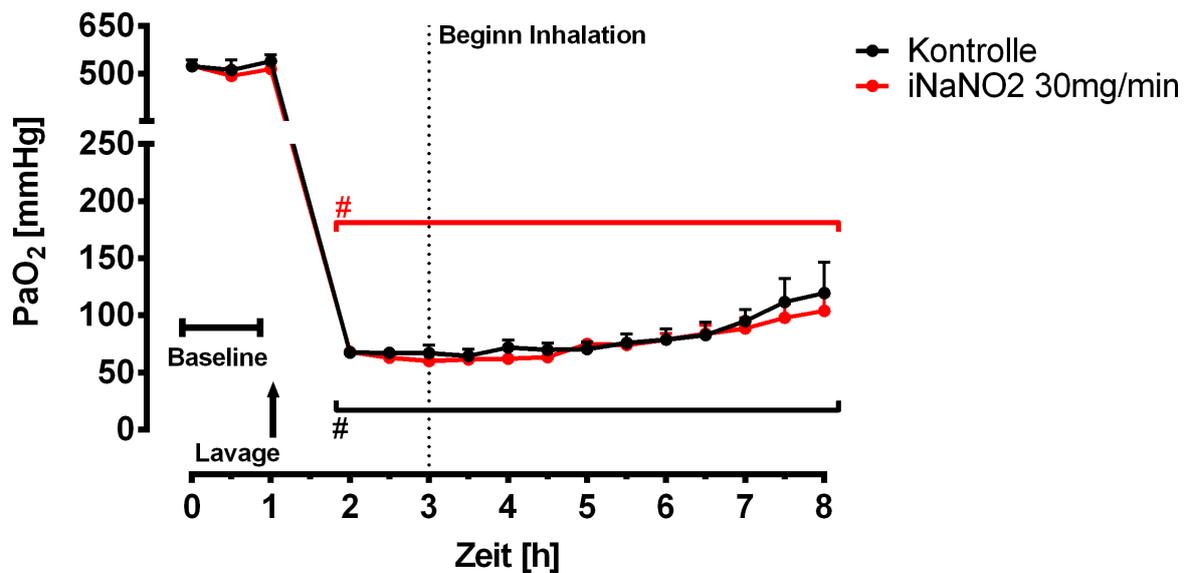


Abbildung 6: Arterieller Sauerstoffpartialdruck (P_aO_2) im zeitlichen Verlauf bei Surfactant-depletierten Schweinen der Interventions- und Kontrollgruppe (Mittelwert + Standardfehler). Bei der Interventionsgruppe erfolgt zum Zeitpunkt 3 h eine 20-minütige Inhalation von $NaNO_2$. Vergleich innerhalb einer Gruppe: #: $p < 0,05$ vs. Zeitpunkt 1 h.

Ergebnisse

3.2.4 Arterieller Sauerstoffgehalt (C_aO_2)

Der C_aO_2 war über den gesamten Beobachtungszeitraum in beiden Gruppen konstant. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Interventionsgruppe festgestellt werden (siehe Abbildung 7).

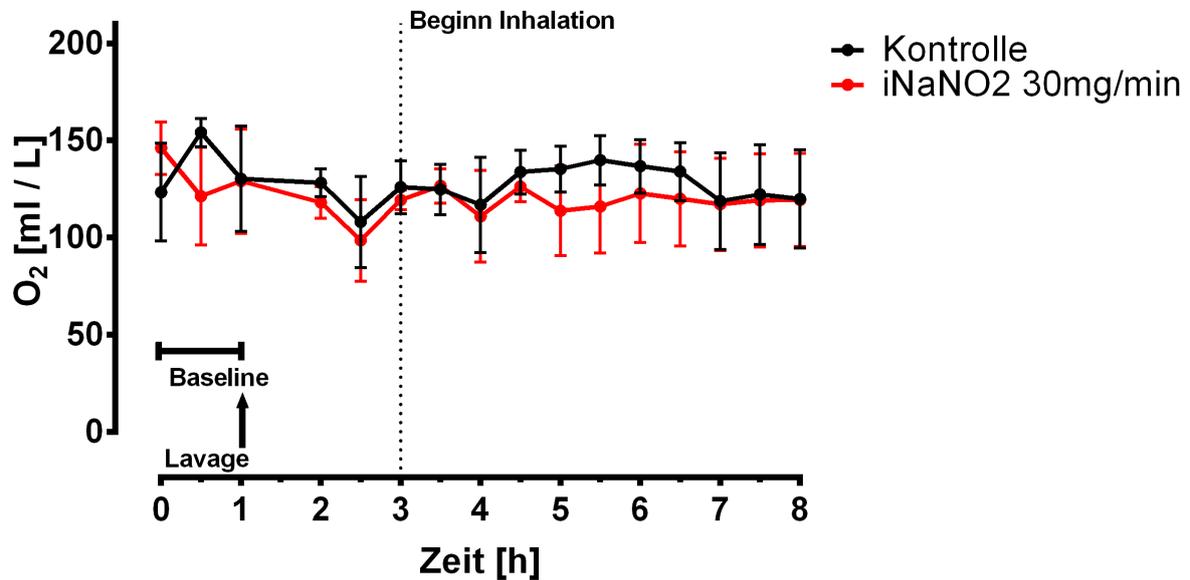


Abbildung 7: Arterieller Sauerstoffgehalt (C_aO_2) im zeitlichen Verlauf bei Surfactant-depletierten Schweinen der Interventions- und Kontrollgruppe (Mittelwert + Standardfehler). Bei der Interventionsgruppe erfolgt zum Zeitpunkt 3 h eine 20-minütige Inhalation von $NaNO_2$.

Ergebnisse

3.2.5 Arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck (P_aCO_2)

Nach der Lavage stieg der P_aCO_2 sowohl bei der Kontroll- als auch bei der Interventionsgruppe signifikant von ca. 50 mmHg auf ca. 100 mmHg an und fiel im Verlauf der Beobachtungszeit wieder bis ca. 80 mmHg ab. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gefunden (siehe Abbildung 8).

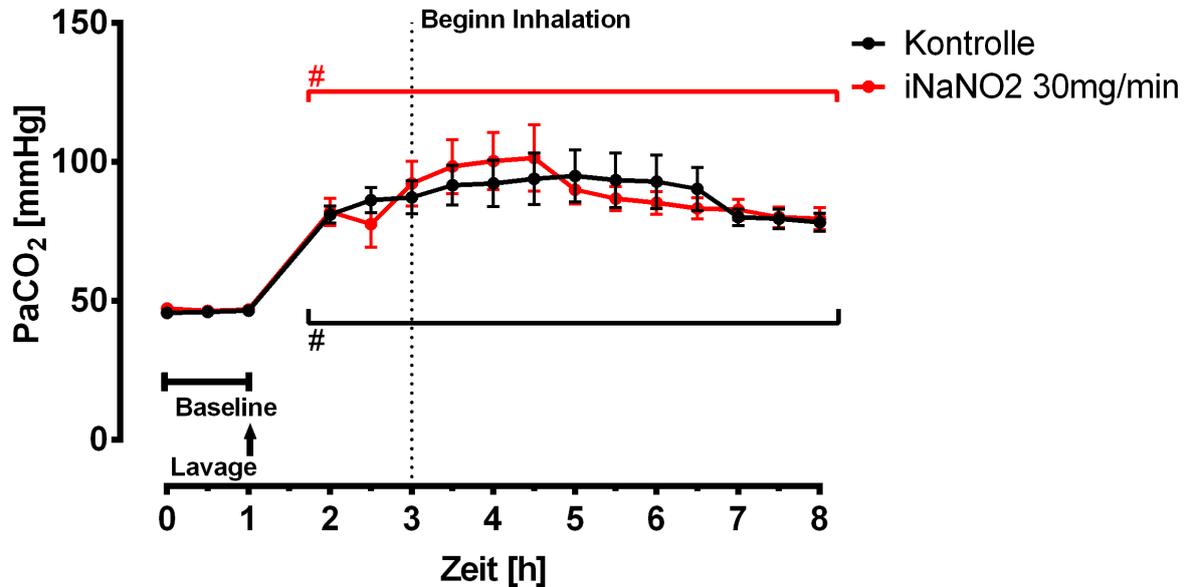


Abbildung 8: Arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdrucks (P_aCO_2) im zeitlichen Verlauf bei Surfactant-depletierten Schweinen der Interventions- und Kontrollgruppe (Mittelwert + Standardfehler). Bei der Interventionsgruppe erfolgt zum Zeitpunkt 3 h eine 20-minütige Inhalation von $NaNO_2$. Vergleich innerhalb einer Gruppe: #: $p < 0,05$ vs. Zeitpunkt 1 h.

Ergebnisse

3.2.6 Mittlerer pulmonaler arterieller Blutdruck (MPAP)

Nach der Lavage stieg der MPAP in der Kontrollgruppe signifikant von 15 auf 33 mmHg und fiel über den gesamten Beobachtungszeitraum auf einen signifikant niedrigeren Wert von 27 mmHg ab. In der Interventionsgruppe stieg der MPAP nach der Lavage von 15 auf 38 mmHg und damit signifikant stärker als in der Kontrollgruppe. Nach der 20-minütigen Inhalation fiel der MPAP ab, so dass ab dem Zeitpunkt 5 h ein signifikanter Unterschied gegenüber dem MPAP vor der NO_2 -Inhalation entstand.

Nach dem Ende der Inhalation waren die Werte der Interventionsgruppe mit denen der Kontrollgruppe vergleichbar und es konnte kein signifikanter Unterschied des MPAP zwischen beiden Gruppen gemessen werden (siehe Abbildung 9).

