

Aus dem Institut für Physiologie  
der Charité – Universitätsmedizin Berlin

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

# **Quantitative Analyse des Totraums unter mechanischer Beatmung**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Hannah Theresa Nickles  
Tierärztin  
aus Blaubeuren

Berlin 2015

Journal-Nr.: 3774

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Prof. Dr. Dr. Petra Reinhold  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Wolfgang M. Kübler  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Christa Thöne-Reineke

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

mice, animal models, ventilation, lung function, acute respiratory distress  
syndrome, inflammation

Tag der Promotion: 18.05.2015

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen  
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über  
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-644-9

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2015**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder  
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in  
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,  
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch  
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der  
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von  
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written  
authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2015

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

[verlag@menschundbuch.de](mailto:verlag@menschundbuch.de) – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

Meinem Großvater

*Wenn man zu wissen glaubt, was man sieht,  
sollte man noch einmal genauer hinschauen.*

Richard Powers in „Das größere Glück“

Fischer Verlag, Frankfurt am Main, 2010

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	7
2. Übersicht zum Stand der Wissenschaft.....	9
2.1. Die Anatomie der oberen Atemwege und der Lunge bei Maus und Mensch.....	9
2.1.1. Die luftleitenden Wege.....	9
2.1.2. Die Lunge.....	10
2.2. Die Physiologie der Atmung.....	12
2.2.1. Die Bedeutung des Totraums.....	12
2.2.2. Die Atmungsmechanik unter Spontanatmung.....	14
2.2.3. Die Atmungsmechanik unter mechanischer Beatmung.....	15
2.3. Pathologische Aspekte der Atmung.....	17
2.3.1. Der akute Lungenschaden und das akute progressive Lungenversagen.....	17
2.3.2. Der beatmungsassoziierte Lungenschaden des Menschen.....	19
2.3.3. Der experimentell hervorgerufene beatmungsinduzierte Lungenschaden.....	21
2.4. Beatmungsverfahren in der Klinik und im Experiment.....	21
2.5. Begründung für die Dissertation.....	25
2.6. Ziel der Dissertation.....	26
3. Tiere, Material und Methoden.....	27
3.1. Versuchstiere.....	27
3.1.1. Mäuse.....	27
3.1.2. Schweine.....	28
3.2. Material und Methoden.....	28
3.2.1. Anästhesie und Beatmung.....	28
3.2.2. Volumen-Computertomographie mit Flächendetektoren.....	29
3.2.3. Intravitalmikroskopie.....	31

3.2.4.	Kapnographie .....	32
3.2.5.	Atemwegsdruck und Berechnung der Compliance .....	33
3.2.6.	Histologie .....	34
3.2.7.	Isolierte Atemwege im Organbad .....	35
3.3.	Studiendesign und Protokolle .....	36
3.3.1.	Protokoll 1: Kontinuierliche Beatmung während der Bildgebung im vCT .....	36
3.3.2.	Protokoll 2: Intermittierende Beatmung während der Bildgebung im vCT .....	38
3.3.3.	Protokoll 3: Kapnographie zur Messung des funktionellen Totraums .....	39
3.3.4.	Protokoll 4: Intravitalmikroskopie zur Messung der alveolären Aufdehnung .....	40
3.3.5.	Protokoll 5: Beatmung isolierter Atemwege im Organbad .....	40
3.4.	Statistik .....	41
4.	Ergebnisse .....	42
4.1.	Mechanische Beatmung führt bei Mäusen zu einer reversiblen, nicht-linearen Aufdehnung der oberen Atemwege .....	42
4.1.1.	Die Aufdehnung der oberen Atemwege im vCT .....	42
4.1.1.1.	Die Aufdehnung unter kontinuierlicher Beatmung im vCT .....	44
4.1.1.2.	Die Aufdehnung unter intermittierender Beatmung im vCT .....	46
4.1.1.3.	Die Lokalisation der Aufdehnung im Bronchialbaum im vCT .....	47
4.1.1.4.	Die Belüftung des Lungenparenchyms im vCT .....	49
4.1.2.	Die Aufdehnung subpleuraler Alveolen mittels Intravitalmikroskopie .....	50
4.1.3.	Die funktionelle Totraummessung mittels Kapnographie .....	51
4.1.4.	Der mittlere Atemwegsdruck und die Compliance .....	52
4.2.	Die Aufdehnung der Atemwege führt zu Hämorrhagien und proinflammatorischer Reaktion .....	54
4.2.1.	Histologische Untersuchung von murinen Lungen .....	55
4.2.2.	Untersuchung der isolierten und beatmeten Trachea im Organbad .....	57

4.3. Die elastischen Eigenschaften der isolierten Atemwege von Maus und Schwein weisen Homologien auf .....	61
5. Diskussion.....	64
5.1. Die Beurteilung der verwendeten Methoden.....	65
5.2. Die mechanische Beatmung führt zur Aufdehnung der oberen Atemwege der Maus ....	67
5.3. Die oberen Atemwege übernehmen eine Pufferfunktion in der Atmungsphysiologie....	69
5.4. Die Aufdehnung der Atemwege trägt zur Entstehung des beatmungsinduzierten Lungenschadens bei.....	73
5.5. Übertragbarkeit der Ergebnisse auf größere Säugetiere und den Menschen.....	76
5.6. Physiologische und klinische Relevanz in der Veterinär- und Humanmedizin .....	77
6. Zusammenfassung.....	81
7. Summary .....	83
8. Literaturverzeichnis .....	85
9. Anhang .....	96
9.1. Abkürzungsverzeichnis .....	96
9.2. Abbildungsverzeichnis .....	98
9.3. Publikationsverzeichnis .....	99
Danksagung .....	101
Selbstständigkeitserklärung .....	103

## 1. Einleitung

Die mechanische Beatmung gehört heute zu den Standardverfahren bei der Behandlung intensivmedizinisch versorgter Patienten und ist in vielen Fällen eine lebenserhaltende Maßnahme. Dies gilt sowohl für primär die Lunge und den Gasaustausch betreffende Erkrankungen als auch für Patienten, die aufgrund anderer Ursachen einen ungenügenden Gasaustausch haben. Besonders bei einer notwendigen Langzeitbeatmung ist nachgewiesen, dass die Beatmung selbst einen schädlichen Einfluss auf die Gesundheit des Patienten hat und einen Lungenschaden hervorrufen oder einen bereits bestehenden Schaden der Lunge verschlimmern kann (2; 4; 5; 12; 42; 57).

Während ebenso durch die mechanische Beatmung ausgelöste Begleitsymptome wie die beatmungsassoziierte Pneumonie inzwischen ursächlich aufgeklärt und zumindest teilweise therapierbar sind, ist die Pathogenese des beatmungsinduzierten Lungenschadens nach wie vor nicht abschließend entschlüsselt und eine Therapie gestaltet sich durch die paradoxe Einheit von Ursache und Behandlung als äußerst schwierig. Obgleich die mechanische Beatmung einerseits bei einem (beatmungsinduzierten) Lungenschaden die lebensnotwendige Versorgung mit Sauerstoff und die Elimination von Kohlenstoffdioxid gewährleisten kann, birgt sie immer auch das Risiko einer Exazerbation durch die zusätzliche Schädigung des empfindlichen Lungengewebes.

Um diesen *Circulus vitiosus* zu durchbrechen, wurde in den letzten Jahren in vielen Studien untersucht, welche Faktoren eine mechanische Beatmung lungenschonender gestalten können. Eine umfassende Untersuchung wurde hierzu vom *Acute Respiratory Distress Syndrome- Netzwerk* durchgeführt (1) und empfiehlt eine Absenkung des Tidalvolumens, also des Atemzugvolumens, von den zuvor üblichen 12 ml/kg auf 6 ml/kg Körpergewicht (KG). Dadurch konnte die beatmungsinduzierte Sterblichkeit in Krankenhäusern von 39,8% auf 31% herabgesetzt werden. Für die klinische Maßgabe, einen ausreichenden Gasaustausch sicherzustellen, genügt diese kleinvolumige Beatmung allerdings oft nicht und die behandelnden Ärzte sind gezwungen, andere Beatmungsregime anzuwenden (17; 109). Als eine Reaktion auf die anhaltend schädigende Form der mechanischen Beatmung gibt es aktuell Untersuchungen an einigen hochspezialisierten Kliniken, die ausgewählte Intensivpatienten nur noch mit einem sehr geringen Tidalvolumen von etwa 3 ml/kg KG ventilieren und die CO<sub>2</sub>-Eliminierung außerhalb der Lunge mittels extrakorporaler Membranoxygenierung sicherstellen (10; 103). Diese hochintensive Therapie erweist sich zwar als lungenprotektiver, ist aber aufgrund des aufwendigen Verfahrens noch nicht

als Standardbeatmung möglich. Die Suche nach einem lungenschonenden Beatmungskonzept ist also noch nicht abgeschlossen und bedarf dringend weiterer Forschung.

Die Pathogenese des beatmungsinduzierten Lungenschadens wird aktuell vor allem einer Überdehnung der Alveolen zugeschrieben. Die bisherigen Ansätze zur Verbesserung der mechanischen Beatmung und medikamentösen Intervention zielten deswegen auch größtenteils auf die Schonung und Unterstützung dieser empfindlichen Strukturen des Respirationstraktes ab (4). In der hier vorliegenden Studie wurde der bislang wenig beachtete, luftleitende Abschnitt des Bronchialsystems, also die konduktiven Atemwege, als ein noch unbekannter Entstehungsort des beatmungsinduzierten Lungenschadens untersucht mit dem Fernziel, neue lungenprotektive Beatmungskonzepte zu entwickeln beziehungsweise die bereits bestehenden Strategien zu verbessern. Die Fragestellung, mit der sich diese Arbeit beschäftigt, umfasst die Punkte, i) inwieweit die luftleitenden Atemwege von der mechanischen Beatmung beeinflusst werden und ii), welche Folgen diese Einflüsse für die Entstehung des beatmungsinduzierten Lungenschadens haben.

Mittels des Prototyps eines hochauflösenden Volumen-Computertomographen mit Flächendetektoren (vCT) war es in einer DFG-geförderten Kooperation mit dem Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg erstmals möglich, die Atemwege im murinen Standardmodell für den beatmungsinduzierten Lungenschaden darzustellen und quantitativ zu untersuchen. Diese Studien wurden durch weitere Methoden wie Kapnographie, Histologie, Untersuchungen im Organbad und die Analyse von Zytokinen ergänzt. Es gelang dadurch, die Effekte der mechanischen Beatmung auf die Atemwege und die somit verursachte Entzündungsreaktion in den Atemwegen der Maus erstmals darzustellen und zu quantifizieren. Anhand präliminärer Daten an porcinen Segmentbronchien konnte ein erster Transfer der Ergebnisse auf die Atemwege größerer Säugetiere gemacht werden und somit auch ein erster Schritt für eine Übertragung der Beobachtungen in die Humanmedizin.



## 2. Übersicht zum Stand der Wissenschaft

### 2.1. Die Anatomie der oberen Atemwege und der Lunge bei Maus und Mensch

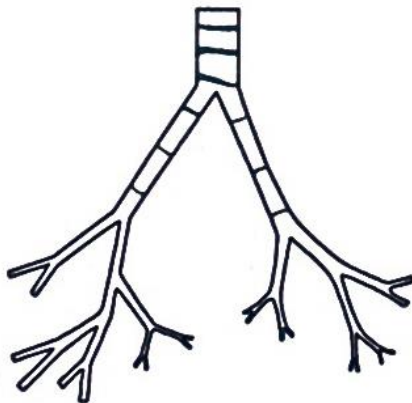
Der Atemtrakt ist bei allen Säugetieren homolog aufgebaut. Grundsätzlich werden ein luftleitender Bereich und ein Bereich des Gasaustausches unterschieden. Der luftleitende Bereich umfasst den Nasen-Rachenraum, die Luftröhre (Trachea) und die immer kleiner werdenden Bronchien bis zu den *Bronchioli terminales* (49) und wird als anatomischer Totraum beschrieben. Über die zuleitenden Wege gelangt die Atemluft in die gasaustauschenden Lungenbläschen (Alveolen) hinein und ebenso wieder hinaus.

#### 2.1.1. Die luftleitenden Wege

Während sich der Nasen-Rachenraum an die Bedürfnisse (Physiognomie, Geruchssinn, Sprache) der jeweiligen Spezies angepasst hat, liegt die Trachea einheitlich bei Maus und Mensch *in situ* cranial in einer bindegewebigen Hülle zwischen der Halsmuskulatur, dem Ösophagus und den paarigen großen Gefäßen (*A. carotis communis*, *V. jugularis interna*) sowie dem *Nervus vagus*. Gemeinsam mit der Speiseröhre tritt sie durch die *Apertura thoracica* in die Brusthöhle und endet bei der Maus hier mit der Bifurkation in die beiden freiliegenden Hauptbronchien (53), die über den Lungenhilus in die Lunge eintreten. Die beiden Hauptbronchien (*Bronchi principales*) des Menschen geben zuvor noch die beiden *Bronchi lobares* für die jeweiligen Oberlappen frei (7) und treten dann ebenso in die Lunge ein.

Mikroskopisch besteht die *Tunica mucosa* auf der Luftseite der Trachea aus respiratorischem Epithel mit entsprechenden Drüsen und Becherzellen, wobei die Maus kaum Mukuszellen aufweist (44). Die *Tunica adventitia* stellt mit ihrem lockeren Bindegewebe die Verbindung zum Mediastinum her. Die dazwischengelegene *Tunica fibromusculocartilaginea* beinhaltet die charakteristischen C-förmigen Knorpelspangen (*Cartilagine tracheales*), die über die Länge der Trachea mit Kollagenfasergeflechten (*Ligamenta anularia*) verbunden sind. Die Knorpelspangen sind an der dorsalen Seite der Trachea über den quer verlaufenden *M. trachealis* verbunden und sind so einerseits stets angespannt, andererseits bei Bedarf (Husten, raumforderndes Schlucken in der Speiseröhre) im Durchmesser flexibel (7). Während beim Menschen die mikroskopische Anatomie in der Trachea und den Hauptbronchien nahezu gleich ist, weisen die Atemwege der Maus bereits in der distalen Trachea keine Knorpelspangen, sondern vielmehr Knorpelscherben

auf, die weiter distal aber spätestens nach den Hauptbronchien gänzlich fehlen (45). Der Bronchialbaum des Menschen verzweigt sich in dichotomer Weise in etwa 23 Generationen (107) bis zu den *Bronchioli terminales* und weist bis in die kleinsten Bronchiolen (dort vornehmlich an den Bifurkationen) zarter werdende Knorpelspangen auf. Der Bronchialbaum der Maus hingegen folgt knorpellos einer monopodialen Verzweigung (45) über 13-17 Generationen (44) (siehe Abbildung 1).



Dichotomes, symmetrisches Verzweigungsmuster, Mensch



Monopodiales, asymmetrisches Verzweigungsmuster, Maus

**Abbildung 1: Bronchioläres Verzweigungsmuster von Mensch und Maus im Vergleich**

Die Abbildung ist angelehnt an (72) und zeigt die Unterschiede im Verzweigungsmuster von Mensch und Maus. Während sich die Bronchien im Menschen paarweise, aber nicht zwingend im gleichen Durchmesser, verjüngen, gehen bei der Maus mehrere wesentlich kleinere Bronchien von einer Hauptachse ab.

**2.1.2. Die Lunge**

Makroskopisch ist die rechte Lunge des Menschen in drei Lappen (*Lobi pulmonis*), die linke Lunge in zwei Lappen eingeteilt, die sich wiederum in kleinere keilförmige Segmente unterteilen lassen, die von den entsprechenden Segmentbronchien (und Segmentgefäßen) versorgt werden (7). Die nächstkleinere Unterteilung sind die Subsegmente, dann die *Lobuli*. Diese werden durch mehrere *Azini* dargestellt, die beim Menschen über *Bronchioli respiratorii* mit dem Bronchialbaum verbunden sind (44; 49). Bei der Maus gibt es keine respiratorischen Bronchiolen (50), hier schließt der Alveolen-Cluster (*Saccus alveolaris*), eine traubenförmige Anordnung mehrerer Alveolen, direkt mit dem gemeinsamen Ausführungsgang (*Ductus alveolaris*) an die terminalen Bronchiolen.

Auch makroskopisch unterscheidet sich die murine Lunge deutlich: Hier findet man rechts vier Lappen, links dagegen nur einen.

Während die Größe der Lunge stark abhängig von der Körpergröße ist, unterliegt die Größe der gasaustauschenden Oberfläche dem Bedarf an Sauerstoff der jeweiligen Spezies. Dieser Grundumsatz kann als Sauerstoffbedarf pro kg Körpergewicht ausgedrückt werden. Je höher der Grundumsatz liegt, desto kleiner muss der Alveolendurchmesser sein und dementsprechend größer wird die relative Oberfläche. So ist die Alveole der Maus zwischen 38 und 69  $\mu\text{m}$  groß, die des Menschen hingegen misst etwa 200  $\mu\text{m}$  im Durchmesser (47). Die Zahl der Alveolen wird beim Menschen auf etwa 150-1800 Mio. geschätzt (33). Die Alveolen werden von Typ I und Typ II Pneumozyten ausgekleidet. Typ I Alveolarepithelzellen sind dünne Deckzellen, während Typ II Zellen bildlich als Nischenzellen bezeichnet werden und dort Surfactant, eine grenzflächenaktive Substanz, produzieren. Dieser Phospholipidfilm setzt die Oberflächenspannung der Alveolen herab und verhindert ihr Kollabieren. Zwischen den Alveolen befinden sich die bindegewebigen *Septa interalveolaria*, die einerseits das weitverzweigte Kapillarnetz beherbergen, andererseits mit ihrem dichten elastischen Fasernetz für die Eigenelastizität der Lunge verantwortlich sind. Auch einige der Immunzellen sind hier lokalisiert. Die Blut-Luft-Schranke, also die Stelle des Gasaustausches, setzt sich aus dem Gefäßendothel, den verschmolzenen Basalmembranen der Kapillarwand und der Alveolarzellen, dem Alveolarepithel und der epithelialen Oberflächenschicht, bestehend aus einem dünnen Flüssigkeitsfilm mit Surfactant, zusammen (7). Sie ist im Mittel bei der Maus wesentlich dünner (0,02  $\mu\text{m}$  bis 0,32  $\mu\text{m}$  (45)) als beim Menschen (0,5  $\mu\text{m}$  (7) bis 0,62  $\mu\text{m}$  (45)). Der Unterschied beruht auf den eingelagerten Bindegewebsfasern in den interalveolaren Septen im humanen Lungengewebe (31).

Der Sauerstoffbedarf des Lungengewebes selbst wird beim Menschen über die *Vasa privata*, die dem großen Kreislauf zugeordnet sind, sichergestellt. Diese Eigenversorgung fehlt bei der murinen Lunge gänzlich (100).

Als *Vasa publica* hingegen werden die Gefäße bezeichnet, die den Gesamtorganismus mit Sauerstoff versorgen. Die Gefäßversorgung entspricht im Aufbau der Verzweigung des Trachealbaums. Aus dem *Truncus pulmonalis* gehen die beiden *Aa. pulmonales* hervor, die das sauerstoffarme Blut transportieren und jeweils durch den Hilus in die rechte oder linke Lunge gelangen. Sie lagern sich bis zur kapillären Austauschstrecke der Alveolen den luftleitenden Atemwegen im peribronchialen Bindegewebe an. Da die arteriellen Gefäße keine

(anastomosierenden) Äste abgeben, gelten sie als funktionelle Endarterien (7), mit dem bekannten Risiko der Lungenembolie. Das im umfassenden Kapillarnetz der Lunge mit Sauerstoff angereicherte und vom CO<sub>2</sub> entlastete Blut gelangt über die sich vereinenden und dadurch größer werdenden, klappenlosen Venen in die in den interlobulären Septen liegenden *Vv. pulmonales*. Diese vereinigen sich zu größeren Venenstämmen, die durch das Lungenhilum in das Mediastinum treten und so in den linken Vorhof des Herzens gelangen. Die Durchblutung und damit die Gasaustauschleistung der Lunge kann über arteriovenöse Anastomosen reguliert werden, sodass nicht immer alle Alveolen maximal umströmt werden. Steigt die körperliche Beanspruchung und damit der Sauerstoffbedarf, werden diese Anastomosen geschlossen und das optimale Verhältnis von Belüftung und Durchblutung kann wieder erreicht werden (7; 105).