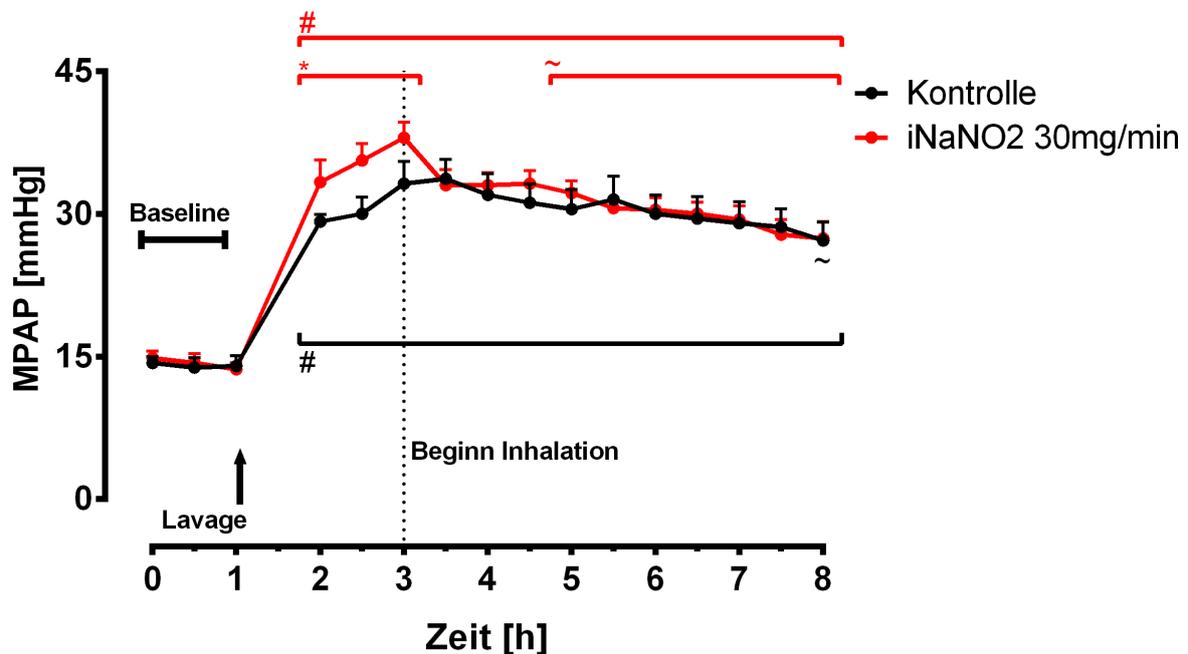


Abbildung 9: Pulmonalarterieller Druck (MPAP) im zeitlichen Verlauf bei Surfactant-depletierten Schweinen der Interventions- und Kontrollgruppe (Mittelwert + Standardfehler). Bei der Interventionsgruppe erfolgt zum Zeitpunkt 3 h eine 20-minütige Inhalation von NaNO_2 . Vergleich Interventions- und Kontrollgruppe: * : $p < 0,05$ zum gleichen Zeitpunkt; Vergleich innerhalb einer Gruppe: # : $p < 0,05$ vs. Zeitpunkt 1 h; ~ : $p < 0,05$ vs. Zeitpunkt 3 h.

Ergebnisse

3.2.7 Pulmonalvaskulärer Widerstand (PVR)

Nach der Lavage stieg der PVR der Interventions- und Kontrollgruppen signifikant und fiel in beiden Gruppen über den gesamten Beobachtungszeitraum. In der Interventionsgruppe gab es ab Zeitpunkt 5,5 h keinen signifikanten Unterschied zum PVR vor der Lavage. In der Kontrollgruppe war ab Zeitpunkt 3 h kein signifikanter Unterschied zum PVR vor der Lavage nachweisbar. Signifikante Unterschiede zwischen Interventions- und Kontrollgruppe gab es nicht (siehe Abbildung 10).

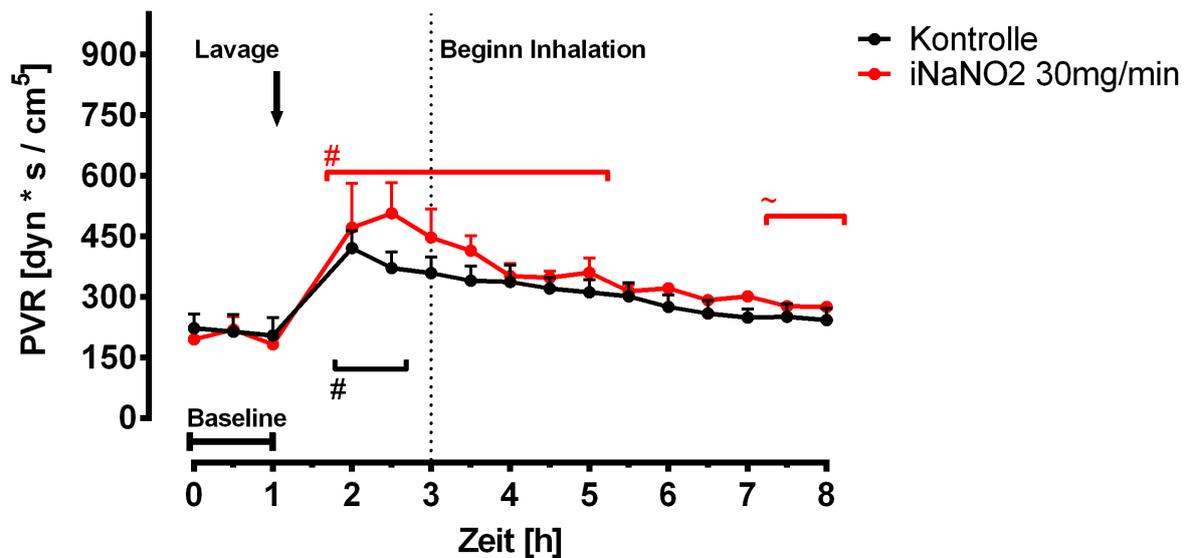


Abbildung 10: Pulmonalvaskulärer Widerstand (PVR) im zeitlichen Verlauf bei Surfactant-depletierten Schweinen der Interventions- und Kontrollgruppe (Mittelwert + Standardfehler). Bei der Interventionsgruppe erfolgt zum Zeitpunkt 3 h eine 20-minütige Inhalation von NaNO₂. Vergleich innerhalb einer Gruppe: #: $p < 0,05$ vs. Zeitpunkt 1 h; ~: $p < 0,05$ vs. Zeitpunkt 3 h.

Ergebnisse

3.2.8 Pulmonale *wet-to-dry-Ratio*

Die Proben im *wet-to-dry-Ratio* der Interventions- und Kontrollgruppe unterschieden sich in keiner Region der rechten Lunge. Jedoch unterschieden sich die apikalen und medialen sowie die apikalen und basalen Regionen der Lunge untereinander signifikant. Die Proben der apikalen Lungenregionen haben ein geringeres *wet-to-dry-Ratio*, was eine geringere Ödembildung anzeigt (siehe Abbildung 11). Das makroskopische Erscheinungsbild bestätigt dieses Ergebnis (siehe Abbildung 12).

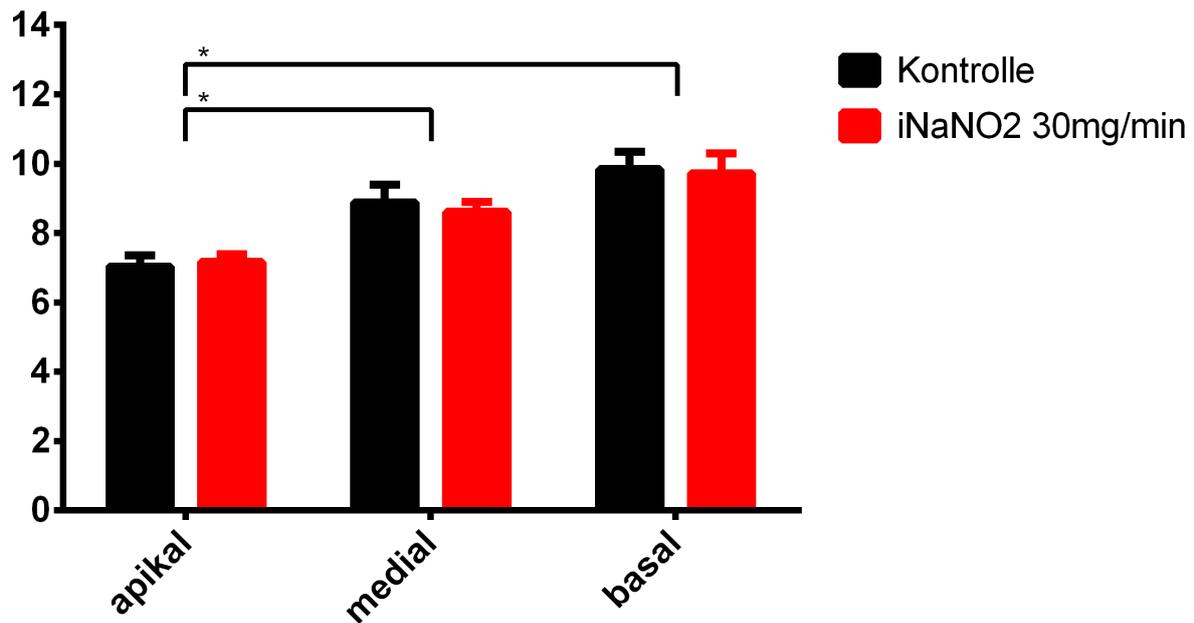


Abbildung 11: Pulmonale *wet-to-dry-Ratio* der Interventions- und Kontrollgruppe bei Surfactant-depletierten Schweinen (Mittelwert + Standardfehler) nach Versuchsende. *: $p < 0,05$.



Abbildung 12: Rechte Lunge nach Versuchsende.

Ergebnisse

3.2.9 Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)

Nach der Lavage fiel der MAP bei beiden Gruppen ab und blieb bis zum Ende der Beobachtungszeit auf ähnlich niedrigem Niveau. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gefunden (siehe Abbildung 13).

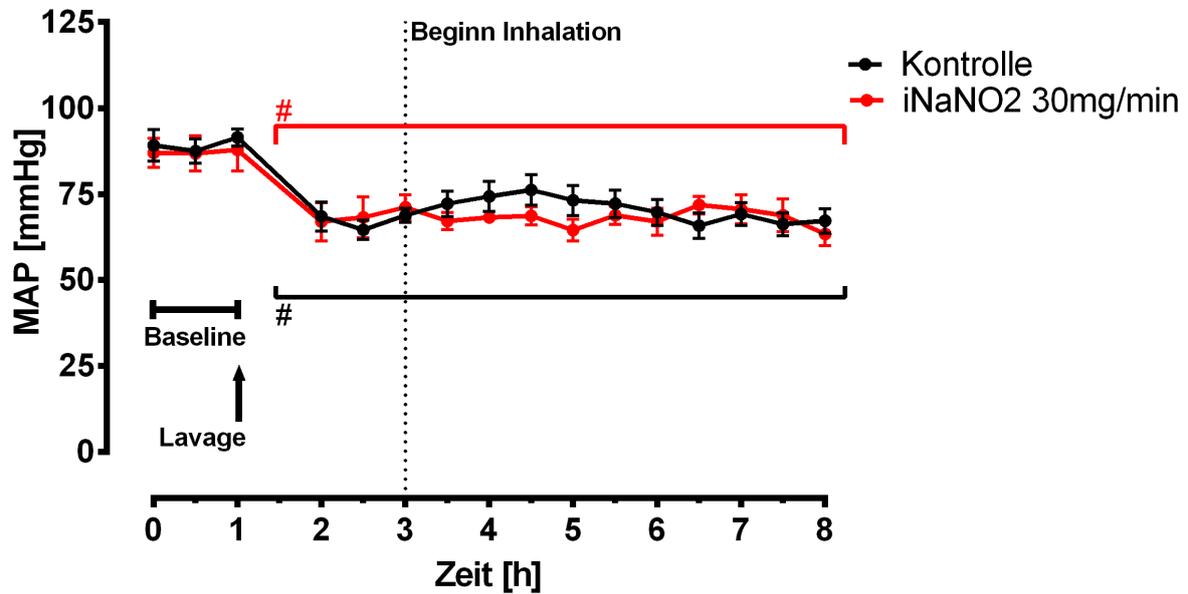


Abbildung 13 Mittlerer arterieller Blutdruck im zeitlichen Verlauf bei Surfactant-depletierten Schweinen der Interventions- und Kontrollgruppe (Mittelwert + Standardfehler). Bei der Interventionsgruppe erfolgt zum Zeitpunkt 3 h eine 20-minütige Inhalation von NaNO₂. Vergleich innerhalb einer Gruppe: #: $p < 0,05$ vs. Zeitpunkt 1 h.

Ergebnisse

3.2.10 Systemischer Gefäßwiderstand (SVR)

Nach der Lavage sank der SVR der Kontrollgruppe signifikant von 2150 dyn*s/cm⁵ auf 876 dyn*s/cm⁵. Der SVR der Interventionsgruppe fiel signifikant von 1873 dyn*s/cm⁵ auf 761 dyn*s/cm⁵. Die Werte sanken in beiden Gruppen anschließend weiter. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll- und Interventionsgruppe bestanden zu keiner Zeit (siehe Abbildung 14).

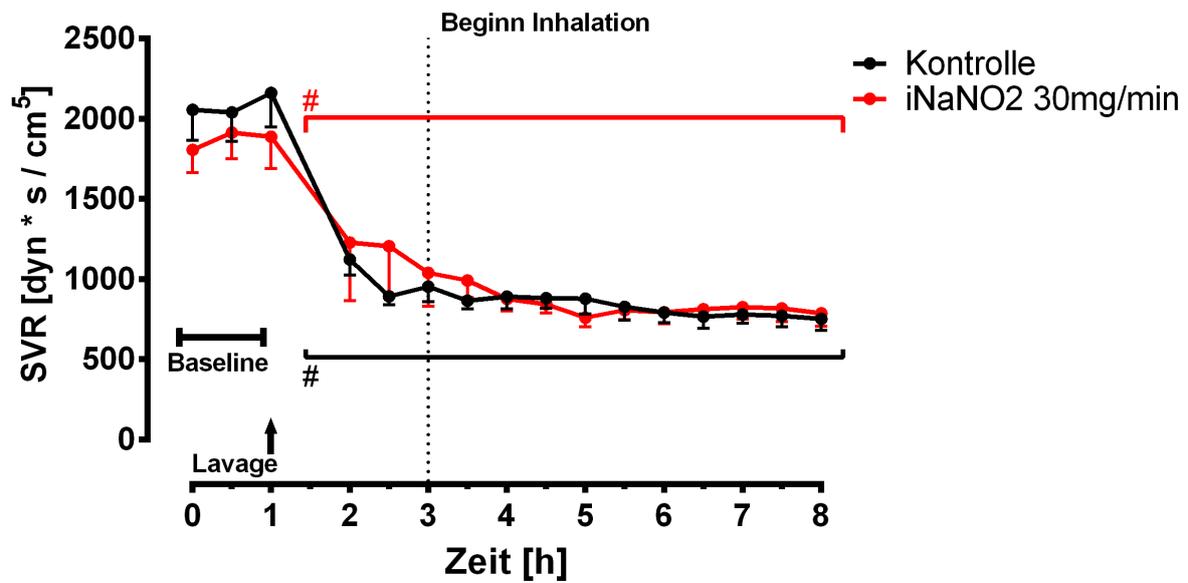


Abbildung 14: Systemischer Gefäßwiderstand (SVR) im zeitlichen Verlauf bei Surfactant-depletierten Schweinen der Interventions- und Kontrollgruppe (Mittelwert + Standardfehler). Bei der Interventionsgruppe erfolgt zum Zeitpunkt 3 h eine 20-minütige Inhalation von NaNO₂. Vergleich innerhalb einer Gruppe: #: p < 0,05 vs. Zeitpunkt 1 h.

Ergebnisse

3.2.11 Zentralvenöser Druck (ZVD)

Der ZVD war im gesamten Beobachtungszeitraum in beiden Gruppen konstant. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Interventionsgruppe festgestellt (siehe Abbildung 15).

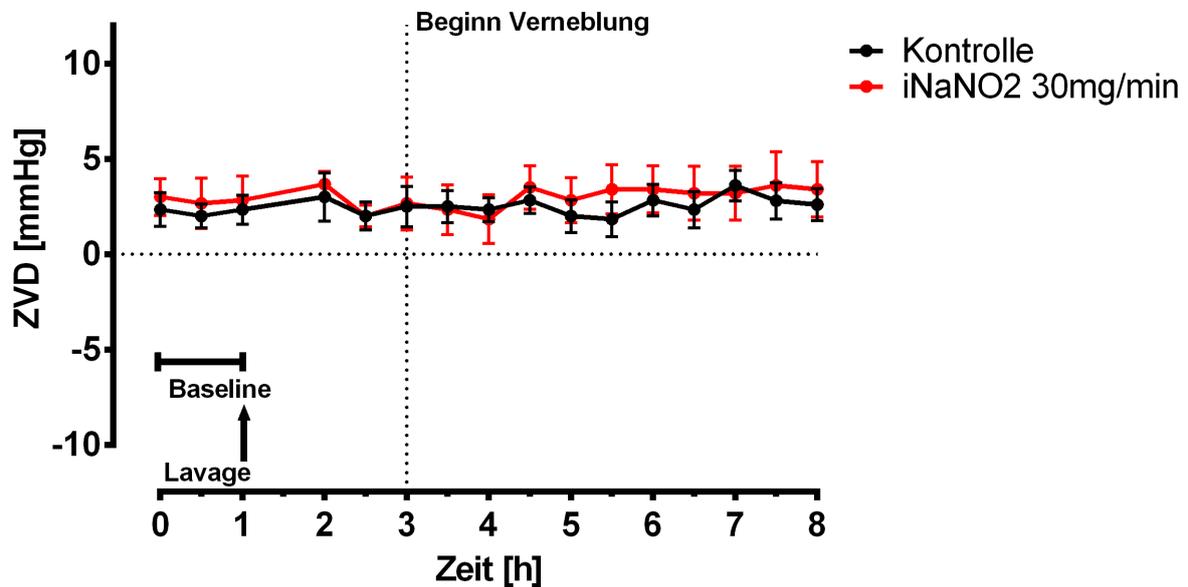


Abbildung 15: Zentralvenöser Druck (ZVD) im zeitlichen Verlauf bei Surfactant-depletierten Schweinen der Interventions- und Kontrollgruppe (Mittelwert + Standardfehler). Bei der Interventionsgruppe erfolgt zum Zeitpunkt 3 h eine 20-minütige Inhalation von NaNO₂.

Ergebnisse

3.2.12 Herzzeitvolumen (HZV)

Nach der Lavage stieg in beiden Gruppen das HZV an und blieb ab Zeitpunkt 2,5 h konstant signifikant höher als vor der Lavage. Ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen konnte dabei nicht gezeigt werden (siehe Abbildung 16).