## **2.2. Die Physiologie der Atmung**

Die Hauptaufgabe der Lunge ist der Gasaustausch von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid zwischen der Blutseite und der Luftseite der Alveolarbarriere. Die Voraussetzung für diesen lebenswichtigen Prozess ist die abwechselnde Be- und Entlüftung der Alveolen. Damit es an der feinen Barriere zwischen Blut und Luft nicht zu Verschmutzungen oder Infektionen durch das äußere Milieu kommt, muss die Luft zunächst konditioniert, also gereinigt, angewärmt und befeuchtet werden, in Richtung der Alveolen verbracht und entsprechend über die gesamte Lunge verteilt werden. Diese Aufgaben übernehmen die luftleitenden Wege. Da die Lunge selbst keine aktiven Atembewegungen ausführen kann sondern nur passiv den Bewegungen von Zwerchfell und Thorax oder entsprechenden Volumenänderungen bei der mechanischen Beatmung folgen kann und so auch mit letzterem einhergehenden und potentiell schädigenden mechanischen Einflüssen ausgeliefert ist, ist das Verstehen der physiologischen Atmungsmechanik von großer Bedeutung für die Entwicklung protektiver Beatmungskonzepte.

### **2.2.1. Die Bedeutung des Totraums**

Neben den weiterführenden Aufgaben des Totraums wie der Aufnahme von Riechstoffen und der Weiterleitung dieser an die Geruchsrezeptoren oder der Lauterzeugung beziehungsweise der Stimmbildung (33) hat der Totraum für die Physiologie der Atmung entscheidende Aufgaben. In den konduktiven Atemwegen wird die Atemluft zunächst für die Lungen konditioniert. Die Reinigung findet bereits grob über die Haare in der Nase statt und setzt sich am Flimmerepithel der Bronchien fort. Hier wird die Luft angefeuchtet und angewärmt, während Schmutzpartikel durch

den Zilienschlag des Flimmerepithels Richtung Rachen transportiert werden und dort mit dem Speichel abgeschluckt oder dem Nasensekret nach außen abgegeben werden können (49).

Definitionsgemäß werden die oberen Atemwege von der Nasenöffnung bis zu den terminalen Bronchiolen als anatomischer Totraum bezeichnet, da hier kein Gasaustausch stattfindet. Dieses Volumen, das beim Menschen etwa ein Drittel des Atemzugvolumens ausmacht (49), ist einerseits physiologisch für die Konditionierung der Luft, andererseits aus nachvollziehbaren anatomischen Gründen der Luftweiterleitung notwendig und kann mit der Fowler-Methode (Messung des exhalieren Stickstoff-freien Volumens nach einer Inhalation von 100%igem Sauerstoff, (28; 69)) eindeutig bestimmt werden.

Dem gegenüber steht der alveoläre Totraum, der von Alveolen ausgemacht wird, die zwar belüftet, aber nicht durchblutet und somit nicht am Gasaustausch beteiligt sind. Dieser alveoläre Totraum ist im gesunden Menschen oder Tier nahezu vernachlässigbar, kann aber bei verschiedenen Krankheitszuständen wie Entzündungen der Lunge mit verdickter Blut-Luft-Schranke und vor allem durch Embolien der funktionellen Endarterien vergrößert sein. Da der alveoläre Totraum im Patienten nicht genau gemessen werden kann (Kapnographie und Abschätzung des end-tidalen CO<sub>2</sub>-Gehaltes im Exhalat und Vergleich mit der CO<sub>2</sub>-Konzentration im arteriellen Blut (82)), wird stattdessen der funktionelle Totraum oder auch physiologische Totraum gemessen, der eine Summe aus anatomischem und alveolärem Totraum beschreibt und anhand nicht-invasiver Messmethoden (Kapnographie oder Ein-Atemzug-Methode und Berechnung aus der CO<sub>2</sub>-Konzentrationen von Exhalat und arteriellem Blut nach Bohr (14; 97)) zur Diagnostik herangezogen werden kann.

Auch bei der mechanischen Beatmung von Patienten spielt der Totraum eine wichtige Rolle, da das Schlauchsystem und das Mundstück, also die zusätzliche Strecke über die das Gas hin und auch wieder zurück transportiert werden muss, bevor es an den Ort des Gasaustausches gelangt, entweder als zusätzliches Tidalvolumen in die Lunge verbracht werden muss oder gegebenenfalls zu einer Unterbelüftung der Alveolen führt (74). Generell wird ein möglichst geringer Gerätetotraum angestrebt. Dies wird durch Ventile zum Beispiel am Mundstück des Patienten oder die Trennung von inspiratorischem und expiratorischem Schenkel durch ein Y-Stück ermöglicht, beinhaltet aber weiterhin eine gewisse Fehleinschätzung des funktionellen Totraumes vor allem bei kleinen Atemzugvolumina wie bei der mechanischen Beatmung von Mäusen.

### 2.2.2. Die Atmungsmechanik unter Spontanatmung

Bei jeder Einatmung wird die Lunge durch die Bewegung von Zwerchfell und Thorax gedehnt. Die Volumenverschiebung des Atemgases erfolgt in der Expiration weitgehend passiv aufgrund der Entspannung des Zwerchfells und der damit einhergehenden Vorwölbung der Bauchorgane in den Thorakalraum, sowie durch die Eigenelastizität der Lunge, wobei letztere bei erhöhtem Bedarf aktiv durch Expirationsmuskeln (Bauchwandmuskulatur, *Mm. intercostales interni*) unterstützt werden kann.

In der Inspiration wird der Thorax durch eine aktive Anspannung des Zwerchfells und der damit verbundenen Absenkung der caudalen Begrenzung vergrößert. Zugleich werden auch die *Mm. intercostales externi* kontrahiert, was zu einer lateralen und sagittalen Aufdehnung des Thorax über die Rippen führt. Aufgrund des Unterdrucks im Pleuraspalt von etwa -0,5 kPa muss die gesunde Lunge diesem geweiteten Thorakalraum mit einer Aufdehnung ihrerseits folgen. Durch die entstehende Druckdifferenz zwischen sich öffnender Lunge und dem atmosphärischen Druck von 0 kPa an der Nasen- oder Mundöffnung folgt die Luft dem Strömungsdruck und gelangt über die luftleitenden Wege durch den Totraum bis dicht an die Gasaustauschfläche heran. Die letzte Strecke bis zur Alveolarmembran und darüber hinaus wird über Diffusion überwunden.

Die Effektivität dieses Vorgangs wird durch die elastischen Eigenschaften von Lunge und Thorax beeinflusst und hängt immer von der transmuralen Druckdifferenz zwischen Pleuraspalt und Alveolarraum und dem eingebrachten Volumen ab. Aus der durch diese beiden Koeffizienten beschriebenen Kurve, der sigmoidalen Ruhedehnungskurve, lässt sich die Compliance, also die (Volumen-) Dehnbarkeit als Steigung ablesen. Zu Beginn der Inspiration und mit zunehmendem Volumen, also zum Ende der Inspiration, ist die Compliance der Lunge geringer, am dehnbarsten ist die Lunge in der Mitte der Inspiration.

Die Elastizität der Lunge wird maßgeblich durch drei Faktoren beeinflusst. Dies sind zum einen die Dehnbarkeit und die geometrische Anordnung der elastischen Fasern in den interalveolaren Septen (108), zum anderen die Oberflächenkräfte an den gekrümmten Grenzflächen zwischen flüssiger und gasförmiger Phase (Laplace-Gesetz) mit ihrem Gegenspieler, dem Surfactant. Dieser Phospholipidfilm setzt die Oberflächenspannung erheblich herab, sodass die Alveolen auch unter den physiologisch vorliegenden Druckverhältnissen geöffnet sind. Der dritte Faktor, der die Elastizität der Lunge beeinflusst, wird durch die Verankerung der Alveolen in ihrem umliegenden Gewebe bestimmt. Durch die Anordnung der Alveolen halten sich benachbarte Lungenbläschen

gegenseitig offen. Der gleiche Mechanismus gilt auch für die kleineren Bronchien, die durch diese Zugkräfte des Umgebungsgewebes und letztlich der Anhaftung der Lunge an die Thoraxwand in ihrer physiologischen, offenen Ausgangsstellung vorliegen (59).

Im gesunden Mensch oder Säugetier sind die Retraktionskräfte ideal ausbalanciert. Steigt aber die Dehnbarkeit, wie zum Beispiel beim Lungenemphysem und dem sich daraus ergebenden Gewebeschwund, kollabieren auch benachbarte Alveolen und Bronchiolen. Ist die Lunge zu steif, zum Beispiel bei Surfactantmangel, kann sich die Lunge nicht entfalten. In beiden Fällen kommt es zu einer Verminderung des Gasaustausches.

Die letzte beziehungsweise erste Strecke, die der eingeatmete Sauerstoff und das abzuatmende Kohlendioxid zurücklegen müssen, ist die Blut-Luft-Schranke, die sogenannte alveolo-kapilläre Membran, die sich mehrschichtig aus dem Lungenepithel und dem Kapillarendothel zusammensetzt. Der Gastransport erfolgt hier gänzlich über Diffusion und hängt gemäß dem Fickschen Diffusionsgesetz von der Durchtrittsfläche und der Dicke der Membran, sowie der Löslichkeit und dem Diffusionskoeffizienten des diffundierenden Gases ab – vereinfacht, der Diffusionskapazität der Lunge. Die treibende Kraft hinter der Diffusion ist die Differenz der Partialdrücke zwischen Alveolargas und Lungenkapillarblut. CO<sub>2</sub> diffundiert aufgrund seiner größeren Löslichkeit erheblich leichter als O<sub>2</sub> und begegnet beim Gasaustausch in der Lunge keiner Diffusionsbehinderung (49).

### **2.2.3. Die Atmungsmechanik unter mechanischer Beatmung**

Unter mechanischer Beatmung unterliegt die Atmung einer völlig anderen Mechanik. Nachdem die negative Druckbeatmung (Eiserne Lunge) (92) durch die Möglichkeit der Intubation und der Entwicklung geeigneter Beatmungsgeräte heute nahezu vollständig von der Beatmung mit positivem Druck abgelöst wurde, soll hier nur auf letztere eingegangen werden.

Im Gegensatz zur Spontanatmung wird bei der mechanischen Beatmung das Atemzugvolumen nicht durch das größer werdende Lungenvolumen (durch den größer werdenden Thorakalraum) eingesogen, sondern maschinell in die Lunge eingeschoben. Um die reflektorische Atmung des beatmeten Patienten oder Tieres auszuschalten, muss der Patient bei der mechanischen Beatmung unter Vollnarkose gehalten werden und die Atemmuskulatur durch entsprechende Medikamente relaxiert werden. Diese Beeinflussung der Muskulatur und des Atemzentrums schaltet allerdings auch die Schutzmechanismen, die am wachen, spontanatmenden Individuum dafür sorgen, dass die Lunge nicht überdehnt wird oder Fremdstoffe eingeatmet werden (unter anderem Hering-

Breuer-Reflex (68), Hustenreflex (20)), aus. Durch die Umgehung einer „Gegenatmung“ des Patienten birgt also jede mechanische Beatmung das Risiko der Lungenschädigung, wie nachfolgend unter 2.3.1 näher beschrieben wird.

Der Nutzen der mechanischen Beatmung, die Versorgung des respiratorisch insuffizienten Patienten mit Sauerstoff und der Abtransport von CO<sub>2</sub>, überwiegen zwar zweifellos das Risiko, dennoch sollte das Ziel der mechanischen Beatmung neben dem Gasaustausch auch immer sein, dass der Patient zu einem späteren Zeitpunkt ohne mechanische Beatmung auskommt beziehungsweise auch bei anhaltender Beatmung eine funktionsfähige Lunge erhalten bleibt. Die dafür entscheidende lungenprotektive Beatmung setzt die Kenntnis der zugrundeliegenden Atmungsmechanik unter den veränderten Bedingungen der mechanischen Beatmung voraus. Heutzutage ist die mechanische Beatmung nicht mehr aus der Patientenversorgung wegzudenken und stellt neben der Versorgung des Patienten auch ein wichtiges Diagnostikum zur Lungengesundheit dar (35). Anhand der durch die Beatmung gewonnenen und von den inzwischen hochkomplexen Beatmungsgeräten aufgezeichneten Werte lassen sich die wichtigsten Lungenparameter direkt am Patientenbett erheben. Durch die Darstellung der Druck-, Fluss- und Volumenkurven und die Erstellung der Atemschleife erlaubt die mechanische Beatmung ein umfassendes Monitoring des Patienten.

Entscheidend für die Atmungsmechanik unter mechanischer Beatmung ist die Tatsache, dass es sich dabei um zwei pneumatische Systeme handelt, die über den Tubus oder die Atemmaske miteinander verbunden sind - zum einen das technische Beatmungsgerät mit seinem Ventilator und dem Schlauchsystem, zum anderen das biologische respiratorische System, bestehend aus dem Totraum, der Lunge und dem Thorax des Patienten. Die Energie des technischen Systems, die benötigt wird, um das Atemzugvolumen in die Lunge zu verbringen, wird in den elastischen Fasern der Lunge gespeichert und beim Öffnen der Ventile wiederum freigesetzt. Physikalisch gesehen, stellt das respiratorische System des Patienten lediglich einen komplexen Widerstand (Impedanz) für das Beatmungsgerät dar. Durch eine mathematische Methode (Bewegungsgleichung), die die statischen und dynamischen Anteile des Atemzyklus kombiniert, können in jedem Atemzug die Compliance und die Resistance ermittelt werden und stehen dem behandelnden Arzt als wichtige Lungenfunktionsparameter zur Verfügung. Hierbei summiert die semistatische Compliance, wie unter 2.2.2 bereits beschrieben, alle elastischen Eigenschaften des respiratorischen Systems. Die



Compliance (C), oder Volumendehnbarkeit, ist definiert als die Volumenänderung in der Lunge  $\Delta V$  pro Druckänderung  $\Delta P$  im Alveolarraum.

$$C = \Delta V / \Delta P$$

Die semistatische Resistance hingegen beschreibt alle Strömungswiderstände des respiratorischen Systems, also die Energieverluste, die das strömende Gas durch innere Reibung und Wandreibung erfährt. Zur Ermittlung der Resistance wird üblicherweise der Volumenfluss (Flow) gemessen, das durchströmende Volumen je Zeiteinheit. Die Resistance (R) ist definiert als das Verhältnis aus antreibender Druckdifferenz  $\Delta P$  und erreichtem Flow  $\dot{V}$  (36).

$$R = \Delta P / \dot{V}$$

Die Parameter Compliance und Resistance können Aufschluss geben über die zunehmende Steifigkeit der Lunge, wie sie zum Beispiel bei einer Schädigung und progressiven Entzündung auftritt beziehungsweise über die physiologischen Bedingungen in den Atemwegen, die bei obstruktiven Veränderungen (Asthma, COPD) eine Rolle spielen. Die Untersuchung der Partialdrücke von Kohlendioxid und Sauerstoff im arteriellen Blut (Blutgase) vervollständigen neben anderen klinischen Parametern die Diagnostik zur Lungenfunktion des beatmeten Patienten. Neben den diagnostischen Aspekten, die sich aus der Analyse der Atmungsmechanik ergeben, ermöglicht die mechanische Beatmung auch lungenprotektive Maßnahmen und Manöver, die weit über die bloße Versorgung mit Atemluft hinausgehen. Im später folgenden Abschnitt 2.4 wird näher auf diese Beatmungsverfahren eingegangen.

## **2.3. Pathologische Aspekte der Atmung**

### **2.3.1. Der akute Lungenschaden und das akute progressive Lungenversagen**

Der akute Lungenschaden (*acute lung injury*, ALI) beziehungsweise dessen noch schwerere Ausprägung, das akute progressive Lungenversagen (*acute respiratory distress syndrome*, ARDS), sind lebensbedrohliche Krankheiten (57) und haben aufgrund der hohen Inzidenz (Vereinigte Staaten, 2005, altersbereinigte Inzidenz: 86,2/100.000 Patienten pro Jahr (77)) und der sehr hohen Hospitalisierungsmortalität von 38,5 % enorme Bedeutung für die öffentliche Gesundheit. Allein in den Vereinigten Staaten schätzt man die Zahl der von ALI/ARDS betroffenen Patienten auf etwa

190.600 pro Jahr. Es wird von 3,6 Millionen Hospitalisierungstagen und einer jährlichen Letalität von 74.500 Toten ausgegangen (77). Definiert wurde der akute Lungenschaden zum ersten Mal bereits 1967 als eine Kombination aus Tachypnoe, Hypoxämie und einem Verlust der Compliance (8). Über die Jahre und mit wachsender klinischer Bedeutung wurde das Krankheitsbild von ALI und ARDS weiter untersucht und 1994 in der Amerikanisch-Europäischen Konsensus Konferenz neu definiert, um eine bessere Einordnung des Krankheitsbildes anhand klinischer Parameter zu ermöglichen, darunter eine Oxygenierung von  $\leq 300$  mmHg  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  (beziehungsweise  $\leq 200$  mmHg  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  für ARDS), wobei die  $\text{FiO}_2$  die inspirierte Sauerstofffraktion beschreibt, und bilaterale Lungeninfiltrate in frontalen Röntgenaufnahmen (12). Die erneute Spezifizierung des Krankheitsbildes, die sogenannte *Berliner Definition* im Jahr 2011 belegt die andauernde Aktualität der Erforschung dieses Syndroms (65). Die gegenwärtige Definition unterscheidet nicht mehr in ALI und ARDS sondern in 3 Schweregrade des ARDS, die lediglich anhand der Hypoxämie bestimmt werden (mild:  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$  mmHg, mittelgradig:  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$  mmHg, schwer:  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100$  mmHg). Durch die klarere Definition der Schweregrade und anderer Nebenvariablen wie die Beurteilung von Lungeninfiltraten in Röntgenbildern wurde der weltweite Vergleich der Fälle erleichtert und dadurch die Vorhersagen der Krankheitsentwicklung verbessert (76).

Obwohl noch nicht abschließend geklärt ist, unter welchen Bedingungen Patienten einen schweren Verlauf des akuten Lungenversagens zeigen, ist die Pathogenese des Lungenschaden inzwischen anhand umfassender klinischer beziehungsweise aufwendiger (tier-)experimenteller Studien aufgeklärt worden. Es lassen sich drei aufeinanderfolgende Phasen im Krankheitsverlauf beschreiben (94). Die exsudative Phase zeichnet sich zunächst durch eine Barrierschädigung der Blut-Luft-Schranke aus, die ein protein- und zellreiches interstitielles und alveoläres Ödem bedingt. Durch den durch das Ödem verursachten erschwerten Gasaustausch kommt es zur Hypoxämie. Das aktivierte kapillare Endothel und alveoläre Epithel vermitteln über Zytokine das Einwandern weiterer Entzündungszellen (41; 95), welche ihrerseits Entzündungsmediatoren ausschütten und so in einer komplexen Interaktion eine Hyperinflammation auslösen, die sich auch auf andere Organe und Systeme wie die Niere, den Gastrointestinaltrakt, das zentrale Nervensystem oder das Gerinnungssystem ausbreiten kann (11; 67). In der Lunge schließt sich die proliferative Phase an, in der es zur Organisation der intraluminalen Exsudate kommt, die in der nachfolgenden fibrotischen Phase als Ausgangspunkte für das *Lungenremodeling* angesehen

werden (26). Durch die Beteiligung der Gefäße und deren fibroproliferative, thrombotische Veränderungen kann es in einer späteren Form der Lungenschädigung zum Lungenhochdruck mit nachgeschalteter Beeinflussung des rechten Herzens kommen. So ist der fortgeschrittene Lungenschaden nicht nur Ursache für einen gestörten Gasaustausch, sondern verursacht durch die überschießende Entzündungsreaktion und die pulmonale Hypertonie häufig ein Multiorganversagen (11; 67).