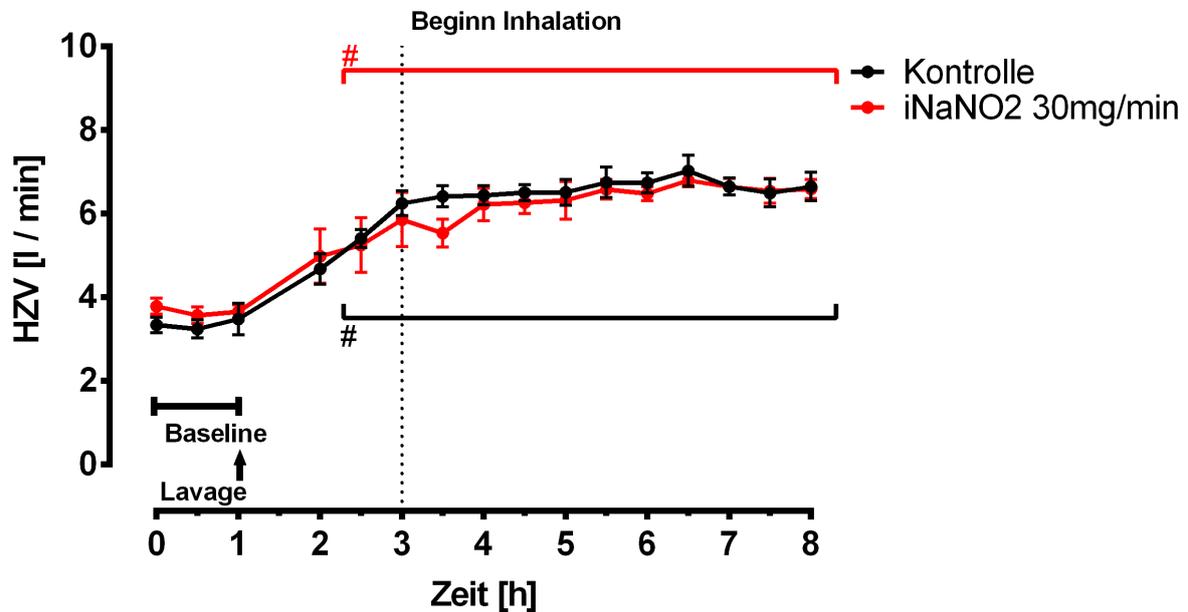


Abbildung 16: Herzzeitvolumen (HZV) im zeitlichen Verlauf bei Surfactant-depletierten Schweinen der Interventions- und Kontrollgruppe (Mittelwert + Standardfehler). Bei der Interventionsgruppe erfolgt zum Zeitpunkt 3 h eine 20-minütige Inhalation von NaNO₂. Vergleich innerhalb einer Gruppe: #: p < 0,05 vs. Zeitpunkt 1 h.

4 Diskussion

4.1 Untersuchungen zur Nitrit (NO_2^-)-bedingten Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion unter physiologischen Bedingungen

Die erste Hypothese der vorliegenden Arbeit ist, dass durch die Inhalation von NO_2^- bei Surfactant-depletierten Schweinen ein Anstieg der expiratorischen NO-Konzentration messbar ist.

Es wurde zunächst durch *In-vitro*-Versuche an einer Testlunge überprüft, ob inhaliertes NO_2^- auch außerhalb eines biologischen Systems spontan zu NO reduziert wird. Anschließend wurde Hypothese 1 *in vivo* anhand eines Lavage-Modells zur Surfactant-Depletion bei Hausschweinen getestet: Ziel war es hier die Frage zu beantworten, ob bei der inhalativen Gabe von Natriumnitrit Nitrit zu Stickstoffmonoxid während eines experimentell induzierten Lungenschadens bei Surfactant-depletierten Schweinen reduziert wird und somit expiratorisch messbar ist.

4.1.1 Nitrit (NO_2^-)-Reduktase-unabhängige Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) *in vitro*

In den *In-vitro*-Versuchen, bei denen NO_2^- in Form von NaNO_2 während der Beatmung einer Testlunge am Inspirationsschenkel appliziert wurde, konnte die Bildung von NO in der Expirationsluft nachgewiesen werden. Die resultierende NO-Konzentration korrelierte dabei positiv mit der applizierten NaNO_2 -Konzentration. In der Kontrollgruppe ohne NaNO_2 -Applikation kam es zu keiner nennenswerten NO-Produktion. Andere Arbeitsgruppen zeigten bisher, dass NO_2^- lediglich bei Anwesenheit von NO_2^- -Reduktasen in Geweben von Säugetieren und Menschen zu NO reduziert wird (18; 22; 21; 49; 18; 50). Der Nachweis von NO nach Applikation von NaNO_2 in ein enzymfreies *In-vitro*-Beatmungssystem mit einer Testlunge zeigt, dass NO aus NO_2^- in einem anorganischen Milieu auch ohne NO_2^- -Reduktasen entstehen kann.

Daraus folgt, dass die Reduktion des NO_2^- nicht ausschließlich eine enzymatische Reaktion ist, sondern vermutlich schon durch das Zerstäuben von NaNO_2 im Vernebler oder durch die Gegebenheiten des Schlauchsystems bzw. der Testlunge beginnt. Folglich ist davon auszugehen, dass bei allen Versuchen, in denen NaNO_2 als Aerosol verwendet wird, ein unbestimmter Anteil NO anorganisch erzeugt ist. Die Erforschung dieses Vorgangs könnte eine Thematik für Folgeversuche darstellen. Es scheint möglich, dass NO_2^- gleichzeitig ein Oxidations- und Reduktionsmittel ist, so dass es unter bestimmten Bedingungen zu NO_3^- oxidiert und zu NO reduziert wird. Eine solche chemische Reaktion ist als Disproportionierung

Diskussion

definiert. Es leitet sich daraus die Arbeitshypothese ab, dass NO im Rahmen einer spontanen Disproportionierung aus NO_2^- entstehen kann.

4.1.2 Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) bei inhalativer Gabe von Nitrit (NO_2^-) im experimentell induzierten akuten Lungenschaden bei Surfactant-depletierten Schweinen

Andere Arbeitsgruppen zeigten bereits die Reduktion von NO_2^- zu NO im menschlichen Magen (49; 21) sowie in kardialen Gewebe von Ratten (22). Die Exhalation von NO nach inhalativer Gabe von NO_2^- in Form von NaNO_2 konnten von Hunter et al. und Rix et al. bei Lämmern und Menschen gemessen werden (7; 18).

Auch in der vorliegenden Studie beim Hausschwein konnte nach Inhalation von NO_2^- exhalierendes NO gemessen werden. Wie bei den Lämmern (7) wurde es in Form von NaNO_2 inhalativ über 20 min verabreicht. In der vorliegenden Studie wurde jedoch eine zweifach höhere Konzentration als Anpassung an das höhere Körpergewicht der Versuchstiere verwendet, was zu einer bis zu viermal höheren Menge von exhalierendem NO beim Hausschwein führte. Diese Beobachtung legt nahe, dass die Bildung von NO durch die inhalative Gabe von NO_2^- bei Hausschweinen vermutlich effektiver ist als bei Lämmern. Hunter et al. erzeugen in ihren Versuchen Hypoxie und damit verbunden einen erhöhten MPAP durch Verringerung der FiO_2 (7). In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch die Lavagemethode zur Surfactant-Depletion verwendet, ohne die inspiratorische FiO_2 abzusenken. Daher sind die von uns ermittelten Werte nur bedingt mit denen von Hunter et al. vergleichbar.

In den durchgeführten *In-vivo*-Versuchen der vorliegenden Studie konnte eine signifikant höhere exhalierende NO-Konzentration als bei den biokatalysatorfreien *In-vitro*-Versuchen nachgewiesen werden. Der Aufbau der Beatmungssysteme wurde dabei bis auf den jeweiligen Anschluss an eine Testlunge bzw. die Lunge der jeweiligen Versuchstiere nicht verändert. Es konnte damit gezeigt werden, dass es nach der Inhalation von NO_2^- bei Surfactant-depletierten Schweinen zur Produktion von expiratorisch messbarem NO gekommen ist. Die erste Hypothese dieser Arbeit ist somit bestätigt.

4.2 Untersuchungen zur Verbesserung der Oxygenierung während eines experimentell induzierten Lungenschadens bei Surfactant-depletierten Schweinen durch inhaliertes Nitrit (NO_2^-)

Die zweite Hypothese der vorliegenden Arbeit ist, dass inhaliertes NO_2^- die Oxygenierung während eines experimentell induzierten Lungenschadens bei Surfactant-depletierten Schweinen durch NO-abhängige Mechanismen verbessert. Es wurden dazu Parameter der Blutgasanalyse sowie der pulmonalen und systemischen Hämodynamik über den gesamten Zeitverlauf der Versuche und abschließend die *wet-to-dry-Ratio* des Lungengewebes analysiert.

4.2.1 Einfluss von inhaliertem Nitrit (NO_2^-) auf Hämoglobin (Hb) und Methämoglobin (MetHb)

Die MetHb-Fraktion im Blut der Versuchstiere stieg bis auf 6,7 % durch die Eingabe von NaNO_2 in die Inspirationsluft und war bei allen Tieren der Interventionsgruppe gleichermaßen ausgeprägt. Es lag also eine Methämoglobinämie vor (physiologischer Referenzbereich 0,2 – 1 %). MetHb entsteht, wenn an der Hämgruppe eine echte Oxidation stattfindet, so dass das zweiwertige (Fe^{2+}) in dreiwertiges Eisen (Fe^{3+}) übergeht. Fe^{3+} kann keinen Sauerstoff binden (19), so dass sich ein vermehrtes Anfallen von MetHb negativ auf den C_aO_2 und damit auf das Sauerstoffangebot (DO_2) des Blutes auswirkt. Durch hohe Konzentrationen von MetHb könnten klassische Hypoxie-Symptome wie Kopfschmerzen, Benommenheit und Zyanose verursacht werden. Diese treten jedoch erst ab einem Grenzwert von 15 % MetHb im Blut beim Lungengesunden auf (10).

In der vorliegenden Studie erfolgte vermutlich die Reduktion des inhalierten NO_2^- zu NO nicht vollständig oder nicht schnell genug, sodass eine Restmenge NO_2^- über die Alveolen ins Blut übergang und dort Hb zu MetHb oxidiert hat. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Interventionsgruppe in Bezug auf den arteriellen Sauerstoffgehalt (C_aO_2). Die mit der NO_2^- -Inhalation verbundene leichte Methämoglobinämie der Interventionsgruppe hatte folglich keinen Einfluss auf den arteriellen Sauerstoffgehalt (C_aO_2) und die Oxygenierung. Trotzdem sollte im Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz diese potenziell pathologische Wirkung von NO_2^- berücksichtigt werden.

4.2.2 Einfluss von inhaliertem Nitrit (NO_2^-) auf den arteriellen Sauerstoffpartialdruck (PaO_2), den Sauerstoffgehalt (CaO_2) und den Kohlenstoffdioxidpartialdruck (PaCO_2)

Bei allen Versuchstieren wurden vor der Lavage regelhaft PaO_2 -Werte > 400 mmHg durch die Ventilation mit 100 % O_2 erzielt, was für vergleichbare Ausgangsbedingungen spricht.

In der Zeit nach der Lavage war der PaO_2 der Versuchstiere < 100 mmHg bei einer FiO_2 von 1,0, was einem $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 100$ mmHg entspricht. Nach der Berlin Definition des ARDS von 2012 (2) ist dies ein Kriterium für ein schweres ARDS, was die Versuchstiere über eine Stunde tolerierten. Durch die mit der Surfactant-Depletion induzierten Atelektasenbildung in den Lungen der Versuchstiere nahm der intrapulmonale Rechts-Links-Shunt zu. Daraus folgte ein vermindertes V/Q sowie ein geringer PaO_2 .

Ein signifikanter Unterschied des PaO_2 zwischen Kontroll- und Interventionsgruppe ergab sich im Verlauf der Beobachtungszeit nicht. Ebenso waren den CaO_2 betreffend keine signifikanten Unterschiede zwischen der Interventions- und der Kontrollgruppe nachweisbar. Dies zeigt, dass eine Applikation von NaNO_2 in die Inspirationsluft mit 30 mg/min über 20 min zwar messbares NO_{ex} produziert, dieses NO aber nicht in suffizienten Mengen über die Alveolen in die angrenzenden Kapillaren gelangt. Die angestrebte Dilatation der Blutgefäße mit der daraus folgenden Verringerung des Rechts-Links-Shunts und einem Anstieg des V/Q wurde nicht erreicht. Die Inhalation von NO_2^- hatte somit keinen Einfluss auf den PaO_2 und den CaO_2 der Interventionsgruppe. Eine verbesserte Oxygenierung konnte nicht erreicht werden. Rossaint et al. konnten 1993 zeigen, dass die Applikation von NO in die Inspirationsluft beim Menschen mit ARDS eine Verbesserung der Oxygenierung bewirkt (51). Verschiedene Meta-Analysen und systematische Reviews bestätigten diese Erkenntnis in den Folgejahren (52). Das in der vorliegenden Arbeit bei Hausschweinen gemessene exhalierte NO entspricht im Maximum 0,17 % der Menge, die von Rossaint et al. zur Inhalation eingesetzt wurden. Es konnte in der vorliegenden Studie keine Steigerung des PaO_2 und des CaO_2 durch Applikation von NO_2^- nachgewiesen werden. Dies ist durch den hohen Konzentrationsunterschied von NO in der vorgelegten Studie im Vergleich zu Rossaint et al. zu erklären. Zusätzlich ist dabei zu beachten, dass Rossaint et al. die Versuchsreihen an Menschen durchführten. Die Versuche zur Erstellung dieser Arbeit erfolgten an Hausschweinen. Bei anderen Untersuchungen an Schweinen in Allgemeinanästhesie zur inhalativen Gabe von NO konnte eine effektive Senkung des MPAP und PVR nachgewiesen werden. Aussagen bezüglich der Oxygenierung gab es jedoch nicht (53; 54).

Der $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ in der Studie von Rossaint et al. lag zu Beginn der Versuche im Mittel bei 152 mmHg und stieg im Mittel auf 199 mmHg an. Somit handelte es sich initial um eine

Diskussion

leichtere Ausprägung des ARDS als in den vorliegenden Versuchen ($\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 < 100 \text{ mmHg}$). Zudem applizierten Rossaint et al. NO direkt in die Inspirationsluft und legten dadurch den Konzentrationsanteil selbst fest. In der vorliegenden Studie wurde dagegen NaNO_2 als Aerosol appliziert, das sich erst im Körper der Versuchstiere der Interventionsgruppe zu NO reduzierte. Zusätzlich kann in der vorliegenden Studie durch das NO_{ex} keine Aussage dazu getroffen werden, wieviel NO im Atmungstrakt vorhanden war. Ggf. wurde durch die inhalative Gabe von NO_2^- in den Alveolen nicht genügend NO bereitgestellt, um einen positiven Einfluss auf den PaO_2 zu nehmen.

Der PaCO_2 des Blutes aller Tiere stieg nach der Surfactant-Depletion auf etwa das Doppelte des Ausgangswertes an. Es gab im Verlauf keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Interventionsgruppe. Die angestrebte Dilatation der Blutgefäße durch das produzierte NO und die damit verbundene Verringerung des Rechts-Links-Shunts sowie der Anstieg des V/Q würden den PaCO_2 signifikant verringern. Das Ausbleiben dieses Effekts ist ein weiterer Hinweis darauf, dass NO nicht in suffizienten Mengen über die Alveolen in die angrenzenden Kapillaren gelangen konnte. Durch die Inhalation von NO_2^- wurde der PaCO_2 der Versuchstiere nicht verringert.

4.2.3 Einfluss von inhaliertem Nitrit (NO_2^-) auf die pulmonale Hämodynamik und Ödembildung

Nach der Lavage stieg der MPAP der Interventions- und der Kontrollgruppe signifikant an und sank über die Dauer der Beobachtungszeit ab. Einen signifikanten Unterschied zwischen der Interventions- und der Kontrollgruppe nach der Inhalation von NO_2^- gab es dabei nicht. Die inhalative Gabe von NO_2^- hatte somit keinen Einfluss auf die Senkung des MPAP. Diese Erkenntnisse unterscheiden sich klar von denen anderer Arbeitsgruppen.

Hunter et al. beschreiben einen direkten signifikanten Abfall des MPAP mit Beginn der NaNO_2 -Inhalation sowie dessen post-inhalativen Wiederanstieg bei Lämmern (7).

Zuckerbraun et al. gelang eine dauerhafte pulmonal-arterielle Drucksenkung bei Ratten. Dafür ließen sie ihre Tiere ein- bis dreimal mal pro Woche NaNO_2 für insgesamt 20 min inhalieren und führten ihren Versuch über vier Wochen durch (8).

Heinonen et al. erzeugten eine signifikante Senkung des MPAP bei Schweinen unter Allgemeinanästhesie. Dazu applizierten sie NO bolusförmig inhalativ während der frühen Inspirationsphase. Das maximal gemessene NO_{ex} lag bei 90 ppb (53) und war somit höher als das NO_{ex} in der Interventionsgruppe der vorliegenden Studie.

Diskussion

In der vorgelegten Arbeit stieg der PVR analog zum MPAP nach der Lavage stark an. Auch Hunter et al. beschrieben den Anstieg des PVR unter Hypoxie bei Lämmern. Die inhalative Gabe von NaNO_2 führte dort zu einer signifikanten Senkung des PVR (7). Auch die inhalative Gabe von NO hat diese Eigenschaft (55; 56; 57; 58). Schultz et al. senkten den PVR signifikant durch die inhalative Gabe von NO bei narkotisierten Hausschweinen nachdem dieser durch induzierte pulmonale Embolisation angestiegen war. Dazu wurden inhalative Dosen von 3 ppm, 10 ppm, 30 ppm bzw. 100 ppm verwendet (54). Diese NO-Konzentrationen sind vielfach höher als das in der vorgelegten Studie gemessene NO_{ex} . Mit der Verwendung von 30 mg/min NaNO_2 konnte keine statistisch signifikante Senkung des PVR im Vergleich zur Kontrollgruppe aufgezeigt werden.

Das Ausbleiben der angestrebten Dilatation der Blutgefäße mit der daraus folgenden Senkung des MPAP und des PVR ist ein weiterer Hinweis dafür, dass bei der Applikation von 30 mg/min NaNO_2 über 20 min NO nicht in suffizienten Mengen über die Alveolen in die angrenzenden Kapillaren gelangen konnte. Eine Erhöhung der Menge, eine Verlängerung der Inhalationszeit oder mehrere Inhalationen in regelmäßigen Abständen könnten ermöglichen, dass die NO-Konzentration in den Alveolen im Vergleich zur vorgelegten Arbeit ansteigt. Damit könnte es möglich sein die Dilatation der Blutgefäße zu erreichen und den MPAP sowie den PVR signifikant zu senken. Die Erhöhung der NO-Konzentration ist dabei im Zusammenhang mit der MetHb-Konzentration zu betrachten, um den Einfluss auf den CaO_2 möglichst niedrig zu halten und pathologische Konzentrationen zu vermeiden.

In einer Fallvorstellung von John Clutton-Brock wurde eine Ödembildung in der Lunge von zwei Patient*innen durch NO-Vergiftung beschrieben (59). Greenbaum et al. bestätigten die Lungenödembildung nach NO-Inhalation bei narkotisierten Hunden (60). Bei Ziegen, die eine NO_3^- -Intoxikation nach Kohlfütterung erlitten, wurden neben einer Methämoglobinämie ebenfalls milde pulmonale Ödeme nachgewiesen (61). Bei diesen drei Fallvorstellungen bzw. Studien kann davon ausgegangen werden, dass die Individuen pulmonal nicht vorerkrankt waren. Die Untersuchung der *wet-to-dry-Ratio* der rechten Lunge in der vorgelegten Arbeit zeigte, dass basal mehr Flüssigkeit nachzuweisen war, als in den apikalen Lungenabschnitten. Eine stärkere basale Ödemausprägung ist statistisch signifikant nachweisbar, was vermutlich auf die Lavage zurück zu führen ist. Ruß et al. beschreiben ebenfalls eine Lungenödembildung nach Lavage beim Hausschwein (46). In der vorgelegten Arbeit ließen sich keine Unterschiede zwischen Kontroll- und Interventionsgruppe beobachten.