Es lassen sich eine Vielzahl von Ursachen für die Entstehung des Lungenschadens finden, darunter Infektionen und Verletzungen pulmonalen, aber auch nicht-pulmonalen Ursprungs (42), sowie eine gewisse genetische Prädisposition (30). Unabhängig von der Ursache des Lungenschadens ist die Folge jedoch bei allen Patienten dieselbe: Die Patienten müssen teilweise über eine lange Zeit beatmet werden. Aufgrund der vorgeschädigten Lunge birgt diese Beatmung aber das Risiko einer zusätzlichen Verschlechterung der Ausgangssituation und kann zu einer dauerhaften Abhängigkeit von der mechanischen Beatmung mit entsprechender infauster Prognose führen.

### **2.3.2. Der beatmungsassoziierte Lungenschaden des Menschen**

Die für einen ausreichenden Gasaustausch essentielle und damit überlebenswichtige mechanische Beatmung von Patienten mit Lungenschaden oder -versagen kann in ihrer zusätzlich schädigenden Rolle als eigene Ursache für einen Lungenschaden angesehen werden (29) und wird generell als beatmungsinduzierter Lungenschaden (*ventilator induced lung injury*, VILI) bezeichnet (27). Da es in der Klinik jedoch nie zu einer anhaltenden mechanischen Beatmung ohne klinische Notwendigkeit, wie zum Beispiel dem Lungenversagen, kommt, kann der Kausalzusammenhang zwischen Beatmung und Lungenschaden am Patienten nicht abschließend bewiesen werden. Es wird also vielmehr vom beatmungsassoziierten Lungenschaden (*ventilator associated lung injury*, VALI) gesprochen (2).

Als mechanistische Ursachen für die Entstehung des VILI beziehungsweise VALI werden aktuell vier Haupthypothesen diskutiert, deren spezifische Kriterien sich *in vivo* jedoch teilweise nur schwer voneinander unterscheiden lassen und meist gemeinsam mit wechselnder Ausprägung im Patienten angetroffen werden.

Das Barotrauma beschreibt die Schädigung der Lunge aufgrund überhöhter Drücke im Atemwegs- und Alveolarsystem (27). Genauer wird damit auch das Zerreißen der Alveolen mit nachfolgend ausströmender Luft in den Thorax (Pneumothorax) oder entlang des Gefäßbündels in das Mediastinum (Pneumomediastinum) beschrieben. Je nach Vorschädigung der Lunge (obstruktive

oder infektiöse Lungenerkrankungen) variiert das Krankheitsbild zwischen einem asymptomatischen Verlauf mit interstitiellem Emphysem über Atemnot oder Herzversagen bis hin zu einem ausgeprägtem Spannungspneumothorax (5; 15).

Beim Volutrauma hingegen geht man davon aus, dass ein großes Tidalvolumen die Alveolarwand überdehnt und so zur Schädigung führt (27). Dieser Hypothese wurde zuletzt große Beachtung geschenkt, indem das empfohlene Atemzugvolumen deutlich von 12 auf 6 ml/kg KG reduziert wurde (1). Eine wichtige Rolle spielt das Volutrauma allerdings auch bei niedrigen Tidalvolumina, da in der vorgeschädigten Lunge das Atemvolumen nicht homogen verteilt ist, sondern immer in den Bereich mit der höchsten Dehnbarkeit (Compliance) vordringt. Damit werden geschädigte und weniger dehnbare Bereiche zwar geringer belüftet und gedehnt, das Volumen wird aber unproportional stark in noch gesunde Alveolaregebiete gelenkt und führt hier zu einer lokalen Überdehnung der Alveolen (sogenanntes *baby lung concept*) (19) mit nachfolgender dehnungsinduzierter Entzündungsreaktion.

Die Hypothese des Atelektraumas beschreibt die Schädigung durch ein wiederholtes Öffnen und Schließen bereits kollabierter Alveolen. Die damit einhergehenden Scherkräfte schädigen das Alveolarepithel (84). Die Verwendung eines positiven end-expiratorischen Druckes (*positive end-expiratory pressure*, PEEP) kann das Entstehen atelektatischer Bereiche einerseits verhindern, aber ihrerseits wiederum zu einem Barotrauma beitragen (4; 27).

Die jüngste Hypothese, das Biotrauma, fasst die mit der Beatmung assoziierten Entzündungsreaktionen zusammen. Hier wird festgestellt, dass durch die Dehnung der Alveolarepithel- und Kapillarendothelzellen ein mechanosensitiver Reaktionsweg stimuliert wird, der zu einer Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF- $\alpha$ ) und verschiedener Interleukine führt (102), die wiederum die Infiltration von Entzündungszellen, vor allem neutrophiler Granulozyten, zur Folge haben. Alveoläres Ödem und Surfactant-Inaktivierung sind neben einer Alveolarmembran-Verdickung mit erschwertem Gasaustausch die lokalen Schäden, aber auch eine systemische Entzündungsreaktion bis hin zum Multiorganversagen ist möglich (95; 98).

Ziel einer lungen-protaktiven Beatmungsstrategie muss es also sein, die verschiedenen Aspekte der zugrundeliegenden Mechanismen gleichermaßen mit einzubeziehen und eine, vielleicht sogar patientenindividuelle, sicherlich aber auf die ursächliche Schädigung zugeschnittene, ausbalancierte Beatmung zu entwickeln.

### **2.3.3. Der experimentell hervorgerufene beatmungsinduzierte Lungenschaden**

Während im Patienten der Nutzen und die Schädigung der Beatmung nicht voneinander getrennt werden können, besteht im experimentellen Modell die Möglichkeit, die Folgen der mechanischen Beatmung an gesunden Versuchstieren zu untersuchen. Um die bereits erläuterten Hypothesen zur Pathogenese des VILI oder VALI zu generieren und weiter zu untersuchen, wurden unterschiedlichste Untersuchungen an verschiedenen Tiermodellen durchgeführt und die einzelnen Aspekte des Lungenschadens analysiert.

Als den beatmungsinduzierten Lungenschaden experimentell hervorrufende Parameter gelten hohe (9) oder auch niedrige Tidalvolumina (38) beziehungsweise eine Beatmung mit hohem inspiratorischem Druck (18) und das Anlegen eines moderaten bis hohen PEEP (13; 61). Tiermodelle, bei denen zum Beispiel Säure zur Schädigung des Alveolarepithels inhaliert (56) oder zur Schädigung des Kapillarendothels venös injiziert wird (48) oder bei denen eine Infektion mittels Injektion von bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) simuliert wird (64), dienen der Untersuchung des beatmungsassoziierten Lungenschadens wie er in der vorgeschädigten Lunge des Patienten vorliegt. Die Untersuchung an gesunden Tieren ermöglicht es hingegen, anhand der physiologischen Ausgangswerte die durch die mechanische Beatmung ausgelösten Pathomechanismen zu erkennen.

### **2.4. Beatmungsverfahren in der Klinik und im Experiment**

Aufgrund des beschriebenen *Circulus vitiosus* der zugleich lebensnotwendigen und schädigenden Beatmung im Patienten und dem gebotenen Bestreben, die nötige mechanische Beatmung protektiver auszurichten, wurde und wird die mechanische Beatmung stetig weiterentwickelt. Teilweise werden neuere Beatmungsverfahren zunächst noch experimentell eingesetzt, andere Beatmungsstrategien finden bereits Anwendung in der Klinik.

Der große Vorteil der mechanischen Beatmung ist die Verwendung von Gasen, die in ihrer Zusammensetzung von der Raumluft abweichen können. Durch die Gabe von Sauerstoff oberhalb einer Konzentration von 21%, also einer  $FiO_2 > 0,21$ , ist es möglich, das Tidalvolumen drastisch herabzusetzen und so einer Überdehnung der Alveolen entgegenzuwirken (3). Hierbei treten allerdings andere Probleme wie ein erschwertes  $CO_2$ - Abatmen und bei langfristiger Beatmung eine lungenschädigende Hyperoxie auf (16; 46). Auch die Aufrechterhaltung der Anästhesie kann über sogenannte Narkosegase gewährleistet werden.

Durch die Manipulation der inspiratorischen und expiratorischen Drücke ist es heute dem Anästhesisten möglich, ein patientenindividuelles und situationsgebundenes Beatmungsverfahren anzuwenden. So gehört zu den Standardeinstellungen der positive end-expiratorische Druck (PEEP), der am Ende der Expiration durch Offenhalten der Alveolen eine Atelektasenbildung verhindert (51). Ebenfalls zur Verhinderung oder Lösung atelektatischer Bereiche gibt es die Möglichkeit von Rekrutierungsmanövern mit hohen expiratorischen Drücken über kurze Zeitintervalle (22). Diese Rekrutierungsmanöver finden vor allem im *open lung concept* von Bachmann (73) Verwendung. Der Vorteil, zuvor atelektatische Bereiche wieder für den Gasaustausch zu rekrutieren, birgt jedoch das Risiko durch erhöhten Atemwegsdruck bislang gesunde Areale in Form eines Barotraumas bis hin zum Pneumothorax zu schädigen.

Neben der druckgesteuerten Beatmung, bei der der inspiratorische Spitzendruck als Grenze für die Inspiration vorgegeben wird, gibt es auch die volumengesteuerte Beatmung, bei der das Tidalvolumen vorgegeben wird. Letztere findet vermehrt Anwendung im nordamerikanischen Raum und erklärt den Schwellenwert von 6 ml/kg KG Tidalvolumen als Definition für eine protektive Beatmung (1). Bei der künstlichen Beatmung von Patienten im europäischen Raum wird teilweise auf eine Kombination beider Methoden zurückgegriffen: Zunächst findet die Beatmung druckgesteuert mit einem protektiven, relativ geringen Druck statt; führt dies zu einer sinkenden Versorgung mit Sauerstoff, kann auf eine volumengesteuerte Beatmung umgestellt werden, die den Patienten mit dem nötigen Volumen beziehungsweise Sauerstoff versorgt. Auch unterstützende Beatmungsverfahren sind möglich. Sie finden vor allem in der Intensivmedizin Anwendung, bei der die Patienten nach und nach vom Beatmungsgerät entwöhnt werden sollen. Zu den gängigsten Methoden gehört hier der BiPAP-Modus (*biphasic positive airway pressure*), ein druckkontrolliertes Beatmungsverfahren, das ein spontanes Zwischenatmen des Patienten zulässt und so zwischen lediglich atem-unterstützender Funktion bis zur vollständigen Beatmung wechseln kann (80). Ein ebenfalls modernes Beatmungskonzept innerhalb der druckgesteuert unterstützenden Beatmung (*pressure support ventilation*) ist die *noisy ventilation*, eine mechanische Beatmung, die die physiologische Atemvariabilität imitiert und dabei hohe und niedrige Drucklevel im unregelmäßigen Wechsel durchführt. Experimentelle Ergebnisse sprechen aktuell für die weitere Erprobung dieses Beatmungsverfahrens (21; 75; 86).

Vor allem bei der Beatmung von Früh- (24) und Neugeborenen (66) hat sich eine völlig andere Beatmungsform als besonders schonend erwiesen: Die Hochfrequenzbeatmung (*high frequency*

*oscillation ventilation*, HFOV) zeichnet sich vor allem durch eine hohe Beatmungsfrequenz (bis zu 900 Beatmungszyklen pro Minute) und ein extrem geringes Tidalvolumen (teilweise unter dem des Totraumvolumens) aus (85). Es kommt bei der HFOV also nicht zur aktiven Verschiebung des Gasvolumens, sondern zu einer kontinuierlichen Durchmischung der Luft in den Atemwegen. Dies erfolgt in den größeren Atemwegen durch Konvektion und Turbulenzen. Die distale Wegstrecke der kleinen Bronchien und in den Alveolen werden Sauerstoff und Kohlendioxid mittels Diffusion ausgetauscht. Durch das geringe Atemzugsvolumen und nahezu keinerlei Auftreten von Scherkräften bei anhaltend positiven mittleren Atemwegsdruck können sowohl Volutrauma als auch Atelektrauma weitgehend vermieden werden. Obwohl diese Beatmungsform dadurch vielversprechend für ARDS-Patienten schien, musste festgestellt werden, dass es zunächst zwar zu einer besseren Oxygenierung durch HFOV im Vergleich mit konventioneller Beatmung kommt, sich die hämodynamischen Werte, die Oxygenierungsrate und weitere Lungenparameter nach etwa 72h aber an die Werte der konventionellen Beatmung angleichen (25). So gilt die HFOV zwar als eine ebenfalls sichere Beatmungsform für ARDS-Patienten, findet aber bislang vornehmlich bei Neugeborenen Anwendung.

Für den experimentellen Aufbau in der vorliegenden Studie zur Untersuchung des beatmungsinduzierten Lungenschadens empfiehlt sich eine strikte Trennung beider Varianten – volumen- beziehungsweise druckgesteuerte Beatmung –, um *in vivo* konstante Daten hinsichtlich des Tidalvolumens zu generieren beziehungsweise im Organbad auch ohne eine nachgeschaltete, funktionsfähige Lunge die entsprechenden Druckverhältnisse in den isolierten Atemwegen zu simulieren. Bei den in der folgenden Studie verwendeten Beatmungsgeräten handelt es sich zum einen um den Midivent® (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) zum anderen um den Compact Animal Respirator® (TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland). Anhand dieser beiden Geräte soll das Prinzip, die Vor- und die Nachteile der beiden experimentell eingesetzten Beatmungsverfahren erläutert werden.

Die volumengesteuerte Beatmung mit dem Midivent® erlaubt eine kontinuierliche Regulierung des Atemzugvolumens ( $V_T$ ) zwischen 60 und 700  $\mu$ l und der Atmungsfrequenz (bpm) zwischen 60 und 400 bpm. Die Kolbenpumpe basiert auf dem Starling-Prinzip (87), wobei hier zugunsten der mechanischen Genauigkeit und der Verschleißminderung auf die klassischen Ventile verzichtet wurde und der Kolben selbst über präzise Aussparungen die beiden Ventile ersetzt. Das

Beatmungsgerät versorgt das narkotisierte Tier in der Inspirationsphase aktiv mit einem kontinuierlich eingebrachten Gasvolumen und erlaubt anschließend in der Expirationsphase den passiven Gasausstrom aufgrund der Eigenelastizität der Lunge. Durch die kurzen Schlauchverbindungen (7 cm Länge, 1,5 mm Innendurchmesser) zwischen Beatmungsgerät und Tier kommt es zu einem, im Verhältnis zu anderen Systemen, geringen Gerätetraum und der systemische Fehler des Atemzugvolumens kann so auf 5  $\mu$ l minimiert werden. Das Verhältnis zwischen Inspirations- und Expirationsphase ist 1:1. Die Dauer des Atemzyklus kann über die Atmungsfrequenz pro Minute reguliert werden. Da die Dauer der Expiration aufgrund der Eigenelastizität der Lunge erfahrungsgemäß kürzer ist als die maschinell vorgegebene Dauer der Inspiration, kommt es bei der Messung der Druckverhältnisse während des Atemzyklus zu einem charakteristischen, wellenförmigen Bild mit nicht-linear ansteigendem Druck während der Inspiration und beinahe sofortigem Abfallen des Drucks nach dem Übergang in die Expiration, wobei sich eine kurze Phase des tatsächlichen Raumlufldrucks anschließt, bevor es erneut zur Inspiration mit Druckanstieg kommt. Die Beatmung kann sowohl mit Raumluft als auch mit abgefüllten Gasen erfolgen. Die Bildung von Atelektasen in der Expirationsphase kann durch Erhöhen der funktionellen Residualkapazität mittels Anlegen eines PEEP verhindert werden. Ein Vorteil der volumengesteuerten Beatmung ist das sichere, kontinuierliche Einbringen des eingestellten Tidalvolumens in den Atmungstrakt des anästhesierten Versuchstieres, unabhängig von einer häufig vorkommenden experimentell bedingten Verengung des Schlauchsystems durch beispielsweise der Kondensation ausgeatmeter Flüssigkeit, wie sie bei einer Entzündung der Lunge auftritt, und auch unabhängig von der experimentell bewusst beeinflussten Lungen- oder Thoraxcompliance. Damit einhergehend ist die volumengesteuerte Beatmung allerdings auch als weniger protektiv anzusehen als die druckgesteuerte Variante, da bei zunehmenden Atelektasen, entzündlichen Exsudaten, wie bei der Ödembildung oder sonstigen Abweichungen des angenommenen Lungenvolumens, das eingestellte Atemzugvolumen sehr große Drücke in der Lunge hervorgerufen werden können und so ein Lungenschaden in Form eines Barotraumas verursacht oder noch verstärkt werden kann.

Bei der druckgesteuerten Beatmung mit dem Compact Animal Respirator® wird als Hauptkonstante nicht das Tidalvolumen, sondern der endinspiratorische Druck (EIP) vorgegeben. Raumluft oder anderes Gas strömt mit positivem Druck über magnetische Ventile in der Inspirationsphase in die Lunge bis der vorgelegte EIP am entsprechenden Drucksensor gemessen



wird. Die Dauer dieser Phase kann mittels des Anteils der Inspirationsphase am Atemzyklus und der Atmungsfrequenz zeitlich bestimmt und durch den Gaszustrom beeinflusst werden. Die Expiration erfolgt auch hier passiv durch Öffnen des Ventils des expiratorischen Schenkels. Im Gegensatz zu der nach dem Starling-Prinzip arbeitenden, volumengesteuerten Beatmung mit einem Inspirations- zu Expirationsverhältnis von 1:1, können bei der druckgesteuerten Beatmung die einzelnen Phasen des Atemzyklus exakt vorgegeben werden, da die elektromagnetischen Ventile über Drucksensoren gesteuert werden. Es ist also möglich, neben dem Spitzendruck, der Atmungsfrequenz (1-360 bpm) und der Inspirationsphase auch eine Plateauphase nach der Inspiration einzurichten. Auch diese wird dann als Anteil des Atemzyklus beschrieben und zeitlich durch die Atmungsfrequenz bestimmt. Die individuell einstellbaren Plateauphasen der In- und Expiration erweisen sich vor allem bei der Bildgebung der Lunge mittels Intravitalmikroskopie als sehr hilfreich. Bei der druckgesteuerten Beatmung lässt sich während der Ausatmungsphase ebenfalls ein PEEP anlegen. Ebenso ist die Ventilation mit Sauerstoff oder anderen Gasen möglich, solange über den eingebauten oder zusätzlich integrierten Druckminderer der Gasfluss regulierbar ist. Im Gegensatz zur volumengesteuerten Beatmung ist die druckgesteuerte Beatmung als deutlich protektiver anzusehen, da durch den voreingestellten inspiratorischen Spitzendruck automatisch bei jedem Atemzyklus auf zunehmende Atemwegsdrücke, wie sie durch entzündliche Prozesse wie Ödeme oder Atelektasen auftreten, mit einem verminderten Atemzugvolumen reagiert wird. Die druckgesteuerte Beatmung birgt aber entsprechend das Risiko einer Hypoventilation, wenn die Lunge zum Beispiel bei einer Schädigung steifer wird und der EIP somit schneller erreicht wird.