Zusammenfassend hat die inhalative Gabe von NO_2^- während eines schweren Lungenschadens bei Surfactant-depletierten Schweinen keine Auswirkungen auf den MPAP und den PVR und

somit die pulmonale Hämodynamik. Ebenso hat inhalativ verabreichtes NO_2^- keinen Einfluss auf die Ausprägung eines Lungenödems bei Surfactant-depletierten Schweinen.

4.2.4 Einfluss von Nitrit (NO_2^-) auf die systemische Hämodynamik

In den Inhalationsversuchen beim gesunden Menschen von Rix et al. kam es bei vier von sechs Proband*innen zu einer signifikanten systemischen Hypotension unter der Dosierung von 176 mg NaNO_2 . Daraufhin wurde auf eine weitere Dosissteigerung verzichtet. Unter der Gabe geringerer Dosen NaNO_2 (≤ 125 mg) wurde auch beim Menschen kein Abfall des MAP nachgewiesen (18). Es lässt sich daraus schlussfolgern, dass NaNO_2 bis zu einer gewissen Konzentration hauptsächlich lokale Wirkung zeigt.

In der vorliegenden Arbeit sank der MAP der Tiere in Interventions- und Kontrollgruppe. Über den gesamten Beobachtungszeitraum ließ sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachweisen. Die Inhalation von NO_2^- hat damit keinen bedeutenden Einfluss auf den MAP. Dies bestätigen die Ergebnisse von Hunter et al. und Zuckerbraun et al., die gleichen Beobachtungen bei Lämmern und Ratten machten (7; 8). Auch Schultz et al. wiesen dies bei der inhalativen Gabe von NO bei Schweinen in Allgemeinanästhesie nach (54). Der SVR fiel nach der Lavage sowohl in der Kontroll- als auch in der Versuchsgruppe stark ab und hielt sich danach auf einem konstant niedrigen Niveau. Einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- und Interventionsgruppe gab es nicht. Ein solcher Verlauf wird ebenfalls durch Hunter et al. bei Lämmern berichtet (7). Auch bei der Aufnahme von NO mit der Inspirationsluft bei Menschen und Hausschweinen wurde bisher keine Änderung des SVR beschrieben (51; 54). Ebenso lässt die inhalative Gabe von NO_2^- den SVR unbeeinflusst.

Weder die Lavage noch die NO_2^- -Inhalation erzeugten eine Änderung des ZVD in der vorgelegten Arbeit. Diese Konstanz des ZVD beschrieben Rossaint et al. bereits 1993 bei ihren Beobachtungen mit NO-Inhalation beim Menschen (51).

In den Versuchen von Hunter et al. stieg das HZV bei Lämmern durch das Absenken der FiO_2 auf 0,12. Die inhalative Gabe von NO_2^- hatte keinen Einfluss auf das HZV der Lämmer (7). Rossaint et al. beschrieben ebenfalls keinen Einfluss der Inhalation von NO auf das HZV bei Menschen mit ARDS (51). Auch die inhalative Gabe von NO bei Schweinen mit akuter pulmonaler Embolisation hatte keine signifikante HZV-Änderung zur Folge (54).

Das HZV steigt durch die Lavage in der vorgelegten Arbeit sowohl in der Kontroll- als auch in Interventionsgruppe deutlich an. Ein unterschiedlicher Verlauf zwischen den beiden Gruppen über die Beobachtungszeit zeigte sich dabei nicht. Das inhalierte NO_2^- hatte keinen Einfluss auf das HZV beim Hausschwein.

Diskussion

Zusammengefasst hat NO_2^- in den bei der vorliegenden Arbeit verabreichten Mengen als Zusatz zur Inspirationsluft keinen messbaren Einfluss auf die systemische Hämodynamik.

Es konnte durch die Versuche in der vorliegenden Studie insgesamt gezeigt werden, dass inhaliertes NO_2^- die pulmonale und systemische Hämodynamik nicht beeinflusst und die Oxygenierung der Versuchstiere nicht verbessert. Die 2. Hypothese konnte somit nicht bestätigt werden.

4.3 Methodenkritik

4.3.1 Der Versuchsaufbau der In-vitro-Versuche

Die *In-vitro*-Versuchsreihen wurden an einer Testlunge aus Neopren durchgeführt. Dazu wurde pro Versuchstag dieselbe Testlunge benutzt, ohne dass Reinigungen durchgeführt oder Materialien ersetzt wurden. Obwohl dies vermutlich zu den hohen Standardabweichungen führte, ist insgesamt von einem starken Konzentrationsanstieg auszugehen.

4.3.2 Das Hausschwein als Modellorganismus

Hausschweine haben durch die starke Segmentierung ihrer Lungen einen höheren resistiven Gewebswiderstand und damit geringere Dehnbarkeitseigenschaften als der Mensch. Umso wirksamer ist daher die Surfactant-Depletion im Hausschwein, welche die vergleichsweise eingeschränkte Compliance der Schweinelunge noch weiter senkt.

Während des Experiments wurden die Versuchstiere auf dem Rücken liegend überdruckbeatmet. Dies entspricht nicht der physiologischen Haltung eines Hausschweins, so dass Minderbelüftungen in einigen Lungenabschnitten bis hin zu Atelektasen nicht auszuschließen sind. In diese Bereiche der Lunge können nur geringe Mengen NO_2^- inhalativ gelangen. Die positive Einflussnahme auf Blutgase und Hämodynamik ist damit eingeschränkt.

4.3.3 Das Surfactant-Depletionsmodell

Das Surfactant-Depletionsmodell beim Hausschwein ist ein etabliertes Verfahren zur Erzeugung eines akuten Lungenversagens, das bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen genutzt wurde (7; 8). Ein durch bronchoalveoläre Lavage erzeugter Lungenschaden kann bis zu 24 h die ARDS-Kriterien erfüllen (62). Das Surfactant-Depletionsmodell erzeugt folglich einen stabilen Krankheitszustand, was einen Erkenntnisgewinn über die Intervention erst möglich macht.

Eine pulmonale Hypertension wurde bei Zuckerbraun et al., Hunter et al. und Rix et al. durch Hypoxie erzeugt (7; 8; 18). Dadurch wurden die anatomischen Gegebenheiten der Lungen

Diskussion

vermutlich nicht beeinflusst. Im Gegensatz zu diesem Verfahren verursacht eine Surfactant-Depletion, wie sie in der vorgelegten Arbeit Anwendung fand, starke Veränderungen der anatomischen Gegebenheiten der Lunge. Daher ist es möglich, dass die kurativen Effekte des inhalierten NO_2^- in der vorliegenden Studie weniger zum Tragen kamen. Jedoch ist das ARDS mit anatomischer Schädigung auch in der Realität vorkommend (63) und somit die Surfactant-Depletion mittels bronchoalveolärer Lavage das passendere Modell.

Da die Standardisierung der Depletion ein $\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 \leq 100 \text{ mmHg}$ für mind. 60 min war, wurde beim Übersteigen des Grenzwertes eine erneute Lavage durchgeführt und danach weitere 60 min beobachtet. Erst wenn der $\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 \leq 100 \text{ mmHg}$ 60 min lang nachweisbar war, folgte der nächste Schritt im Versuchsablauf (siehe 2.2.2). Die Folge daraus ist, dass die Versuchstiere eine unterschiedliche Anzahl von Lavagen erhielten. Daher ist das gewählte Verfahren v. a. in Bezug auf die Hämodynamik weniger standardisierbar als das von anderen Arbeitsgruppen verwendete Hypoxieverfahren. Jedoch passt sich die Lavage-Methode individuell an die einzelnen Versuchstiere und damit an die Gegebenheiten bzgl. Gewicht und Kreislauf an.

5 Literaturverzeichnis

1. **Kronfeldt S, Pickerodt PA, Lothar P, Francis RCE, Busch T, Boemke W, Swenson ER.** Sodium Nitrite In Experimental Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS): Effects On Blood Oxygenation And Vascular Resistances In Pigs. *B58 EXPERIMENTAL MODELS OF PULMONARY HYPERTENSION II*. 2014, A3334-A.
2. **Thompson BT, Moss M.** A new definition for the acute respiratory distress syndrome. *Semin Respir Crit Care Med*. 2013, S. 441 - 447.
3. **Moncada S, Palmer RM, Higgs EA.** Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991, Bd. 43, S. 109-142.
4. **Webb A, Bond R, McLean P, Uppal R, Benjamin N, Ahluwalia A.** Reduction of nitrite to nitric oxide during ischemia protects against myocardial ischemia reperfusion damage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004, Bd. 101, S. 13683-13688.
5. **Tripatara P, Patel NSA, Webb A, Rathod K, Lecomte F, Mazzon E, Cuzzocrea S, Yaqoob MM, Ahluwalia A, Thiemermann C.** Nitrite-Derived Nitric Oxide Protects the Rat Kidney against Ischemia/Reperfusion Injury In Vivo: Role for Xanthine Oxidoreductase. *J Am Soc Nephrol*. 2007, S. 570-580.
6. **Duranski MR, Greer JJM, Dejam A, Jaganmohan SHN, Langston W, Patel RP, Yet S-F, Wang X, Kevil CG, Gladwin MT, Lefer DJ.** Cytoprotective effects of nitrite during in vivo ischemia-reperfusion of the heart and liver. *J Clin Invest*. 2005, S. 1232-1240.
7. **Hunter CJ, Dejam A, Blood AB, Shields H, Kim-Shapiro DB, Machado RF, Tarekegn S, Mulla N, Hopper AO, Schechter AN, Power GG, Gladwin MT.** Inhaled nebulized nitrite is a hypoxia-sensitive NO-dependent selective pulmonary vasodilator. *Nat Med*. 2004, S. 1122-1127.
8. **Zuckerbraun BS, Shiva S, Ifedigbo E, Mathier MA, Mollen KP, Rao J, Bauer PM, Choi JJW, Curtis E, Choi AMK, Gladwin MT.** Nitrite Potently Inhibits Hypoxic and Inflammatory Pulmonary Arterial Hypertension and Smooth Muscle Proliferation via Xanthine Oxidoreductase-Dependent Nitric Oxide Generation. *Circulation*. 2009, S. 98-109.
9. **Lachmann B, Robertson B, Vogel J.** In vivo lung lavage as an experimental model of the respiratory distress syndrome. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1980.
10. **Wright RO, Lewander WJ, Woolf AD.** Methemoglobinemia: Etiology, pharmacology, and clinical management. *Ann Emerg Med*. 1999, Bd. 34, S. 646-656.
11. **Herold G und Mitarbeiter.** *Innere Medizin*. Köln : Herold, Gerd, 2015.
12. **Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE.** Acute respiratory distress in adults. *Lancet*. 2, 1967, 7511, S. 319-23.
13. **Murray JF, Matthay MA, Luce JM, Flick MR.** An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. *American Review of Respiratory Disease*. 1988, S. 720–723.
14. **Network, Acute Respiratory Distress Syndrome.** Ventilation with Lower Tidal Volumes as Compared. *N Engl J Med*. 2000, Bd. 342, S. 1301-1308.

15. **Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, LeGall JR, Morris A, Spragg R, Consensus Committee.** Report of the American-European Consensus Conference on acute respiratory distress syndrome: Definitions, mechanisms, relevant outcomes and clinical trial coordination. *Journal of critical care.* 1994, S. 72-81.
16. **Ferguson ND, Frutos-Vivar F, Esteban A, Fernández-Segoviano P, Aramburu JA, Nájera L, Stewart TE.** Acute respiratory distress syndrome: underrecognition by clinicians and diagnostic accuracy of three clinical definitions. *Crit Care Med.* 2005, Bd. 33, 10, S. 2228–2234.
17. **ARDS Definition Task Force, Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky AS.** Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA.* 2012, Bd. 307, 23, S. 2526–2533.
18. **Rix PJ, Vick A, Attkins NJ, Barker GE, Bott AW, Alcorn H, Gladwin MT, Shiva S, Bradley S, Hussaini A, Hoye WL, Parsley EL, Masamune H.** Pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and tolerability of nebulized sodium nitrite (AIR001) following repeat-dose inhalation in healthy subjects. *Clin Pharmacokinet.* 2015, S. 261–272.
19. **Schmidt RF, Lang F.** *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie / herausgegeben von Robert F. Schmidt, Florian Lang.* [Hrsg.] Florian Lang Robert F. Schmidt. 30., neu bearbeitete und aktualisierte Auflage. s.l. : Springer Berlin Heidelberg, 2007, S. 31
20. **Crane BR, Sudhamsu J, Patel BA.** Bacterial Nitric Oxide Synthases. *Annual Review of Biochemistry.* 2010, 79, S. 445-470.
21. **Benjamin N, O'Driscoll F, Dougall H, Duncan C, Smith L, Golden M.** Stomach NO synthesis. *Nature.* 1994, 368, S. 502-502.
22. **Zweier JL, Wang P, Samouilov A, Kuppusamy P.** Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. *Nat Med.* 1995, S. 804-809.
23. **Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT.** The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2008, S. 156-167.
24. **Van Faassen EE, Bahrami S, Feelisch M, Hogg N, Kelm M, Kim-Shapiro DB, Kozlov AV, Li H, Lundberg JO, Mason R, Rassaf T, Shiva S, Vanin AF, Weitzberg E, Zweier JL, Gladwin MT.** Nitrite as regulator of hypoxic signaling in mammalian physiology. *Med Res Rev.* 2009, Bd. 29, S. 683-741.
25. **Cosby K, Partovi KS, Crawford JH, Patel RP, und Reiter, CD, Martyr S, Yang BK, Waclawiw M, Zalos G, Xu X, Huang KT, Shields H, Kim-Shapiro D, Schechter A.** Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med.* 2003, S. 1498-1505.
26. **Gladwin MT, Schechter AN, Kim-Shapiro DB, Patel RP, Hogg N, Shiva S, Cannon RO, Kelm M, Wink DA, Espey MG, Oldfield EH, Pluta RM, Freeman BA, Lancaster JR, Feelisch M, Lundberg JO.** The emerging biology of the nitrite anion. *Nat Chem Biol.* 2005, Bd. 1, S. 308-314.
27. **Moncada S, Higgs A.** Mechanisms of Disease - the L-Arginine Nitric-Oxide Pathway. *N Engl J Med.* 329, 1993, 27, S. 2002-12.
28. **Joshi MS, Ferguson TB, Han TH, Hyduke DR, Liao JC, Rassaf T, Bryan N, Feelisch M, Lancaster JR.** Nitric oxide is consumed, rather than conserved, by reaction with oxyhemoglobin under physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002, S. 10341-10346.

29. **Wright RM, Vaitaitis GM, Wilson CM, Repine TB, Terada LS, Repine JE.** cDNA cloning, characterization, and tissue-specific expression of human xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993, Bd. 90.
30. **Li H, Samouilov A, Liu X, Zweier JL.** Characterization of the Effects of Oxygen on Xanthine. *JBC.* 2004, Bd. 279, S. 16939-16946.
31. **Terada LS, Guidot DM, Leff JA, Willingham IR, Hanley ME, Piermattei D, Repine JE.** Hypoxia injures endothelial cells by increasing endogenous xanthine oxidase activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992, Bd. 89, S. 3362-3366.
32. **The Acute Respiratory Distress Syndrome, Network.** Ventilation with Lower Tidal Volumes as Compared with Traditional Tidal Volumes for Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med.* 2000, S. 1301-1308.
33. **Li H, Cui H, Kundu TK, Alzawahra W, Zweier JL.** Nitric Oxide Production from Nitrite Occurs Primarily in Tissues Not in the Blood: Critical Role of Xanthine Oxidase and Aldehyde Oxidase. *JBC.* 2008, Bd. 283, S. 17855-17863.
34. **Casey DB, Badejo AM, Dhaliwal JS, Murthy SN, Hyman AL, Nossaman BD, Kadowitz PJ.** Pulmonary vasodilator responses to sodium nitrite are mediated by an allopurinol-sensitive mechanism in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009, S. H524-533.
35. **Jung K-H, Chu K, Ko S-Y, Lee S-T, Sinn D-I, Park D-K, Kim J-M, Song E-C, Kim M, Roh J-K.** Early Intravenous Infusion of Sodium Nitrite Protects Brain Against In Vivo Ischemia-Reperfusion Injury. *Stroke.* 2006, S. 2744-2750.
36. **Ware LB, Matthay MA.** The Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med.* 2000, S. 1334-1349.
37. **Phua J, Badia JR, Adhikari NKJ, Friedrich JO, Fowler RA, Singh JM, Scales DC, Stather DR, Li A, Jones A, Gattas DJ, Hallett D, Tomlinson G, Stewart TE, Ferguson N.** Has Mortality from Acute Respiratory Distress Syndrome Decreased over Time?: A Systematic Review. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009, S. 220-227.
38. **Bein T, Grasso S, Moerer O, Quintel M, Guerin C, Deja M, Brondani A, Mehta S.** The standard of care of patients with ARDS: ventilatory settings and rescue therapies for refractory hypoxemia. *Intensive Care Med.* 2016, S. 699–711.
39. **Striebel HW.** *Die Anästhesie.* Stuttgart : Schattauer GmbH, 2014. S. 703-705, 995-999.
40. **Yu B, Ichinose F, Bloch DB, Zapol WM.** Inhaled nitric oxide. *British Journal of Pharmacology.* 2019, 176, S. 246-255.
41. **Creagh-Brown B, Griffiths M, Evans T.** Bench-to-bedside review: Inhaled nitric oxide therapy in adults. *Crit Care.* 2009, S. 221-229.
42. **Kuebler WM, Uhlig U, Goldmann T, Schael G, Kerem A, Exner K, Martin C, Vollmer E, Uhlig S.** Stretch Activates Nitric Oxide Production in Pulmonary Vascular Endothelial Cells In Situ. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003, S. 1391-1398.
43. **Calvert JW, Lefer DJ.** Clinical translation of nitrite therapy for cardiovascular diseases. *Nitric Oxide.* 2010, S. 91-97.
44. **Aerogen.** Aerogen Solo.: *Ein Vernebler auf Basis von Schwingmembran-Technologie für die Medikamentenapplikation bei Patienten im gesamten Krankenhaus.* [Online] 01. 04. 2020. <https://www.aerogen.com/de/aerogen-solo-2/>.