### **2.5. Begründung für die Dissertation**

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass ein Großteil der zum Beginn der hier vorgestellten Untersuchung vorliegenden Literatur die Entstehung des Lungenschadens auf Ebene der Alveolenschädigung untersucht. Die luftleitenden Atemwege wurden bislang kaum in Betracht gezogen, scheinen sie doch durch die bis in die kleinsten Bronchien vorhandenen Knorpelscherben anatomisch stabil. Einige Arbeitsgruppen machten allerdings interessante Beobachtungen zu den Folgen der mechanischen Beatmung auf der Ebene der Atemwege. So konnten Sinclair und Kollegen im Jahr 2007 anhand von Tantalumstaub-Bronchiogrammen von spontanatmenden Ratten zeigen, dass die oberen Atemwege bei jedem Atemzug eine gewisse Dehnung durchlaufen

(83). Gegenüber der bildgebenden Methode von Sinclair untersuchte die Arbeitsgruppe um Kavanagh bereits 2003 die Folgen hochvolumiger Beatmung auf Genebene und konnte darstellen, dass die Expression proinflammatorischer Gene zunächst vor allem im Epithel von Bronchien erhöht ist und nicht in der Alveolarmembran (23), wie bislang angenommen. Intravitalmikroskopische Arbeiten von Wagner und Kollegen zeigten ferner, dass es durch einen hohen PEEP zu einer vermehrten Leukozytenadhäsion in Mikrogefäßen der Trachea kommt (104) und wiesen so eine erste Verbindung zu einer lokalen Entzündungsreaktion nach. Keine dieser überraschenden Untersuchungen brachte die Ergebnisse allerdings eindeutig mit der Entstehung des beatmungsinduzierten Lungenschadens in Zusammenhang, sondern sie blieben isoliert betrachtet wenig aussagekräftig im Vergleich zu der Fülle erhobener Daten auf der Alveolarebene des Lungenschadens.

### **2.6. Ziel der Dissertation**

Ziel der hier vorliegenden Dissertation war es folglich, zu überprüfen, inwieweit (1.) die luftleitenden Atemwege der Maus bei der mechanischen Beatmung einer Aufdehnung unterliegen und ob (2.) diese Dehnung bei der Pathogenese des beatmungsinduzierten Lungenschadens eine Rolle spielt. Das dritte Ziel dieser Arbeit sollte die Untersuchung sein, ob sich die erhaltenen Ergebnisse aus dem Mausmodell auf größere Säugetiere und den Menschen übertragen lassen.

### **3. Tiere, Material und Methoden**

#### **3.1. Versuchstiere**

Alle tierexperimentellen Arbeiten an Mäusen, die im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit durchgeführt wurden, erfolgten gemäß dem vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) Berlin genehmigten Versuchsvorhaben G 0028/07 beziehungsweise sie fanden unter Berücksichtigung aller tierschutzrechtlichen Vorgaben über die Tötungsanzeige T 0236/02 statt. Alle hier beschriebenen Versuche waren akut und final. Die Kadaver wurden nach Abschluss der Versuche nach den örtlichen Vorgaben entsorgt.

Des Weiteren wurden Segmentbronchien von Schweinen untersucht, die nach der Schlachtung der Tiere zu Lebensmittelzwecken anfielen und damit keiner gesonderten Gesetzgebung unterlagen.

##### **3.1.1. Mäuse**

Die Versuche wurden an männlichen C57BL/6J Mäusen durchgeführt. Die aus einer Inzucht stammenden Tiere hatten ein KG von  $25 \text{ g} \pm 6 \text{ g}$  und waren 10-12 Wochen alt. Die Zucht der Tiere fand für die Versuche in Berlin in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin der Charité (FEM), für die Untersuchungen im vCT in Heidelberg in den Charles River Laboratories (Niederlassung Sulzfeld, Deutschland) statt.

Die Unterbringung der Mäuse im Experiment erfolgte in der Tierhaltung am Campus Benjamin Franklin der Charité - Universitätsmedizin Berlin unter der Aufsicht der hier tätigen Tierpfleger, die über die erforderlichen Kenntnisse hinsichtlich der artgerechten Pflege und Ernährung verfügen. Die tiermedizinische Versorgung wurde durch die FEM und die Kontrolle der Tierhaltung durch die Tierschutzbeauftragten der Charité und die Mitarbeiter des LAGeSo gewährleistet.

Die Mäuse wurden in Gruppen bis zu 8 Tieren in Typ-III Käfigen ( $\sim 820 \text{ cm}^2$  Bodenfläche) untergebracht, sodass pro Tier  $>100 \text{ cm}^2$  Käfigfläche zur Verfügung standen. Eine ausreichende Käfiggröße im Hinblick auf das Bewegungsbedürfnis und die Schaffung einer komplexen Käfigumwelt war damit gegeben. Die Käfige waren mit staubarmer, strukturierter Holzeinstreu, die regelmäßig gewechselt wurde, sowie weiterem *Enrichment* (Unterschleupmöglichkeit in Form einer Papprolle und eines Häuschens, Zellstoff zur eigenen Strukturierung des Lebensraumes) ausgestattet. Die Tiere erhielten Trinkwasser und pelletiertes Haltungsfutter ad libitum. Lichtverhältnisse und Raumklima wurden den Bedürfnissen der Tiere angepasst (Raumtemperatur

20-24° C, relative Luftfeuchte 45-65 %, 12-stündiger Hell/Dunkel-Rhythmus). Das soziale Umfeld wurde durch die Gruppenhaltung mit Artgenossen gestaltet. Diese Haltungsbedingungen basieren auf den geltenden Vorgaben der EU-Richtlinie 2010/63/EU, der EU-Leitlinie 2007/526/EG und den Empfehlungen des Ausschusses für tiergerechte Labortierhaltung der GV-SOLAS für die Haltung von Mäusen und Ratten, gemäß den Standardhaltungsbedingungen der FEM.

### **3.1.2. Schweine**

Die Versuche an den porcinen Atemwegen wurden an isolierten Segmentbronchien von gesunden Masthybriden mit einem Lebendgewicht von etwa 110 kg durchgeführt. Die Schweine wurden im Schlachthof geschlachtet und die Gewebeproben konnten im Rahmen der Lehre des Instituts für Fleischhygiene und -technologie der Freien Universität Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin, etwa 9-10 Stunden nach Tötung der Tiere aus zwei unauffälligen Geschlingen jeweils aus dem cranialen, medialen und diaphragmalen Abschnitt des linken hinteren Lungenlappens (*Lobus caudalis sinister*) entnommen werden. Die Gewebeproben wurden in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) in die Labore des Instituts für Physiologie der Charité verbracht und dort weiter untersucht.

## **3.2. Material und Methoden**

### **3.2.1. Anästhesie und Beatmung**

Für alle Untersuchungen beziehungsweise vor der Tötung durch Exsanguination wurden die Mäuse in Vollnarkose versetzt. Hierzu erhielten die Tiere eine intraperitoneale (i.p.) Mischinjektion aus 100 mg/kg KG Ketamin (Ketavet®; Pfizer vet., NY, USA) und 20 mg/kg KG Xylazin (Rompun®; Bayer HealthCare, Leverkusen, Deutschland). Die Narkose wurde über die Dauer des jeweiligen Versuchs etwa halbstündlich, je nach Reaktion auf den Zwischenzehenreiz, mit der halben Initialdosis aufrechterhalten. Diese Narkose verbindet die stark analgetische und sedative Wirkung des Phencyklidin (Ketamin) bei nur geringer Atemdepression mit der stark sedativen und muskelrelaxierenden Wirkung des  $\alpha_2$ -Agonisten Xylazin. Durch die Gabe von Xylazin kommt es zudem zu einer peripheren Vasokonstriktion, sodass der Blutdruck auch bei den zu erwartenden Flüssigkeitsverlusten einer Operation tolerabel bleibt. Diese balancierte Anästhesie führt zu einer zentralen Ausschaltung des Bewusstseins und der Schmerzwahrnehmung und gilt im Moment als Standardanästhesie für invasive Versuche an Mäusen. Die anästhesierten Tiere wurden zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur bei 38° C (37), die mittels eines rektalen Sensors

kontrolliert wurde, in Rückenlage auf einer Wärmeplatte (Homeothermic Blanket; Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) mit Klebeband fixiert.

Nach Überprüfung der Narkosetiefe anhand des Zwischenzehenreflexes erfolgte die Tracheotomie und Intubation. Hierzu wurde die Haut über der Halsregion mittels Scherenschlags etwa 0,8 cm longitudinal eröffnet, die beiden *Mm. sternohyoidei* („Brustbein-Zungenbein-Muskel“) stumpf voneinander gelöst und die Trachea lokal freipräpariert, um schließlich einen einfachen Baumwollfaden unter der Trachea durchzuführen. Mit einer Trachealschere wurde die Luftröhre zwischen zwei Knorpelringen caudal der Schilddrüse schlitzförmig auf etwa 2/3 eröffnet und ein metallener Trachealtubus (1 mm Außendurchmesser, 16 mm Gesamtlänge; Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) eingeführt und mit dem Baumwollfaden fixiert. An den Trachealtubus wurde das Y-Stück des Beatmungsgeräts angeschlossen.

Bei allen Versuchen *in vivo* handelte es sich um eine volumengesteuerte Beatmung mit dem Midivent® (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland). Bei den vorliegenden Versuchen wurden alle Tiere mit einer  $FiO_2$  von 1,0 beatmet (Conoxia®; Linde Gas Therapeutics GmbH, Unterschleißheim, Deutschland). Um die Bildung von Atelektasen in der Expirationsphase zu verhindern, wurde die funktionale Residualkapazität mittels Anlegen eines moderaten PEEP von 2 cmH<sub>2</sub>O erhöht.

Die Beatmung der isolierten Atemwege von Mäusen und Schweinen erfolgte druckgesteuert mit dem Beatmungsgerät Compact Animal Respirator® (TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland), um die Druckverhältnisse in den Atemwegen in Abwesenheit der Lunge zu simulieren. Auch hier wurde ein PEEP von 2 cmH<sub>2</sub>O angelegt.

### **3.2.2. Volumen-Computertomographie mit Flächendetektoren**

Zur bildgebenden Darstellung der oberen Atemwege wurden Mäuse im Volumen-Computertomograph mit Flächendetektoren (vCT) am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg in der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. Michael Puderbach untersucht. Der hier verwendete Prototyp (Siemens Medical Solutions, Forchheim, Deutschland) zeichnet sich, in Abgrenzung zu einem herkömmlichen CT, durch eine deutlich größere räumliche und zeitliche Auflösung aus (34). Die Verbesserung der Aufnahmegeschwindigkeit und der räumlichen Auflösung wurde möglich, indem die sonst üblichen 4-, 16- oder 64-Schicht-Detektoren eines CTs gegen einen Flächendetektor mit 2048 x 1536 Elementen ausgetauscht wurden. So können in nur einer Umdrehung der Röntgenröhre (Durchmesser 93 cm) 1536 Bildschnitte in einem Objekt von

18 cm Länge generiert werden. Die kurze Bildgenerierungszeit von 19 Sekunden pro Scan erlaubt mehrere Aufnahmen in einem Untersuchungszeitraum mit unterschiedlichen Beatmungseinstellungen, während die extrem hohe räumliche Auflösung mit einer Voxel-Seitenlänge von bis zu 150  $\mu\text{m}$  in der hier vorgestellten Studie die Darstellung bis hin zu Segmentbronchien mit einem Durchmesser von 0,8 mm ermöglicht. Diese anatomischen Strukturen entzogen sich bislang einer *in vivo* Bildgebung.

Zur Untersuchung im vCT wurden anästhesierte Mäuse in Rückenlage in die Röntgenröhre verbracht. Die Scans erfolgten jeweils vor und nach der Tracheotomie beziehungsweise zu verschiedenen Zeitpunkten unter mechanischer Beatmung mit drei verschiedenen Einstellungen oder unter Spontanatmung.

Im Anschluss an die Versuche wurden die oberen Atemwege auf den generierten 2D-Bildern mit einer klinikeigenen Software (MITK, Version 0.99.3, Abteilung Medizinische und Biologische Informatik des DKFZ, Heidelberg, Deutschland) segmentiert (111) und dreidimensional rekonstruiert (106). Die so berechneten dreidimensionalen Bronchialbäume der Versuchstiere konnten mit Hilfe einer weiteren Software (CHILI PACS, Version 4.4.0; CHILI, Dossenheim/Heidelberg, Deutschland) ausgemessen werden. Zum einen wurde das Gesamtvolumen der bildlich erfassten oberen Atemwege ermittelt, zum anderen konnte die Schnittfläche der verschiedenen Atemwegsgenerationen erhoben werden, um so eine räumliche Verteilung der Aufdehnung unter Spontanatmung und unter verschiedenen Beatmungsmodi zu bestimmen.

Die Messpunkte für die jeweiligen Schnittflächen wurden in allen Bronchialbäumen an anatomischen Strukturen festgemacht. Diese waren für die Trachea direkt oberhalb der Bifurkation und für die beiden Hauptbronchien in einer Ebene genau über der Abzweigung des rechten oberen Lappenbronchus definiert. Die Segmentbronchien wurden als die kleinsten abgrenzbaren luftführenden Strukturen, die sowohl unter mechanischer Beatmung als auch unter Spontanatmung detektierbar waren, definiert.

Der dritte Parameter, der neben Gesamtvolumen und Schnittflächen der Atemwege ausgewertet wurde, war die Röntgengichte des Lungenparenchyms, welche Aufschluss über die Belüftung der distalen Atemwege und Alveolen gibt. Auch dieser Parameter wurde mit der Software CHILI PACS ermittelt.

### 3.2.3. Intravitalmikroskopie

Auch wenn der Fokus dieser Forschungsarbeit auf der Reaktion der oberen Atemwege bei mechanischer Beatmung lag, können die Alveolen als Ort des Gasaustausches in der Gesamtbetrachtung nicht ausgeschlossen werden. Da sich die Dynamik der unteren Atemwege aufgrund der feinen anatomischen Strukturen einer Darstellung im vCT aber entzieht, eine murine Alveole ist etwa 46 µm im Durchmesser (91), musste für die Darstellung der Alveolen eine andere Methode gewählt werden. Mit Hilfe der Intravitalmikroskopie konnten die subpleuralen Alveolen direkt dargestellt und ihr Durchmesser als Maß der alveolären Aufdehnung in der endinspiratorischen Phase unter verschiedenen Beatnungsmodi ermittelt werden.

Diese Methodik wurde vor einigen Jahren am Institut für Physiologie entwickelt (63) und umfasst folgende Präparation der Versuchstiere: Wie oben beschrieben, wurden Mäuse anästhesiert und tracheotomiert, und sodann in linker Seitenlage auf einer Wärmematte beatmet. Zur Darstellung des rechten oberen Lungenlappens wurde zunächst das Fell am rechten Brustkorb trocken rasiert. Die Haut wurde ab der *Linea alba* und entlang des letzten Rippenbogens mit einer Schere eröffnet und stumpf Richtung Rücken und rechtem Vorderbein abpräpariert. Die Brustmuskulatur der rechten Brustwand wurde unter Zuhilfenahme eines Elektrokauters (ICC Bipolar, Erbe, Tübingen, Deutschland) entfernt und die Durchblutung der Intercostalmuskulatur auf Höhe der 3. - 7. Rippe für 3 Rippenzwischenräume mit dem Kauter unterbunden. Danach konnten diese Rippen und die anliegende Intercostalmuskulatur sowie das anliegende Brustfell blutungsfrei entnommen werden. Um wieder einen physiologischen *in situ* Zustand bei geschlossenem Thorax herzustellen, wurde zunächst caudodorsal ein Thoraxkatheter (0,58 mm Innendurchmesser, 0,96 mm Außendurchmesser, Polythene®; Smiths Medical International Ltd., Kent, England, Vereinigtes Königreich) eingebracht und das im Durchmesser 7-10 mm große Thoraxfenster mit einer Polyvinylmembran (New Kre wrap, Kureha, Tokyo, Japan) mit Deckglas (Ø 5mm, Firma Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) und  $\alpha$ -Cyanoacrylat (Ultra Gel, Pattex®, Henkel, Düsseldorf, Deutschland) verschlossen.

Der physiologische Unterdruck (etwa -4 mmHg) (49) des Thorax wurde durch Absaugen der Luft mittels einer 5 ml Spritze über den Thoraxkatheter aus dem nun wieder verschlossenen Brustkorb rekonstruiert und so die reibungsfreie Anheftung der Lunge an die transparente Membran des Thoraxfensters herbeigeführt (88). Die ungehinderte Lungenbewegung des rechten oberen Lungenlappens war nun, nach einer Präparationszeit von etwa 20 min, wieder möglich.

Das so vorbereitete, weiterhin beatmete Versuchstier wurde in anhaltender tiefer Narkose unter einem aufrecht stehenden Mikroskop (Axiotech Vario 100HD; Zeiss, Jena, Deutschland) so gelagert, dass das Deckglas im Lungenfenster horizontal zum Objektiv (Achroplan 10x/0,30w; Zeiss, Jena, Deutschland) lag. Mit Wasserimmersion unter Dunkelfeldbeleuchtung (RR19/8-w; Vision&Control, Suhl, Deutschland) wurden die subpleuralen Alveolen mit einer Analogkamera (CF 8/5 MX DRE, Kappa, Gleichen, Deutschland) in Echtzeit mit einer Bildrate von 60 frames/s aufgenommen und das Bild digital aufgezeichnet (DVCAM, DSR-25, Sony Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland). Offline wurden die aufgenommenen Bildsequenzen analysiert, und die Durchschnittsfläche der Alveolen für jeden Beatmungsmodus jeweils in maximaler Inspiration mit einer institutseigenen Software (VMorph 2006, Pries und Drüsedow 1998) ausgemessen.

#### **3.2.4. Kapnographie**

Neben dem bildgebenden Verfahren im vCT zur Darstellung der oberen Atemwege unter mechanischer Beatmung wurden die möglichen Effekte einer solchen Beatmung auf den physiologischen Totraum auch kapnographisch untersucht. Dies geschah zum einen, um die Ergebnisse aus den vCT-Untersuchungen zu validieren und die erwartete Zunahme des Totraums mit einer bereits etablierten Methode zu validieren (71; 78), zum anderen, um den gesamten funktionellen Totraum auszuwerten und nicht nur die durch Bildgebung detektierbaren oberen Atemwege beziehungsweise Alveolen zu erfassen.

Zur Bestimmung des funktionellen Totraums wurden die Mäuse zunächst in tiefer Anästhesie intubiert und die linke Arteria carotis communis (*A. carotis comm. sin.*) mit einem Polyethylen-Schlauch (0,28 mm Innendurchmesser, 0,61 mm Außendurchmesser, Polythene®; Smiths Medical International Ltd., Kent, England, Vereinigtes Königreich) katheterisiert. Dieser mikrochirurgische Eingriff dauert etwa 10 min und schließt sich der Intubation der Trachea unmittelbar an. Um eine Blutgerinnung am Katheter zu verhindern, wurde dieser nach jeder Blutentnahme mit etwa 0,02 ml einer heparinisierten Natriumchloridlösung (50 IU Heparin/ml einer 0,9 % NaCl- Lösung; Heparin-Natrium 25000 ratiopharm, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland und Plastipur®; Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) gespült. Durch diesen Katheter konnten wiederholt arterielle Blutproben entnommen werden, die mittels eines Blutgasanalysegerätes (RapidLab® 348; Siemens HealthCare Diagnostic GmbH, Eschborn, Deutschland) auf den arteriellen Partialdruck von CO<sub>2</sub> (PaCO<sub>2</sub>) untersucht wurden.



Während der Beatmung der Tiere gemäß Protokoll (siehe 3.3.3) wurde kontinuierlich der mittlere CO<sub>2</sub>-Gehalt im Exhalat (E<sub>CO<sub>2</sub></sub>) mittels nicht-gestreuter Infrarot-Gassensor-Methode (O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> Measuring Unit; TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland) gemessen und aufgezeichnet.

Zur Berechnung des funktionellen Totraums mittels der Bohr-Formel (97), wurde E<sub>CO<sub>2</sub></sub> zunächst in einen Partialdruck umgerechnet (P<sub>E</sub>CO<sub>2</sub>). Hierzu wurde die Fraktion des expirierten CO<sub>2</sub> (F<sub>E</sub>CO<sub>2</sub> = E<sub>CO<sub>2</sub></sub>\*100) mit dem aktuellen Luftdruck, abzüglich der Wassersättigung bei Körpertemperatur (P<sub>H<sub>2</sub>O</sub> bei 38° C = 49,7 mmHg), multipliziert:

$$P_{E}CO_2 = F_{E}CO_2 * (\text{aktueller Luftdruck} - 49,7 \text{ mmHg}).$$

Der funktionelle Totraum (V<sub>D</sub>) ließ sich anschließend berechnen als

$$V_D [\text{ml}] = V_E * (P_aCO_2 - P_{E}CO_2) / P_aCO_2,$$

wobei V<sub>E</sub> als expiriertes Volumen mit V<sub>T</sub>, dem applizierten Tidalvolumen, gleichzusetzen ist.

Hierbei wird der potentielle systemische Fehler, dass der respiratorische Quotient nicht miteinbezogen wird und es somit zu gewissen Volumenabweichungen zwischen Inspiration und Expiration kommen kann, im Interesse der besseren Anwendbarkeit in Kauf genommen.

### **3.2.5. Atemwegsdruck und Berechnung der Compliance**

Der Druck der Atemwege (P<sub>AW</sub>) wurde unter künstlicher Beatmung der Mäuse während der Kapnographie kontinuierlich überwacht. Hierzu wurde ein Druckabnehmer (MPX Type 399/2, Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland) mit dem expiratorischen Schenkel des Beatmungsgerätes nahe dem Y-Stück verbunden und die gemessenen Werte mit der Software DASYlab® (Datalog GmbH, Moenchgladbach, Deutschland) protokolliert und ausgewertet.

Mit Hilfe des so gemessenen Atemwegsdruckes und des errechneten Gesamtvolumens der oberen Atemwege aus dem vCT zu den jeweiligen Beatmungsmodalitäten und bei Spontanatmung konnte die Compliance der oberen Atemwege berechnet werden. Hierzu wurde jeweils die Volumendifferenz im Verhältnis zur Druckdifferenz zum Ausgangswert berechnet. Als Ausgangswert für das Volumen der oberen Atemwege diente der Zeitpunkt vor der Tracheotomie, also unter Spontanatmung, und ein entsprechender Atemwegsdruck von 0 mmHg, da die

Atemwege während In- und Expiration unter Spontanatmung ein offenes System darstellen und damit den Umgebungsdruck annehmen.

Die Compliance (C) der oberen Atemwege ließ sich demnach berechnen als

$$C \text{ [ml/mmHg]} = (V_X - V_0) / (P_X - P_0),$$

wobei  $V_X$  das Volumen der oberen Atemwege bei Beatmung mit den jeweiligen Tidalvolumina,  $V_0$  das Volumen unter Spontanatmung,  $P_X$  der Atemwegsdruck bei Beatmung mit den entsprechenden Tidalvolumina und  $P_0$  der Ausgangswert für den Druck unter Spontanatmung ist. Nach demselben Prinzip ließ sich auch die Compliance des funktionellen Totraums berechnen. Hierzu wurde ebenfalls die Druckdifferenz aus den bei künstlicher Beatmung gemessenen Atemwegsdrücken und der Spontanatmung herangezogen. Die Volumendifferenz wurde aus dem Volumen des funktionellen Totraums als Ergebnis der Kapnographie und dem Totraumvolumen einer spontanatmenden Maus, entlehnt aus der Literatur, berechnet. Das Tidalvolumen unter Spontanatmung wird in der Literatur für eine C57Bl/6J Maus mit etwa 7 ml/kg KG (90; 101) angegeben, der Totraum entspricht etwa 35% des Tidalvolumens (81), so dass  $V_0$  bei einer 25 g schweren Maus (Tidalvolumen = 0,175 ml/Atemzug), wie sie in der vorliegenden Studie verwendet wurden, ca. 0,06125 ml beträgt.

### 3.2.6. Histologie

Nach 50 min Beatmung mit jeweils einem der in 3.3.1 erläuterten Tidalvolumina wurden die Tiere in tiefer Anästhesie exsanguiniert, die Lunge entnommen und in einer 4%igen Formaldehydlösung fixiert. Die zu untersuchenden Lungenschnitte wurden in einem beauftragten tierpathologischen Labor (Institut für Tierpathologie, Dr. med. vet. W. Haider, Berlin) angefertigt. Hierzu wurden die eingeschickten, fixierten Lungen zunächst mittels aufsteigender Alkoholreihe entwässert, mit Xylol geklärt, anschließend in Paraffin eingebettet und am Mikrotom geschnitten. Die auf Objektträger aufgezogenen Schnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt, um feingewebliche Veränderungen darzustellen. Gebiete mit perivaskulären Hämorrhagien wurden unter dem Mikroskop (Axioplan; Zeiss, Jena, Deutschland) identifiziert, ihr Durchmesser mit der Software Neurolucida® (MicroBrightFieldBioscience, Williston, USA) quantifiziert und zum Durchmesser ( $\emptyset$ ) des betroffenen Gefäßes ins Verhältnis gesetzt:

$$\text{Perivaskuläre Blutung} = (\emptyset \text{ Blutungsfläche} / \emptyset \text{ Gefäß} * 100).$$

### 3.2.7. Isolierte Atemwege im Organbad

Zunächst sollte die Aufdehnung der Trachea unter Druckverhältnissen, wie sie bei der Beatmung mit  $15 \text{ ml/kg KG } V_T$  vorliegen, aufgezeichnet und ausgewertet werden, da die Aufdehnung der Trachea im vCT aufgrund des metallenen Tubus nicht auf ganzer Länge nachzuvollziehen war. Zudem konnten an der isolierten Trachea auch deren elastische Eigenschaften und die lokale Zytokinausschüttung unter mechanischer Beatmung untersucht werden.

Hierzu wurde frisch euthanasierten Tieren die Trachea zwischen Ringknorpel (*Cartilago cricoidea*) und Bifurkation herauspräpariert, beidseits auf abgeschliffene, stumpfe Kanülen (23G, Außendurchmesser 0,6 mm) gezogen und mit Fäden fixiert, sodass der mittlere Teil der Trachea, etwa 3 mm, frei beweglich zwischen den beiden Kanülenspitzen war. Das Organbad und auch die Trachea selbst wurden mit PBS gefüllt und druckgesteuert beatmet ( $17 \text{ cmH}_2\text{O}$  inspiratorischer Spitzendruck (PIP),  $2 \text{ cm H}_2\text{O}$  PEEP, 100 bpm, siehe Punkt 3.3.5).

Die im Organbad beatmeten Tracheen wurden, entsprechend der Intravitalmikroskopie der Alveolen, mit dem Mikroskop und einem 4fachen Objektiv (4x/0,12; Leitz, Wetzlar, Deutschland) unter Dunkelfeldbeleuchtung visualisiert und die Bilder über eine Kamera aufgenommen und digitalisiert aufgezeichnet. Im Anschluss wurde mittels der VMorph 2006-Software der Durchmesser der Trachea an den bindegewebigen Zwischenknorpelringen (*Ligamenta anularia*) bei maximaler Dilatation unter Inspiration im Vergleich zur expiratorischen Entspannungsphase als Maß der beatmungsinduzierten Atemwegsdehnung ausgemessen.

Die elastischen Eigenschaften der Atemwege wurden zusätzlich mit Hilfe des *Isolated Airway Module* (IAM, FV-IAM-TB20) des Beatmungsgerätes FlexiVent® (Scireq Inc. Montreal, Kanada) gemessen. Die Compliance der Trachea von Mäusen konnte somit direkt mit der Compliance der im Durchmesser ähnlichen Segmentbronchien des Schweins verglichen werden. Hierzu wurden, wie oben beschrieben, murine Tracheen präpariert und auf Kanülen im Organbad fixiert. Die Segmentbronchien der Schweine wurden aus dem Parenchym stumpf freipräpariert und in Durchmesser und Länge den Maustracheen ähnliche Segmente identifiziert. Seitliche Bronchialäste (etwa 2-3 je untersuchtem Segment) wurden mit Fäden abgebunden, sodass ein einfacher Atemweg ohne Verzweigungen auf den Kanülen im Organbad platziert werden konnte. Das Lumen der isolierten Atemwege, also Tracheen beziehungsweise Segmentbronchien, sowie das angeschlossene Schlauchsystem wurden mit PBS gefüllt. Am distalen Ende wurde ein PEEP von  $2 \text{ cmH}_2\text{O}$  mithilfe eines PBS-Reservoirs aufrechterhalten. Das IAM durchströmte die jeweils

eingespannten Atemwege über eine computergesteuerte Spritze mit einem Flow von 20 ml/h und berechnete über die aufgezeichneten Druck-Volumen-Schleifen die Compliance des untersuchten Atemwegs.

Nach der Messung der Compliance wurden einige Atemwege für eine exemplarische histologische Darstellung des Querschnitts der Atemwege wie oben beschrieben aufgearbeitet.

Die Messung proinflammatorischer Zytokine in beatmeten isolierten Luftröhren erfolgte im Organbad für isolierte Organe (FlexiVent®; Scireq Inc. Montreal, Kanada). Hierzu wurden die Tracheen wie oben beschrieben freipräpariert und Schlauchsystem, Trachea und Organbad mit PBS gefüllt. Nach 4 h isolierter Beatmung wurde das intratracheale Flüssigkeitsvolumen, verdünnt mit der Flüssigkeit aus den gefüllten Kanülen, insgesamt etwa 0,05 ml, über die Kanülen entnommen und bei -80°C gelagert. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden die Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Makrophagen inflammatorisches Protein-2 (MIP-2) mittels kommerziell erhältlichen *Enzyme-linked Immunosorbent Assays* (ELISA) (Quantikine®; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) nach dem Herstellerprotokoll quantifiziert.

### **3.3. Studiendesign und Protokolle**

Für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde die Gesamtheit der verwendeten Versuchstiere auf insgesamt 5 Protokolle aufgeteilt. Hierbei gilt es zu beachten, dass die Versuche im vCT, Protokolle 3.3.1 und 3.3.2, am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg (DKFZ), Abteilung für Radiologie, durchgeführt wurden und alle anderen Untersuchungen in den Laboren des Instituts für Physiologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin stattfanden.

#### **3.3.1. Protokoll 1: Kontinuierliche Beatmung während der Bildgebung im vCT**

Um den möglichen Effekt einer andauernden mechanischen Beatmung auf die Dimensionen der oberen Atemwege zu untersuchen, wurden Mäuse in 3 unterschiedliche Gruppen (jeweils n= 4-5) eingeteilt. Jede Gruppe wurde 50 Minuten mit einem anderen Tidalvolumen ( $V_T$ ) beatmet, während vCT Scans unter Spontanatmung und zu diversen Zeitpunkten unter mechanischer Beatmung aufgenommen wurden (siehe Abbildung 2). Am Ende des Versuches wurden die Tiere mit einer Überdosis Narkotikum euthanasiert, der Tod mittels cervikaler Dislokation sichergestellt und die Kadaver entsorgt.

Dem gleichen Protokoll einer 50 minütigen kontinuierlichen Beatmung mit den jeweiligen Tidalvolumina wurden auch die Tiere für die histologische Untersuchung zugeführt. Jede der 3 Tidalvolumen-Gruppen umfasste 3 Tiere, bei denen die Lunge jeweils auf 3 Ebenen geschnitten wurde. In jeder Ebene wurden 15 Gefäße ausgewertet. Pro Gruppe wurden also  $n=135$  Gefäße in die Quantifizierung der perivaskulären Blutungen aufgenommen. An diesen Tieren wurden keine Untersuchungen im vCT durchgeführt.

#### Gruppe 1: Protektive Beatmung mit 6 ml/kg KG $V_T$

Angelehnt an die ARDS-Netzwerk Studie von 2000 (1) wurde eine Gruppe mit einem niedrigen, protektiven  $V_T$  von 6 ml/kg KG bei einer Atmungsfrequenz von 170 bpm, einem PEEP von 2 cmH<sub>2</sub>O und einer  $FiO_2$  von 1,0 beatmet. Hierfür wurden die Tiere zunächst in Narkose versetzt, auf einer Heizmatte in Rückenlage fixiert und nach der Tracheotomie intubiert.

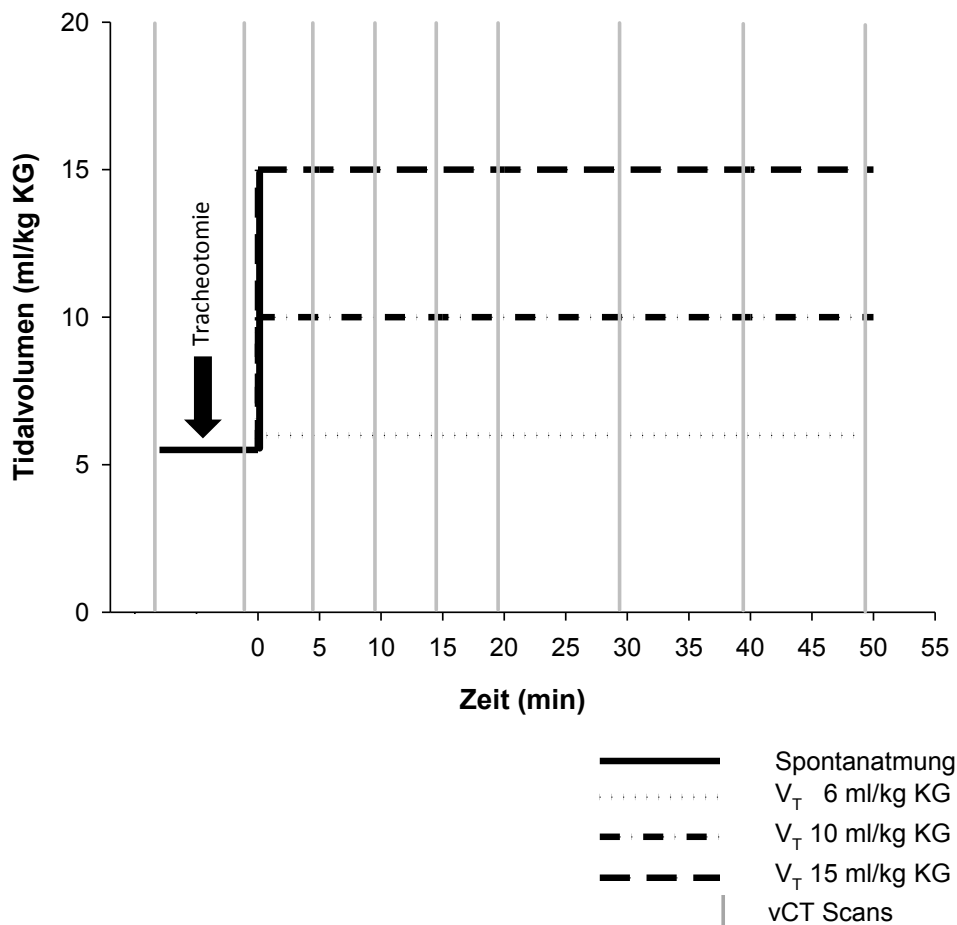
Die vCT-Bilder wurden -zur Kontrolle von Effekten durch die Intubation- vor und nach der Tracheotomie und -zur Messung von Effekten durch die Beatmung- zu den Zeitpunkten 5, 10, 15, 20, 30, 40 und 50 (in Minuten nach Beatmungsbeginn) aufgenommen.

#### Gruppe 2: Konventionelle Beatmung mit 10 ml/kg KG $V_T$

Auf dem Gebiet der experimentellen Kreislaufforschung an Mäusen gilt ein  $V_T$  zwischen 8,5 und 12 ml/kg KG als Standard für die mechanische Beatmung (110). Die zweite Gruppe wurde dementsprechend mit einem  $V_T$  von 10 ml/kg KG und einer Atmungsfrequenz von 150 bpm beatmet, PEEP und inspirierte Sauerstofffraktion blieben unverändert bei 2 cmH<sub>2</sub>O bzw. 1,0. Die Scans fanden zu denselben Zeitpunkten wie bei der protektiven Beatmung statt.

#### Gruppe 3: Überbeatmung mit 15 ml/kg KG $V_T$

Auch diese Gruppe wurde 50 min mit reinem Sauerstoff ( $FiO_2$  1,0) und einem PEEP von 2 cmH<sub>2</sub>O beatmet, das Atemzugvolumen wurde in dieser Gruppe jedoch auf 15 ml/kg KG hochgesetzt und die Atmungsfrequenz auf 100 bpm reduziert. Letzteres erfolgte wie auch in Gruppe 2, um vergleichbare Atemzeitvolumen und CO<sub>2</sub>-Level zwischen den verschiedenen Gruppen zu erhalten. Ein Tidalvolumen von 15 ml/kg KG wird allgemein als lungenschädigend angesehen (58).



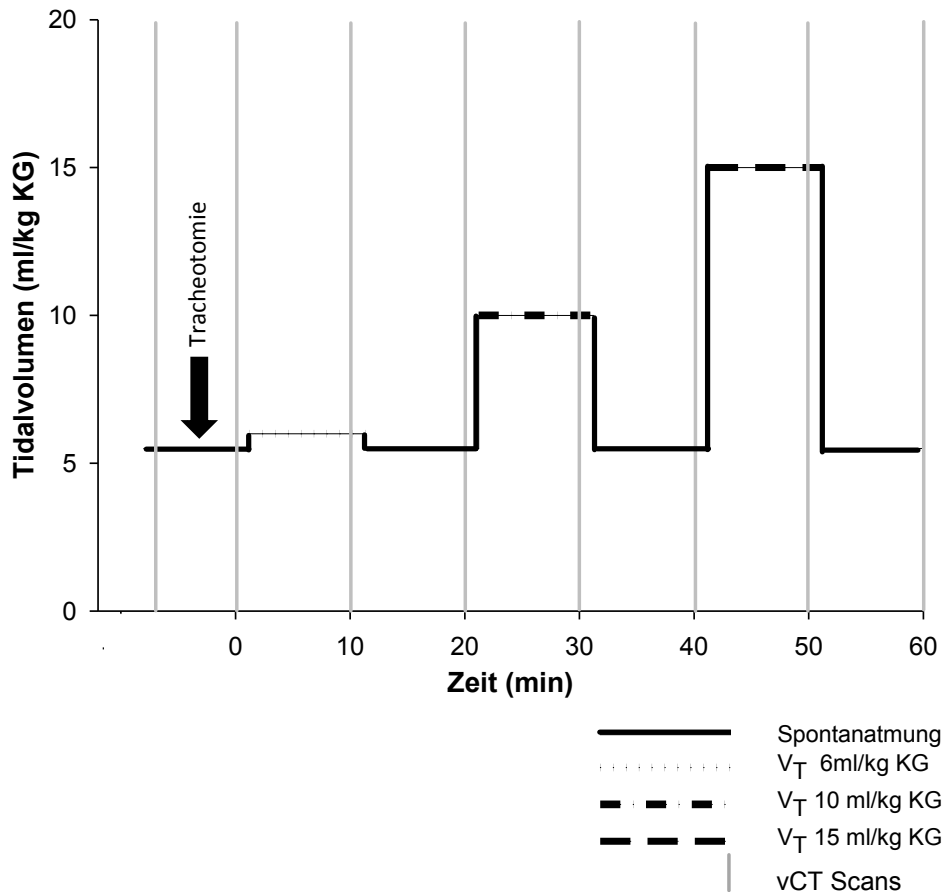
**Abbildung 2: Kontinuierliche Beatmung während der Bildgebung im vCT**

Schematische Darstellung des experimentellen Protokolls der ersten drei Versuchsgruppen. Der erste vCT Scan erfolgt an der anästhesierten, spontanatmenden Maus, der zweite Scan an der tracheotomierten (Pfeil), anästhesierten und spontanatmenden Maus. Danach erfolgen Scans in regelmäßigem Abstand an der anästhesierten und mechanisch beatmeten Maus jeweils unter den vorgegebenen Tidalvolumina.