45. **Kaisers U, Busch T, Wolf S, Lohbrunner H, Wilkens K, Hocher B, Boemke W.** Inhaled endothelin A antagonist improves arterial oxygenation in experimental acute lung injury. *Intensive Care Med.* 2000, Bd. 26, S. 1334-1342.
46. **Russ M, Kronfeldt S, Boemke W, Busch T, Francis RCE, Pickerodt PA.** Lavage-induced Surfactant Depletion in Pigs As a Model of the Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS). *J Vis Exp.* 2016.
47. **Pinder AG, Rogers SC, Khalatbari A, Ingram TE, James PE.** The Measurement of Nitric Oxide and its Metabolites in Biological Samples by Ozone-Based Chemiluminescence. *Methods Mol Biol.* 2009, Bd. 476, S. 10-27.
48. **Peterson BT, Brooks JA, Zack AG.** Use of microwave oven for determination of postmortem water volume of lungs. *J Appl Physiol.* 1982, Bd. 52, 6, S. 1661-1663.
49. **Lundberg JO, Weitzberg E, Lundberg JM, Alving K.** Intragastric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air. *Gut.* 1994, S. 1543-1546.
50. **Jansson EA, Huang L, Malkey R, Govoni M, Nihlén C, Olsson A, Stensdotter M, Petersson J, Holm L, Weitzberg E, Lundberg JO.** A mammalian functional nitrate reductase that regulates nitrite and nitric oxide homeostasis. *Nat Chem Biol.* 2008, Bd. 4, 7, S. 411-417.
51. **Rossaint R, Falke KJ, Lopez F, Slama K, Pison U, Zapol WM.** Inhaled Nitric Oxide for the Adult Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med.* 1993, S. 399-405.
52. **Monsalve-Naharro JÁ, Domingo-Chiva E, García Castillo S, Cuesta-Montero P, Jiménez-Vizuet JM.** Inhaled Nitric Oxide in Adult Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome. *Farm Hosp.* 41, 2017, 2, S. 292-312.
53. **Heinonen, E, Högman, M und Meriläinen, P.** Theoretical and experimental comparison of constant inspired concentration and pulsed delivery in NO therapy. *Intensive Care Med.* 2000, 26, S. 1116±1123.
54. **Schultz J, Andersen A, Gade IL, Kjaergaard B, Nielsen-Kudsk JE.** Riociguat, Sildenafil and Inhaled Nitric Oxide Reduces Pulmonary Vascular Resistance and Improves Right Ventricular Function in a Porcine Model of Acute Pulmonary Embolism. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care.* 2019, DOI:10.1177/2048872619840772.
55. **Clark RH, Kueser TJ, Walker MJ, Southgate WM, Huckaby JL, Perez JA, Roy BJ, Keszler M, Kinsella JP.** Low-dose nitric oxide therapy for persistent pulmonary hypertension of the newborn. Clinical Inhaled Nitric Oxide Research Group. *N Engl J Med.* 2000, S. 469-474.
56. **Roberts JD, Fineman JR, Morin FC, Shaul PW, Rimar S, Schreiber MD, Polin RA, Zwass MS, Zayek MM, Gross I, Heymann MA, Zapol WM.** Inhaled nitric oxide and persistent pulmonary hypertension of the newborn. The Inhaled Nitric Oxide Study Group. *N Engl J Med.* 1997, S. 605-610.
57. **Schreiber MD, Gin-Mestan K, Marks JD, Huo D, Lee G, Srisuparp P.** Inhaled nitric oxide in premature infants with the respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 2003, S. 2099-2107.
58. **Group, Neonatal Inhaled Nitric Oxide Study.** Inhaled nitric oxide in full-term and nearly full-term infants with hypoxic respiratory failure. *N Engl J Med.* 1997, Bd. 336, 6, S. 597-604.

59. **Clutton-Brock J.** Two cases of poisoning by contamination of nitrous oxide with higher oxides of nitrogen during anaesthesia. *Brit. J. Anaesth.* 1967, Bd. 39, S. 388-392.
60. **Greenbaum R, Bay J, Hargreaves MD, Kain ML, Kelman GR, Nunn JF, Prys-Roberts C, Siebold K.** Effects of higher oxides of nitrogen on the anaesthetized dog. *British journal of anaesthesia.* 1967, 39, S. 393-404.
61. **Nguta JM.** Nitrate Poisoning due to Ingestion of Cabbages (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) (*Brassicaceae*) in Kitui County, Kenya. *ScientificWorldJournal.* 2019, S. 8716518.
62. **Muellenbach RM, Kredel M, Zollhoefer B, Johannes A, Kuestermann J, Schuster F, Schwemmer U, Wurmb T, Wunder C, Roewer N, Brederlau J.** Acute respiratory distress induced by repeated saline lavage provides stable experimental conditions for 24 hours in pigs. *Exp Lung Res.* 2009, Bd. 35, 3, S. 222-33.
63. **Schulte am Esch J, Bause H, Kochs E, Scholz J, Standl T, Werner C.** *Anästhesie Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie.* 4. Auflage. Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2011. S. 446-448. ISBN : 9783131926845.

6 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Philipp Lothar, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Der Einfluss von inhaliertem Nitrit auf die durch Surfactant-Depletion induzierte akute Lungenschädigung (The influence of inhaled nitrite on induced severe lung injury caused by surfactant depletion)* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichtet.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

Unterschrift

7 Anteilerklärung an erfolgten Publikationen

Philipp Lothar hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Pickerodt PA, Lothar P, Francis RCE, Busch T, Boemke W, Swenson ER. (2013, Februar/März). *Inhaled sodium nitrite in acute respiratory distress syndrome (ARDS) in pigs*. Poster auf dem 18th International Hypoxia Symposia, 26.02.-02.03.2013, Lake Louise, Alberta, Kanada.

Beitrag im Einzelnen: Mitentwurf des Konzeptes, Vorbereitung und Durchführung der Versuche, Datenaufbereitung und grafische Darstellung

Publikation 2: Kronfeldt S, Pickerodt PA, Lothar P, Francis RCE, Busch T, Boemke W, Swenson ER. (2014, Mai). *Sodium Nitrite In Experimental Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS): Effects On Blood Oxygenation And Vascular Resistances In Pigs*. B58 EXPERIMENTAL MODELS OF PULMONARY HYPERTENSION II. 2014, A3334-A. Poster bei der American Thoracic Society (ATS) International Conference, 16.-21.05.2014, San Diego, Kalifornien, USA.

Beitrag im Einzelnen: Vorbereitung und Durchführung der Versuche

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

Publikationen

8 Lebenslauf

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

9 Publikationen

9.1 Artikel

Pickerodt PA, Kronfeldt S, Russ M, Gonzalez Lopez A, Lothar P, Steiner E, Vorbrodtk K, Busch T, Boemke W, Francis RCE and Swenson ER. Carbonic anhydrase is not a relevant nitrite reductase or nitrous anhydrase in the lung. *J Physiol*. 2018, doi:10.1113/JP275894

9.2 Poster/ Abstracts

Pickerodt PA, Lothar P, Francis RCE, Busch T, Boemke W, Swenson ER. *Inhaled sodium nitrite in acute respiratory distress syndrome (ARDS) in pigs*. Poster auf dem 18th International Hypoxia Symposia, 26.02.-02.03.2013, Lake Louise, Alberta, Kanada.

Kronfeldt S, Pickerodt PA, Lothar P, Francis RCE, Busch T, Boemke W, Swenson ER. *Sodium Nitrite In Experimental Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS): Effects On Blood Oxygenation And Vascular Resistances In Pigs*. B58 EXPERIMENTAL MODELS OF PULMONARY HYPERTENSION II. 2014, A3334-A. Poster bei der American Thoracic Society (ATS) International Conference, 16.-21.05.2014, San Diego, Kalifornien, USA.

Kronfeldt S, Lothar P, Francis RCE, Busch T, Boemke W, Pickerodt PA, Swenson ER. *Effects of low dose intravenous sodium nitrite on arterial oxygenation and hemodynamics in experimental acute respiratory distress syndrome (ARDS)*. *Intensive Care Medicine Experimental*. 2015;3(Suppl 1): A574. Poster bei LIVES 2015, the 28th Annual Congress of the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), 03-07.10.2015, Berlin, Deutschland.

Pickerodt PA, Kronfeldt S, Vorbrodtk K, Lothar P, Francis RCE, Busch T, Boemke W, Swenson ER. *Carbonic Anhydrase Inhibition Does Not Enhance Nitrite To Nitric Oxide Reduction During Alveolar Hypoxia In Pigs*. Poster auf dem 19th International Hypoxia Symposia, 03.-08.03.2015, Lake Louise, Alberta, Kanada.

Pickerodt PA, Kronfeldt S, Russ M, Vorbrodtk K, Lothar P, Busch T, Boemke W, Swenson ER, Francis RCE. *Carbonic Anhydrase Is Not a Relevant Nitrite Reductase in the Lung*. B53 PHOUND IN TRANSLATION. 2016: A3891-A3891. Poster bei der American Thoracic Society (ATS) International Conference, 13.-18.05.2016, San Francisco, Kalifornien, USA.

10 Danksagung

Ich möchte mich besonders bei Herrn Dr. med. Philipp A. Pickerodt für seine Betreuung und die gute Zusammenarbeit bedanken. Er weckte mein Interesse für die medizinische Forschung und brachte mir bei, was es bedeutet wissenschaftlich zu arbeiten. Ich danke dabei sehr für die Unterstützung bei den Versuchsplanungen und –durchführungen, für die Durchsicht der Manuskripte und Anmerkungen zur stetigen Verbesserung sowie für die freundschaftliche Verbundenheit, die sich über die Jahre entwickelt hat.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Roland C. E. Francis als verantwortlicher Hochschullehrer für die Unterstützung und regelmäßige Motivation beim Vorantreiben dieser Arbeit sowie für seine konstruktive Kritik.

Außerdem danke ich Herrn Dr. med. Martin Ruß, Herrn Prof. Willehad Boemke und Herrn Dr. med. Mahdi Taher für Hinweise und Ratschläge, die erst so manchen Stein ins Rollen brachten.

Ich möchte mich bei Birgit Brandt und Sabine Molling für die Hilfe bei der Versuchsdurchführung sowie der Anleitung für die Labortätigkeiten bedanken.

Zusätzlich danke ich Herrn Sebastian Kronfeldt für die gemeinsame Versuchsvorbereitung und –durchführung sowie für die stets gute und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt weiterhin dem Tierpflegepersonal der FEM für die Pflege der Versuchstiere.

Ich danke meinen Eltern, die mich stets förderten sowie meiner Schwester und meinem Schwager für ihre offenen Ohren und Hilfe.

Abschließend danke ich meiner Verlobten Inga Ubben für ihren stetigen Zuspruch, ihre kritischen Anmerkungen und ihre Unterstützung. Die Fertigstellung dieser Arbeit wäre ohne sie nur schwer möglich gewesen.