### 3.3.2. Protokoll 2: Intermittierende Beatmung während der Bildgebung im vCT

Um zu überprüfen, ob etwaige Veränderungen, die durch die mechanische Beatmung mit verschiedenen Tidalvolumina zustande kommen, reversibel sind, wurde zusätzlich eine vierte Gruppe ( $n=4$ ) intermittierend mit wechselnden Tidalvolumina beatmet. Auch hierbei wurden zunächst vCT-Aufnahmen der anästhesierten beziehungsweise tracheotomierten Maus unter Spontanatmung gemacht und im Anschluss daran erfolgten 10 minütige Beatmungsintervalle mit den Tidalvolumina 6, 10 und 15 ml/kg KG in aufsteigender Reihenfolge, jetzt jedoch im Wechsel mit Spontanatmungsintervallen derselben Zeitspanne. Hierzu wurden die Tiere vom

Beatmungsgerät getrennt und die Spontanatmung setzte nach kurzer Zeit ( $< 1$  min) wieder ein. Jeweils zum Ende des Intervalls wurden entsprechende vCT-Scans durchgeführt (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Intermittierende Beatmung während der Bildgebung im vCT**

Schematische Darstellung des experimentellen Protokolls der vierten Versuchsgruppe. Der erste vCT Scan erfolgt an der anästhesierten, spontanatmenden Maus, der zweite Scan an der tracheotomierten (Pfeil), anästhesierten und spontanatmenden Maus. Danach erfolgen Scans alle 10 Minuten an der anästhesierten und mechanisch beatmeten Maus jeweils zu den vorgegebenen Tidalvolumina beziehungsweise unter Spontanatmung.

### 3.3.3. Protokoll 3: Kapnographie zur Messung des funktionellen Totraums

Zur Messung des funktionellen Totraums wurden Tiere einer weiteren Gruppe ( $n=5$ ) jeweils in Rückenlage beatmet. Die mechanische Beatmung erfolgte auch hier mit schrittweise erhöhten Tidalvolumina gemäß Abbildung 3, diesmal allerdings unter Verzicht auf die Spontanatmungsphasen. Nach jeweils 10 minütiger Beatmung wurden der  $\text{CO}_2$ -Gehalt in der

ausgeatmeten Luft und der CO<sub>2</sub>-Partialdruck im arteriellen Blut gemessen und der funktionelle Totraum mittels der Bohr-Formel berechnet.

#### **3.3.4. Protokoll 4: Intravitalmikroskopie zur Messung der alveolären Aufdehnung**

Den Tieren dieser Gruppe (n=3) wurde zunächst operativ ein Lungenfenster eingesetzt. Sodann wurden sie unter dem Mikroskop für jeweils 10 Minuten in randomisierter Reihenfolge mit den drei Beatmungsmodi (6, 10 bzw. 15 ml/kg KG Tidalvolumen) beatmet. Aufgrund der sehr tiefen Narkose, die für den invasiven Eingriff am Thorax unabdingbar ist, wurde hier auf eine Untersuchung unter Spontanatmung verzichtet. Nach einer Beobachtungszeit von 30 min wurden die Tiere mit einer Überdosis Narkotikum euthanasiert und der Tod durch cervikale Dislokation sichergestellt.

#### **3.3.5. Protokoll 5: Beatmung isolierter Atemwege im Organbad**

Zur Dokumentation der Dehnbarkeit der Tracheen wurden die Durchmesser von 3 beatmeten Luftröhren, wie unter 3.2.7 beschrieben, in End-Inspiration und End-Expiration mittels Intravitalmikroskopie ausgemessen.

Zur weiterführenden Messung der Compliance der isolierten Atemwege wurden 3 Gruppen (jeweils n=6) von Mäusen zunächst über eine Stunde gemäß Protokoll 1 beatmet, um eine mögliche Veränderung der Volumendehnbarkeit durch die Beatmung mit Tidalvolumina von 6 bis 15 ml/kg KG zu ermitteln. Anschließend wurden die Tiere in tiefer Allgemeinanästhesie getötet, die Tracheen entnommen und sofort ihre Compliance mittels Druck-Volumen-Schleifen wie unter 3.2.7 beschrieben im IAM untersucht.

Des Weiteren wurden Versuche mit zuvor nicht beatmeten murinen Tracheen und porcinen Segmentbronchien durchgeführt. Von beiden Spezies wurden jeweils n=6 Atemwege isoliert, im IAM eingespannt und die Compliance berechnet.

Mögliche proinflammatorische Effekte, die durch eine Aufdehnung der oberen Atemwege bei mechanischer Beatmung auftreten könnten, wurden an isoliert beatmeten Tracheen von Mäusen untersucht. Die Luftröhren von 10 Tieren wurden über 4 h mit einem PIP von 17 cmH<sub>2</sub>O, einem PEEP von 2 cmH<sub>2</sub>O und einer Frequenz von 100 bpm beatmet. Weitere 10 Tracheen, die zwar entsprechend präpariert, aber nicht beatmet wurden, dienten als Kontrolle.



### 3.4. Statistik

Die statistische Auswertung der hier vorgestellten Daten erfolgte mit dem Programm SigmaPlot 11.0® (Systat Software, Chicago, IL, USA). In den Abbildungen sind jeweils die Mittelwerte der Daten und die zugehörige Standardabweichung (SD) dargestellt. Zur besseren Übersichtlichkeit ist in den Abbildungen jeweils nur entweder der positive oder der negative Ausschlag der Standardabweichung dargestellt.

Um signifikante Unterschiede innerhalb einer Gruppe zu zwei verschiedenen Zeitpunkten zu detektieren, wurde für normalverteilte Daten der gepaarte t-Test beziehungsweise der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test bei nicht-normalverteilten Werten verwendet.

Wurden mehrere Messzeitpunkte innerhalb einer Gruppe untersucht, wurde der nicht-parametrische Friedman-Test hinzugezogen. Wiesen die Daten Varianzhomogenität und Normalverteilung auf, wurden signifikante Unterschiede mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse detektiert und zur genauen Bestimmung mit einem entsprechenden *post-hoc*-Test eingegrenzt.

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen zwei unabhängigen Gruppen ohne Normalverteilung wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. Sollten mehr als zwei unabhängige Gruppen verglichen werden, wurde der Kruskal-Wallis-Test mit einer entsprechenden *post-hoc*-Analyse durchgeführt. Normalverteilte und homoskedastizitäre Daten wurden mit der einfaktoriellen Varianzanalyse und ebenfalls entsprechender *post-hoc*-Analyse auf Signifikanzen untersucht.

Korrelationen zwischen nicht-normalverteilten Parametern wurden mittels Spearman's Rangkorrelationskoeffizienten ( $r_s$ ) berechnet, normalverteilte Parameter wurden mittels Pearson-Product Korrelation ( $r$ ) analysiert.

Der jeweils verwendete Test wird bei den entsprechenden Abbildungen angegeben.

Eine statistische Signifikanz wurde bei  $p < 0,05$  angenommen.

## 4. Ergebnisse

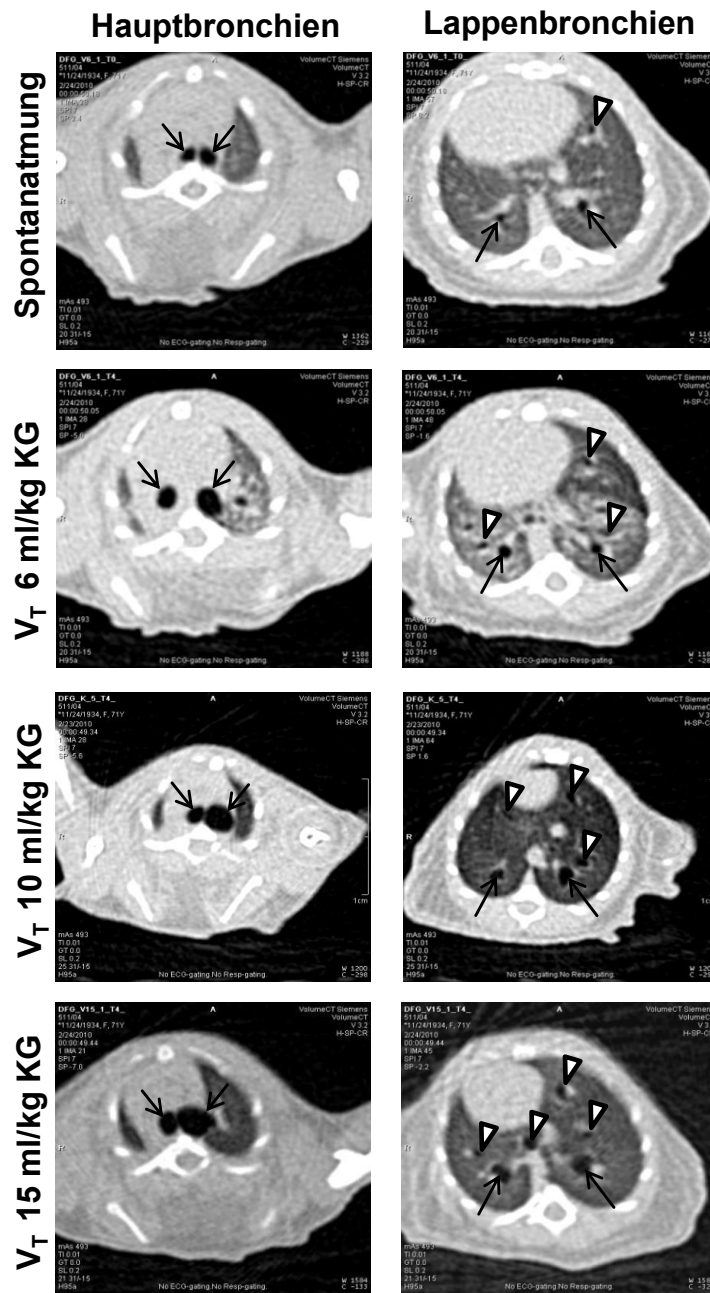
### 4.1. Mechanische Beatmung führt bei Mäusen zu einer reversiblen, nicht-linearen Aufdehnung der oberen Atemwege

Die mechanische Beatmung von Mäusen führte unter allen hier beschriebenen Beatmungsmodalitäten zu einer deutlich sichtbaren Aufdehnung der oberen Atemwege. Dies konnte sowohl mit dem bildgebenden Verfahren des vCT als auch mit der kapnographischen Methode gezeigt werden. Die Aufdehnung der Atemwege war bei Rückkehr zur Spontanatmung vollständig reversibel. Auffällig war jedoch, dass eine Beatmung mit 15 ml/kg KG Tidalvolumen zu einer geringeren Aufdehnung der Hauptbronchien führte, als eine Beatmung mit 10 ml/kg KG  $V_T$ . Damit einhergehend konnte gezeigt werden, dass bei eben diesem großen Tidalvolumen von 15 ml/kg KG  $V_T$  die Alveolen, also die distalen Atemwege, sprunghaft geweitet werden. Dies wurde in der intravitalmikroskopischen Untersuchung der subpleuralen Alveolen deutlich und bestätigte sich in der Röntgendichtigkeitsanalyse der vCT-Aufnahmen, die eine deutlich gesteigerte Belüftung des Parenchyms, also der distalen Atemwege und der Alveolen, unter einer Beatmung mit 15 ml/kg KG  $V_T$  aufzeigte.

#### 4.1.1. Die Aufdehnung der oberen Atemwege im vCT

Vier Gruppen von Versuchstieren (jeweils n=3-5 Mäuse) wurden nach den in 3.3.1 und 3.3.2 ausgeführten Protokollen anästhesiert, tracheotomiert, mit verschiedenen Tidalvolumina beatmet und unter diesen Bedingungen oder spontanatmend im vCT untersucht.

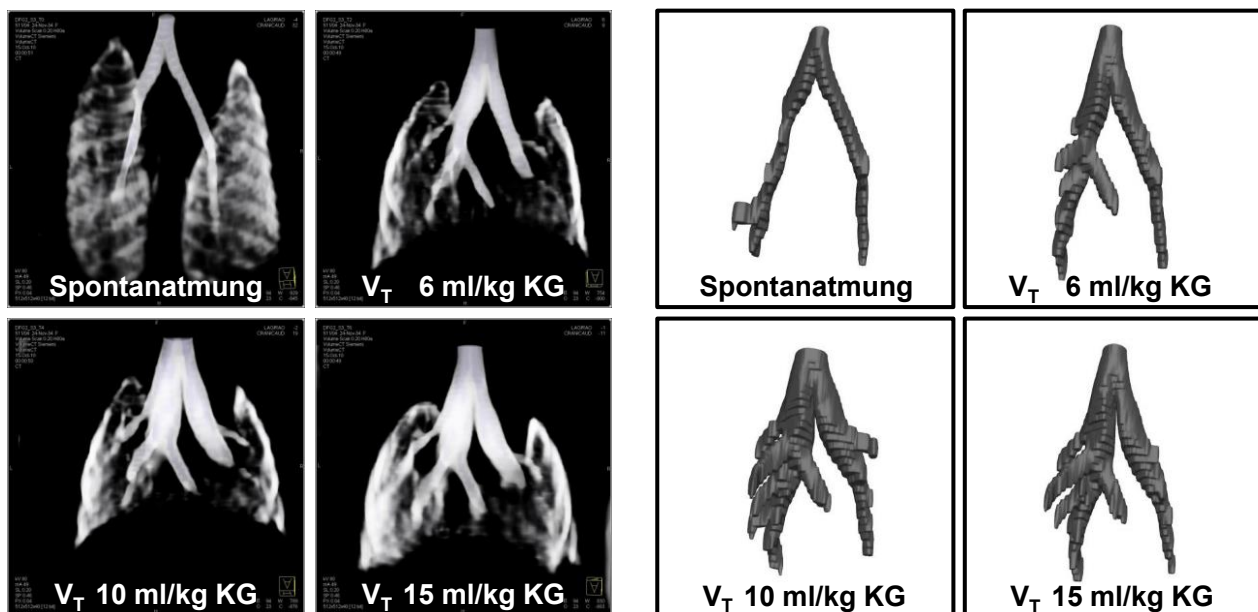
Repräsentative Aufnahmen der vCT-Scans, wie sie in Abbildung 4 zu sehen sind, zeigen Axialschnitte jeweils einer Maus in Rückenlage unter Spontanatmung (obere Reihe) beziehungsweise nach 50 min Beatmung (Protokoll 1) mit den angegebenen Tidalvolumina (Reihe 2-4) je in zwei Ebenen. Zum einen wird die Aufdehnung der beiden Hauptbronchien (beide Spalten, Pfeile) unter mechanischer Beatmung deutlich, zum anderen lassen sich mit steigendem Tidalvolumen zunehmend auch kleinere Atemwege (rechte Spalte, Pfeilspitzen) ausmachen.



**Abbildung 4: Exemplarische Darstellung der oberen Atemwege im vCT**

Dargestellt sind repräsentative vCT Scans von Mäusen in Rückenlage, die unter Spontanatmung (obere Zeile) beziehungsweise nach 50-minütiger mechanischer Beatmung mit einem Tidalvolumen von entweder 6, 10 oder 15 ml/kg KG (Zeile 2-4) aufgenommen wurden. Sie zeigen die oberen Atemwege auf Höhe der Hauptbronchien (linke Spalte, Pfeile) und auf Höhe der Lappen- (rechte Spalte, Pfeile) und Segmentbronchien (Pfeilspitzen). Für die Auswahl der Schnittebene wurden anatomische Orientierungspunkte wie die Lage der Scapula, des Herzens und die Verzweigungen des Bronchialbaums hinzugezogen, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Bei allen Formen der mechanischen Beatmung ist gegenüber Spontanatmung eine deutliche Erweiterung der oberen Atemwege zu erkennen.

Um diese Beobachtungen quantitativ analysieren zu können, wurden die zweidimensionalen Scans segmentiert und dreidimensional rekonstruiert. Der einzelne Bronchialbaum konnte dadurch volumetrisch erfasst und die Veränderung des detektierbaren Totraums zu den verschiedenen Zeitpunkten verglichen werden. Bei Abbildung 5 handelt es sich um repräsentative Bearbeitungsschritte aus den Scans einer einzelnen Maus, die gemäß Protokoll 2 (Intermittierende Beatmung) beatmet wurde. Es wird deutlich, dass mit zunehmenden Tidalvolumina weitere kleinere Atemwege volumetrisch erfasst werden können.



**Abbildung 5: Segmentierter und dreidimensional rekonstruierter Bronchialbaum einer Maus**

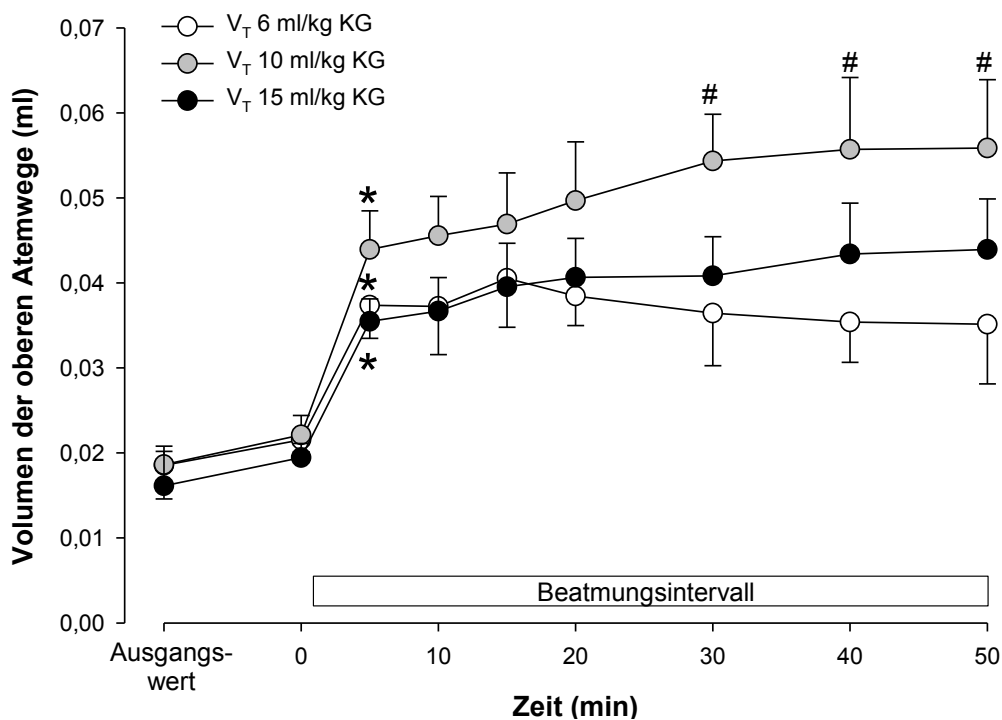
Die hier dargestellten segmentierten vCT Scans der Atemwege und Anteilen der Lunge einer einzelnen Maus (linkes Quartett) und die daraus rekonstruierten dreidimensionalen Bronchialbäume (rechtes Quartett) zur quantitativen Analyse machen die Volumenzunahme unter mechanischer Beatmung zum einen durch eine Zunahme der Anzahl detektierbarer Atemwege, zum anderen durch die Durchmesserergrößerung der einzelnen Atemwegsegmente mit zunehmendem Tidalvolumen deutlich.

#### 4.1.1.1. Die Aufdehnung unter kontinuierlicher Beatmung im vCT

Bei allen Untersuchungen im vCT zeigte sich, dass es bereits nach der Tracheotomie in den spontanatmenden Mäusen zu einem zwar nicht signifikanten, aber auffälligen Anstieg des Volumens der oberen Atemwege kommt. Dieser Befund ist höchstwahrscheinlich einem Sympathikotonus-Anstieg zuzuschreiben, der bei der durchgeführten Tracheotomie durch den Hautschnitt, Mobilisierung der Halsmuskulatur und die Kanülierung der Luftröhre hervorgerufen wird, der adrenerg die  $\beta_2$ -Rezeptoren aktiviert. Dies führt zu einer Bronchodilatation und damit zur

Volumenzunahme der hier untersuchten Atemwege. Um diesen Effekt auszugleichen, wurde als Referenzwert für die verschiedenen Beatmungsmodi jeweils „Spontanatmung nach Tracheotomie“ (Zeitpunkt 0 min) verwendet. Abweichungen von dieser Regel sind im Folgenden jeweils individuell hervorgehoben und begründet.

Die Auswertung der mittels vCT erfassbaren oberen Atemwege der spontanatmenden beziehungsweise mechanisch beatmeten Mäuse (siehe Abbildung 6) zeigte, dass es bereits nach knapp 5 min Beatmungszeit nahezu zu einer Verdopplung des Volumens der oberen Atemwege kommt. Dieser deutliche Effekt war in allen Beatmungsmodalitäten signifikant im Vergleich zum entsprechenden Spontanatmungs-Wert nach der Tracheotomie und blieb unter anhaltender mechanischer Beatmung mit 6 und 15 ml/kg KG Tidalvolumen über 50 min plateauartig bestehen. Die Beatmung mit 10 ml/kg KG  $V_T$  führte demgegenüber über die Zeit zu einer progressiven Aufdehnung und erreichte nach 30 min Beatmung signifikant höhere Totraum-Volumina als bei der Beatmung mit 6 ml/kg KG  $V_T$ . Nach diesem Zeitpunkt stieg das Volumen im Beobachtungszeitraum auch hier nicht weiter an und verblieb in einer Plateauphase.



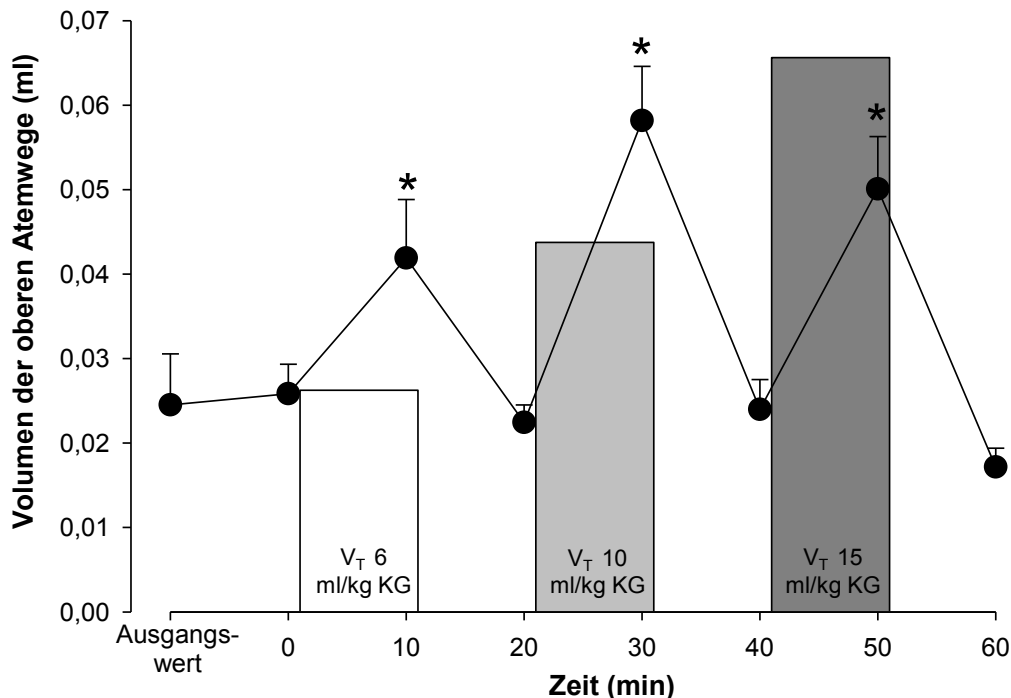
**Abbildung 6: Quantitative Dehnung der oberen Atemwege unter kontinuierlicher Beatmung**

Die volumetrische Auswertung der vCT-Scans von Mäusen unter Spontanatmung, spontanatmend nach der Tracheotomie und unter kontinuierlicher mechanischer Beatmung über 50 Minuten mit entweder 6, 10 oder 15 ml/kg KG Tidalvolumen zeigt einen deutlichen Anstieg des anatomischen Totraums der oberen Atemwege unter mechanischer Beatmung. Daten sind Mittelwerte und SD aus jeweils n=3-5 Tieren. \*p < 0,05 gegen „Spontanatmung nach Tracheotomie“ zum Zeitpunkt 0 (Signifikanz gilt auch für alle nachfolgenden Messzeitpunkte). Einfaktorielle Varianzanalyse für mehrere Messzeitpunkte mit anschließendem Dunnett's Test gegen t=0. #p < 0,05 gegen entsprechenden Zeitpunkt bei Beatmung mit V<sub>T</sub> 6 ml/kg KG. Einfaktorielle Varianzanalyse mit anschließender Holm-Sidak-Analyse.

#### 4.1.1.2. Die Aufdehnung unter intermittierender Beatmung im vCT

Die beschriebene signifikante Aufdehnung der oberen Atemwege unter mechanischer Beatmung ließ sich auch in der vierten Gruppe, die im Wechsel mit Spontanatmungsintervallen mit den drei Beatmungsmodalitäten ventilert wurde, nachweisen (Abbildung 7). Auch konnte in diesem Versuch bereits nach 10 min Beatmung gezeigt werden, dass eine Beatmung mit 10 ml/kg KG V<sub>T</sub> zu einer stärkeren Erweiterung des Totraumvolumens führt, als eine Beatmung mit 6 oder 15 ml/kg KG V<sub>T</sub>. Neben der Bestätigung dieser bereits in den kontinuierlich beatmeten Gruppen gemachten Beobachtung konnte hier zudem gezeigt werden, dass die Aufdehnung der oberen Atemwege unter Spontanatmung im Beobachtungszeitraum von 3 Intervallwechseln vollständig reversibel ist. Dabei ist zu beachten, dass die Verbindungslinien zwischen den Datenpunkten nicht das exakte Verhalten der Funktion zwischen den Messzeitpunkten darstellen, sondern diese nur verbinden, so

dass die Reversibilität eventuell bereits schon vor dem Ablauf des zehninütigen Spontanatmungsintervalls abgeschlossen ist.



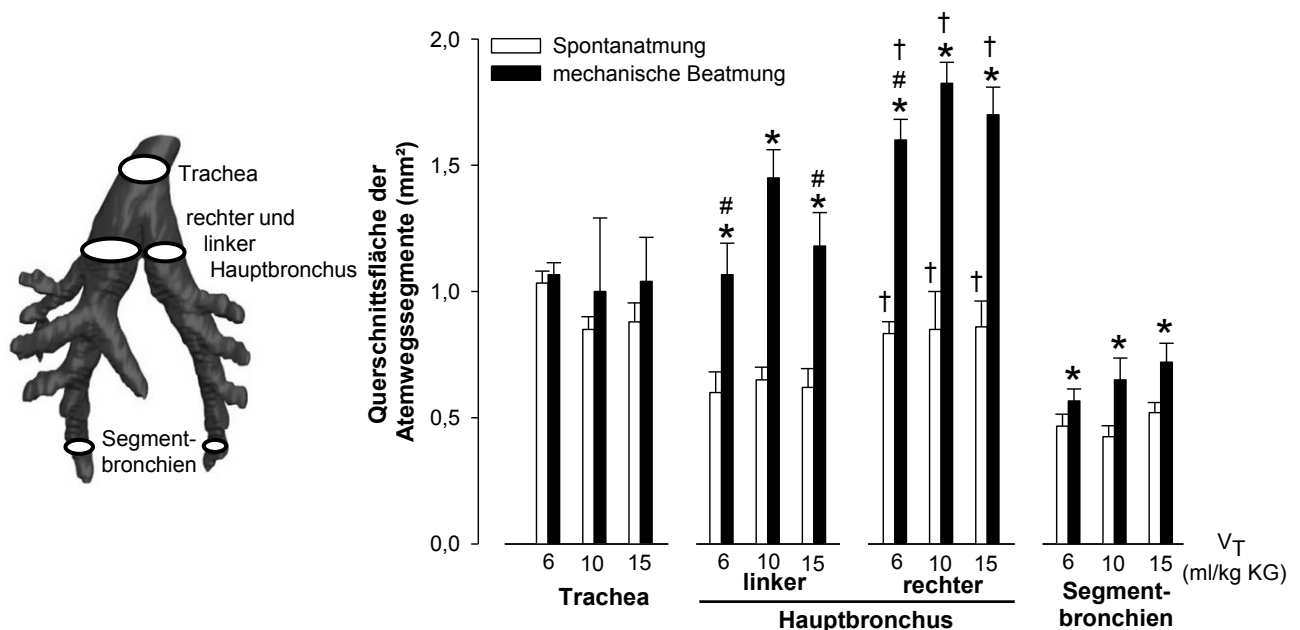
**Abbildung 7: Quantitative Dehnung der oberen Atemwege unter intermittierender Beatmung**

Die Analyse der vCT-Scans von Mäusen unter Spontanatmung vor und nach Tracheotomie und bei intermittierender mechanischer Beatmung mit 6, 10 und 15 ml/kg KG  $V_T$  (Balken) zeigt eine vollständige Reversibilität der Aufdehnung der oberen Atemwege. Daten sind Mittelwerte und SD von  $n=4$  Tieren. \* $p < 0,05$  gegen den vorangehenden und nachfolgenden Wert unter Spontanatmung. Einfaktorielle Varianzanalyse mit anschließender Holm-Sidak-Methode (paarweise gegeneinander verglichen).

#### 4.1.1.3. Die Lokalisation der Aufdehnung im Bronchialbaum im vCT

Nachdem in den vorangegangenen Versuchen gezeigt werden konnte, dass es unter mechanischer Beatmung mit zunehmenden Tidalvolumina zu einer deutlichen, nicht linearen und reversiblen Aufdehnung der oberen Atemwege kommt, sollte anschließend untersucht werden, wie diese Aufdehnung über den Bronchialbaum verteilt ist. Hierzu wurden die Querschnittsflächen der einzelnen Atemwegsabschnitte von Tieren, die 20 min mit den jeweiligen Tidalvolumina beatmet wurden (Protokoll 1) an den segmentierten vCT Scans ausgemessen (Abbildung 8). Während es in der Trachea *in vivo* kaum zu einer Erweiterung kam, was vermutlich teilweise der Intubation, teilweise den anatomischen Gegebenheiten (Knorpelringe) zuzuschreiben ist, war die flächenmäßig größte Aufdehnung in den beiden Hauptbronchien lokalisiert. Hier wurde erneut deutlich, dass diese Aufdehnung nicht linear zum ansteigenden Tidalvolumen verläuft, sondern

glockenkurven-artig ein Maximum bei mittlerem Atemzugvolumen zeigt. Ebenfalls dem Situs geschuldet (44) ist die Tatsache, dass der linke Hauptbronchus sowohl unter Spontanatmung als auch unter mechanischer Beatmung wesentlich schwächer ausgeprägt ist, da das Herz auf dieser Seite den Großteil des Thorakalraums beansprucht. Im Gegensatz zu den Hauptbronchien weisen die distalen Segmentbronchien eine progressive Aufdehnung mit zunehmendem Tidalvolumen auf ( $r = 0,63$ ,  $P < 0,05$ , Pearson-Korrelation), und zeigen dabei ebenfalls eine signifikante Aufdehnung im Vergleich zur jeweiligen Spontanatmungsphase.



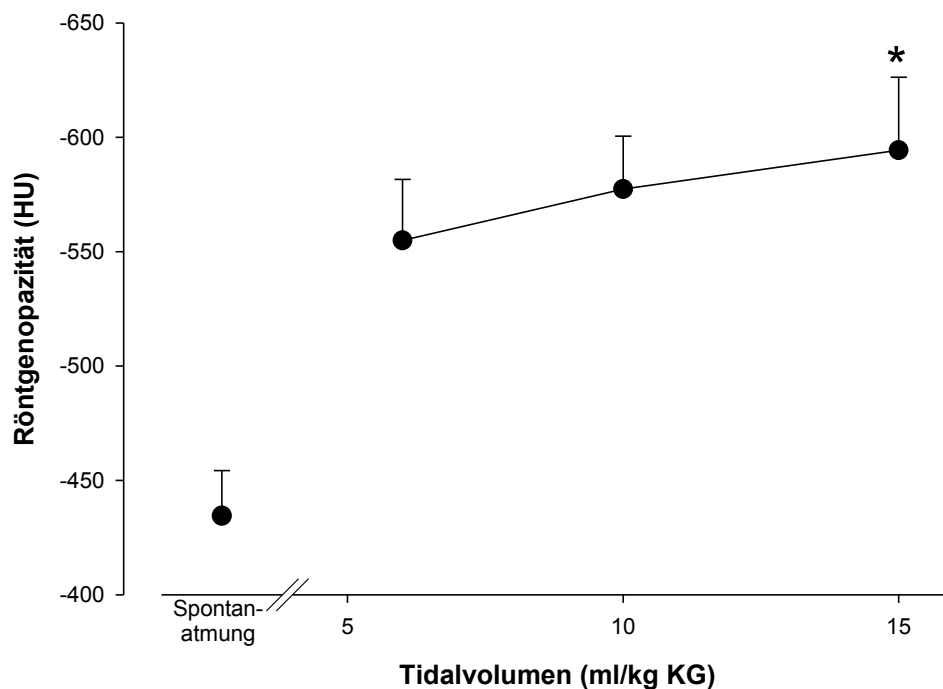
**Abbildung 8: Lokalisation der Aufdehnung der oberen Atemwege im Bronchialbaum**

Die nähere Analyse der vCT-Daten hinsichtlich der Verteilung der Beatmungs-induzierten Effekte über den Bronchialbaum zeigt eine unregelmäßige Aufdehnung der oberen Atemwege in den einzelnen Abschnitten des visualisierbaren Bronchialbaums unter mechanischer Beatmung über 20 Minuten mit 6, 10 und 15 ml/kg KG  $V_T$ . Die Darstellung des Bronchialbaums (links) dient der Orientierung. Während die Trachea sich nur geringgradig dehnt, zeigen die Hauptbronchien die deutlichste Aufdehnung in der beschriebenen nicht-linearen Weise. Die kleineren Segmentbronchien hingegen zeigen eine lineare Erweiterung mit zunehmendem Tidalvolumen. Daten sind Mittelwerte und SD von  $n = 3-5$  Tieren. \* $p < 0,05$  gegen den entsprechenden Ausgangswert unter Spontanatmung (gepaarter t-Test), # $p < 0,05$  gegen die entsprechende Aufdehnung bei einem  $V_T$  mit 10 ml/kg KG (einfaktorielle Varianzanalyse mit anschließender Holm-Sidak-Methode, paarweise gegeneinander verglichen) und † $p < 0,05$  gegen den jeweiligen linken Hauptbronchus (gepaarter t-Test).



#### 4.1.1.4. Die Belüftung des Lungenparenchyms im vCT

Der Befund, dass sich die Segmentbronchien mit zunehmendem Tidalvolumen in linearer Weise aufdehnen, sollte im Folgenden weiter untersucht werden, da die distalen Atemwege den Hauptteil des Atemwegsvolumens ausmachen und damit entscheidend zur Belüftung der Lunge beitragen. Da sich die feineren Strukturen der distalen Atemwege einer volumetrischen Analyse im vCT entziehen, wurde als erster Anhaltspunkt die semiquantitative Analyse der Röntgendichte des Lungenparenchyms herangezogen (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Die Röntgendichte des Lungenparenchyms im vCT**

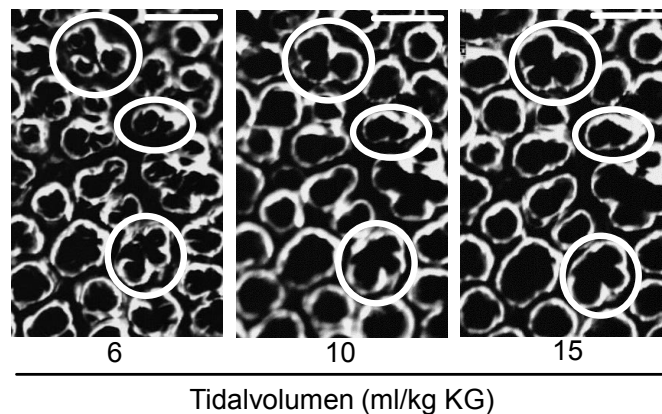
Die Untersuchung der vCT-Scans hinsichtlich der Röntgendichte des Lungenparenchyms nach 50 min mechanischer Beatmung mit einem Tidalvolumen von 6, 10 oder 15 ml/kg KG zeigt eine linear mit dem Tidalvolumen ansteigende Belüftung, die deutlich höher ist als unter Spontanatmung nach Tracheotomie. Daten sind Mittelwerte und SD von  $n = 3-5$  Tieren. \* $p < 0,05$  gegen 6 ml/kg KG  $V_T$ . Einfaktorielle Varianzanalyse mit anschließender Holm-Sidak-Methode, paarweise gegeneinander verglichen.

Mit diesem Parameter konnte an den vCT-Scans der Mäuse, die für 50 min mit den jeweiligen Tidalvolumina beatmet wurden, gezeigt werden, dass es zum einen unter mechanischer Beatmung zu einer deutlich höheren Belüftung des Lungenparenchyms kommt als unter Spontanatmung, zum anderen dass es nachweislich mit zunehmendem Tidalvolumen zu einer linear abnehmenden Röntgenopazität kommt ( $r = 0,63$ ,  $p < 0,05$ , Pearson-Korrelation). Diese erhöhte Belüftung

erreichte bei 15 ml/kg KG  $V_T$  Signifikanz im Vergleich zur Beatmung mit dem niedrigsten Tidalvolumen.

#### 4.1.2. Die Aufdehnung subpleuraler Alveolen mittels Intravitalmikroskopie

Um zu verstehen, welche Auswirkungen die volumengesteuerte mechanische Beatmung auf die distalsten Strukturen des Bronchialbaums, nämlich die Alveolen hat, wurden 3 Mäuse jeweils 10 Minuten mit den drei verschiedenen Tidalvolumina in randomisierter Reihenfolge beatmet und intravitalmikroskopische Aufnahmen erstellt (Abbildung 10). Anschließend wurde die Querschnittsfläche der subpleuralen Alveolen ausgemessen (Abbildung 11). Die große Heterogenität der Alveolen zeichnet sich in der großen Standardabweichung der Daten ab, was durch eine Normierung der Daten auf den Ausgangswert von 6 ml/kg KG  $V_T$  abgemildert werden könnte. Auf diese Darstellung wurde hier jedoch verzichtet.

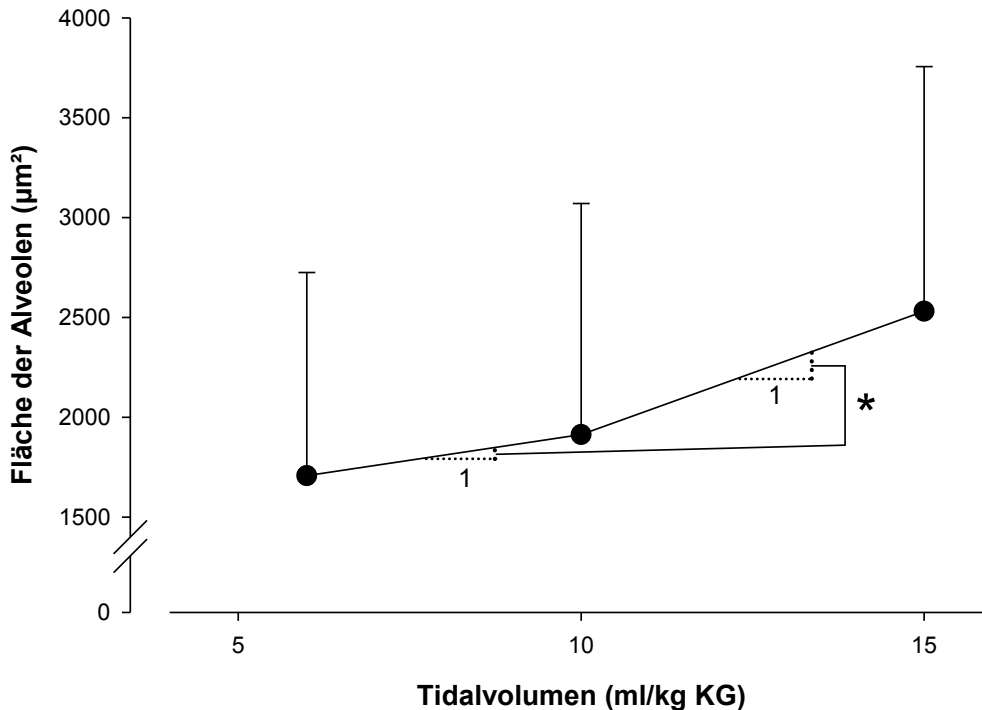


**Abbildung 10: Intravitalmikroskopische Aufnahmen der subpleuralen Alveolen**

Intravitalmikroskopische Bilder der endinspiratorischen Aufdehnung unter mechanischer Beatmung mit 6, 10 beziehungsweise 15 ml/kg KG  $V_T$  ermöglichen die Ausmessung der Schnittfläche der subpleuralen Alveolen-Cluster. Repräsentative Alveolen-Cluster unter den verschiedenen Beatmungsbedingungen sind gekennzeichnet. Maßstabsbalken = 100 $\mu$ m.

Erstaunlicherweise zeigten die Alveolen unter Beatmung nicht nur ein stetiges Aufdehnungsverhalten, sondern eine sprunghafte Zunahme der Alveolengröße bei Anstieg des  $V_T$  von 10 auf 15 ml/kg KG, was sich durch die signifikante Zunahme der Kurvensteigung zeigen ließ.

Während die Hauptbronchien also die deutlichste Aufdehnung unter moderatem Tidalvolumen erkennen lassen, zeigen die kleineren Segmentbronchien eine lineare Zunahme mit ansteigendem Atemzugvolumen und die Alveolen schließlich die größte Erweiterung bei dem höchsten untersuchten Atemzugvolumen.



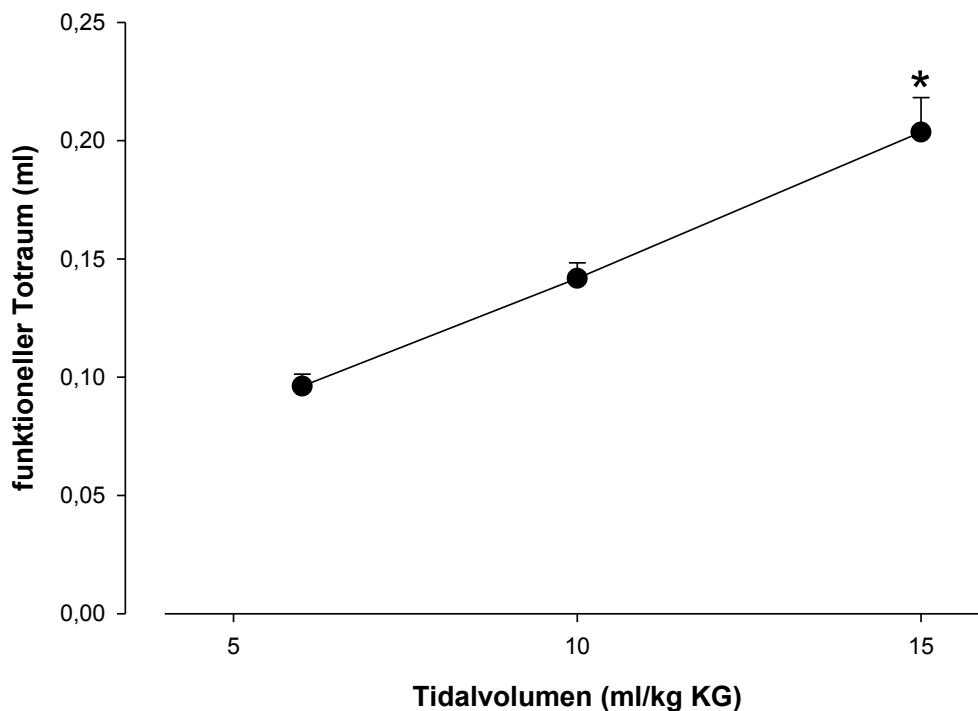
**Abbildung 11: Quantitative Analyse der alveolären Querschnittsfläche**

Die quantitative Auswertung aus den intravitalmikroskopischen Aufnahmen zeigt eine überproportionale Aufdehnung der Alveolen bei hohen Tidalvolumina. Daten sind Mittelwerte und SD von  $n = 49$  Alveolen-Clustern in 3 Mäusen. \* $p < 0,05$  gegenüber dem Anstieg der alveolären Aufdehnung von 6 auf 10 ml/kg KG  $V_T$  je 1 ml/kg KG  $V_T$ . Gepaarter t-Test.

#### 4.1.3. Die funktionelle Totraummessung mittels Kapnographie

Mit Hilfe der bildgebenden Methoden vCT und Intravitalmikroskopie konnte bereits gezeigt werden, dass es mit steigenden Tidalvolumen zunächst zu einer Aufdehnung der oberen Atemwege und dann bei hohen Atemzugvolumina zu einer Verschiebung dieser Dehnung in den distalen Bereich des Bronchialbaums kommt. Die Gesamtheit des vorliegenden Totraums konnte bislang jedoch noch nicht untersucht werden, da sich die kleineren Atemwege im vCT nicht darstellen lassen und die zentralen Alveolen einer direkten Bildgebung aus anatomischen Gründen *in vivo* nicht zugänglich sind.

Der gesamte funktionelle Totraum lässt sich kapnographisch ermitteln. Um die bisherigen Ergebnisse zu verifizieren, wurden 5 Mäuse einer kapnographischen Analyse unterzogen (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Funktioneller Totraum (Kapnographie)**

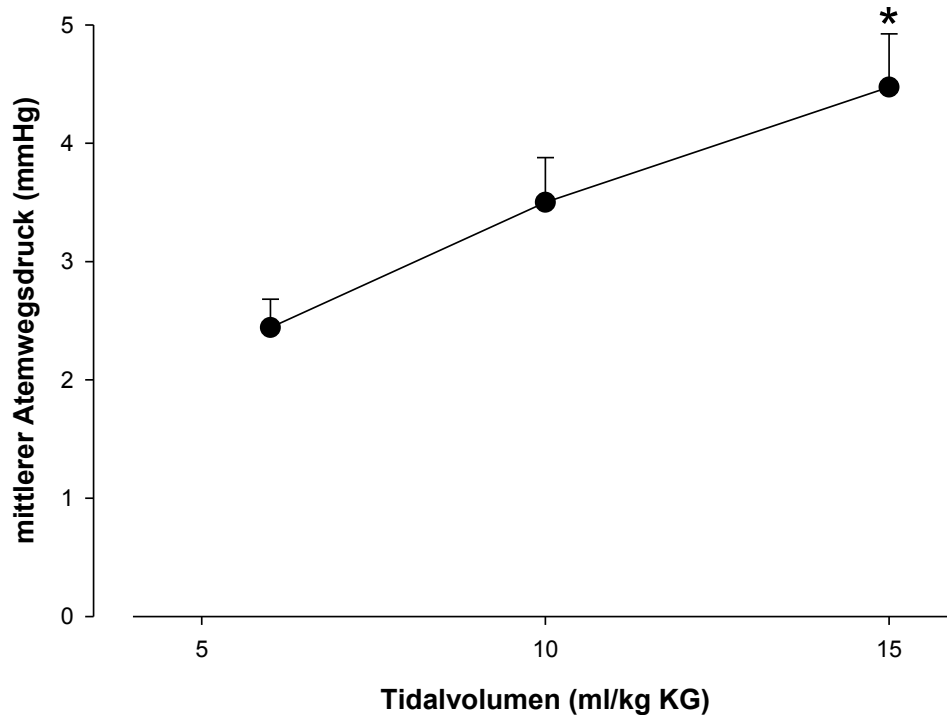
Das Volumen des funktionellen Totraumes zeigt eine lineare Zunahme mit ansteigendem Tidalvolumen. Daten sind Mittelwerte und SD von  $n=5$  Tieren.  $*p < 0,05$  gegen 6 ml/kg KG  $V_T$ . Einfaktorielle Varianzanalyse mit anschließender Holm-Sidak-Methode, paarweise gegeneinander verglichen.  $r = 0,98$  mit  $p < 0,05$ , Pearson Korrelation.

Diese Messung zeigte ebenfalls ein lineares Verhalten ( $r = 0,98$ ), ähnlich zur Aufdehnung der Segmentbronchien, und erreichte schließlich eine signifikante Zunahme des funktionellen Totraums bei 15 ml/kg KG  $V_T$  im Vergleich zu 6 ml/kg KG  $V_T$ . Damit konnten die bisherigen Befunde aus den bildgebenden Verfahren bestätigt werden, da der Hauptteil des Totraums nicht von den Hauptbronchien, sondern von den distalen Atemwegen gestellt wird und es hier unter Beatmung mit zunehmenden Tidalvolumen zu einer progredienten Aufdehnung kommt.

#### 4.1.4. Der mittlere Atemwegsdruck und die Compliance

Während der Messung des funktionellen Totraums an 9 Tieren und an 4 weiteren nicht-kapnographisch untersuchten, aber nach dem gleichen Protokoll beatmeten Tieren wurde zugleich

der mittlere Atemwegsdruck unter mechanischer Beatmung kontinuierlich aufgezeichnet. Dieser zeigte ebenfalls einen Anstieg mit zunehmendem Tidalvolumen (Abbildung 13).



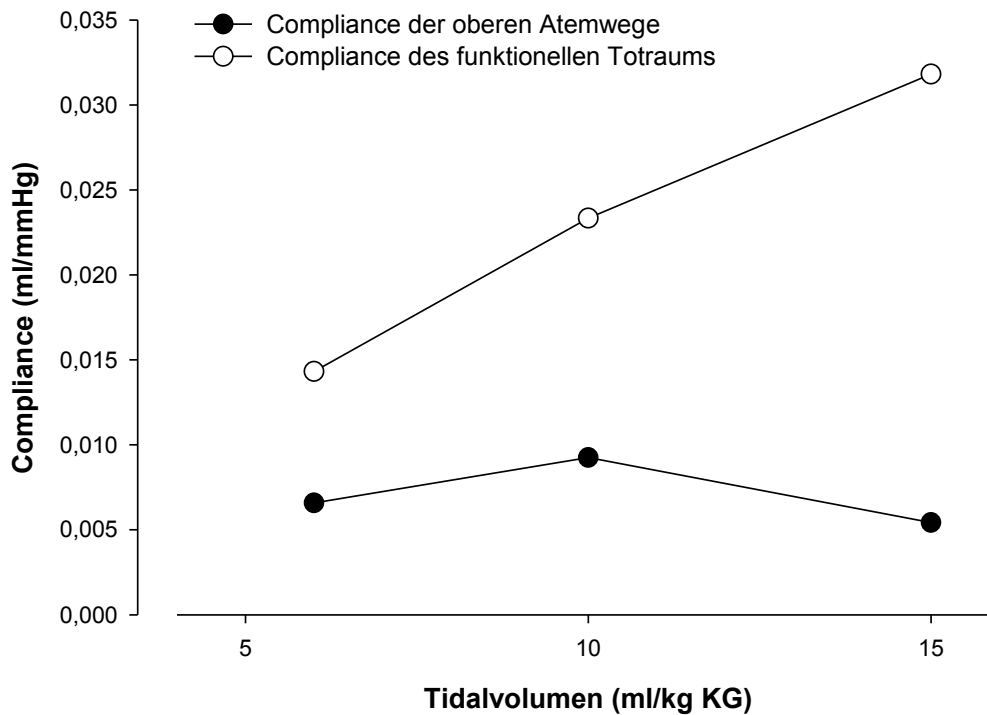
**Abbildung 13: Mittlerer Atemwegsdruck**

Der mittlere Atemwegsdruckes unter mechanischer Beatmung zeigt einen nahezu linearen Anstieg mit zunehmendem Tidalvolumen. Daten sind Mittelwerte und SD von n=9 Tieren. \*p < 0,05 gegen 6 ml/kg KG  $V_T$ . Einfaktorielle Varianzanalyse mit anschließender Holm-Sidak-Methode, paarweise gegeneinander verglichen.  $r=0,91$  mit  $p < 0,05$ , Pearson Korrelation.

Wie im Methodenteil unter 3.2.5 beschrieben, kann aus den Änderungen der gemessenen Volumina und Atemwegsdrücke die Compliance des jeweiligen Lungenabschnittes als Steigung der Druck-Volumenkurve berechnet werden (Abbildung 14).

Die hier dargestellte Compliance des funktionellen Totraums beschreibt zunächst einen Anstieg der Compliance mit zunehmendem Volumen und dieser Anstieg ist bei einer weiteren Erhöhung des Atemzugvolumens zwar nicht mehr so stark ausgeprägt, bleibt aber positiv.

In den oberen Atemwegen verhält es sich deutlich anders – es kommt nicht nur zu einer frühen Plateauphase, sondern sogar zum Abfall der Volumendehnbarkeit bei Überschreiten eines gewissen Schwellenvolumens.



**Abbildung 14: Compliance der oberen Atemwege und des funktionellen Totraums**

Dargestellt ist die Compliance (C) in ml/mmHg, berechnet als  $\Delta V / \Delta P$  in Abhängigkeit zum Tidalvolumen und zum Ausgangswert unter Spontanatmung nach Tracheotomie. Die Daten zeigen den linearen Anstieg der Compliance des funktionellen Totraums und den glockenförmigen Kurvenverlauf der Compliance der oberen Atemwege.

#### **4.2. Die Aufdehnung der Atemwege führt zu Hämorrhagien und proinflammatorischer Reaktion**

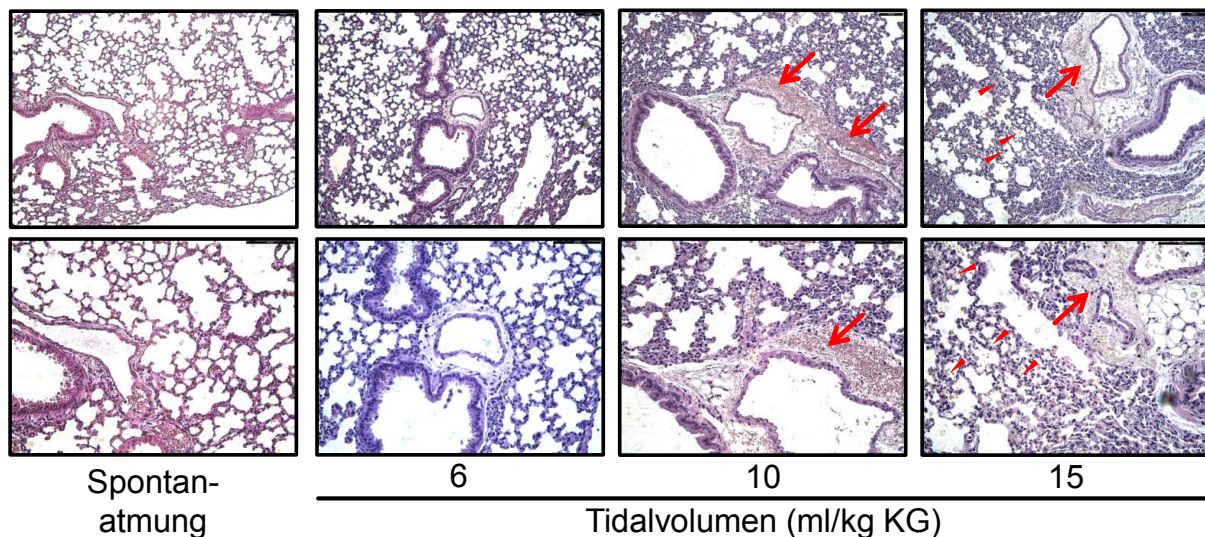
Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine mechanische Beatmung von Mäusen zu einer deutlichen und reversiblen Aufdehnung führt, dass sich diese in den Hauptbronchien aber keineswegs linear zum vorgegebenen Tidalvolumen verhält, sollte untersucht werden, was den beschriebenen Abfall der Compliance bei hohen Tidalvolumina bewirken könnte.

Histologische Untersuchungen gaben erste Hinweise auf die strukturellen Folgen der mechanischen Beatmung. In der Nähe größerer Bronchien kommt es mit zunehmendem Tidalvolumen zu perivaskulären Blutungen. Neben dieser strukturellen Konsequenz aus der mechanischen Beatmung zeigte sich auch eine deutliche Entzündungsreaktion an den oberen Atemwegen: An isolierten und beatmeten Tracheen konnte eine signifikante Ausschüttung von Entzündungsmediatoren beobachtet werden.

#### 4.2.1. Histologische Untersuchung von murinen Lungen

Um einen Einblick in mögliche strukturelle Veränderungen zu bekommen, die durch die mechanische Beatmung verursacht werden und die die eingeschränkte Volumendehnbarkeit der Hauptbronchien erklären könnten, wurden histologische Lungenschnitte von Mäusen angefertigt, die 50 Minuten mit definierten Tidalvolumina beatmet und anschließend exsanguiniert wurden.

Die Hämatoxylin-Eosin gefärbten Präparate zeigten mit zunehmendem Tidalvolumen eine deutliche Schädigung des Lungengewebes (Abbildung 15): Bereits bei einer Beatmung mit 6 ml/kg KG  $V_T$  konnte im Vergleich zur Spontanatmung eine Verdickung der interalveolären Septen beobachtet werden. Eine Erhöhung des Tidalvolumens führte in manchen Regionen zu einer Verdichtung des Parenchyms.



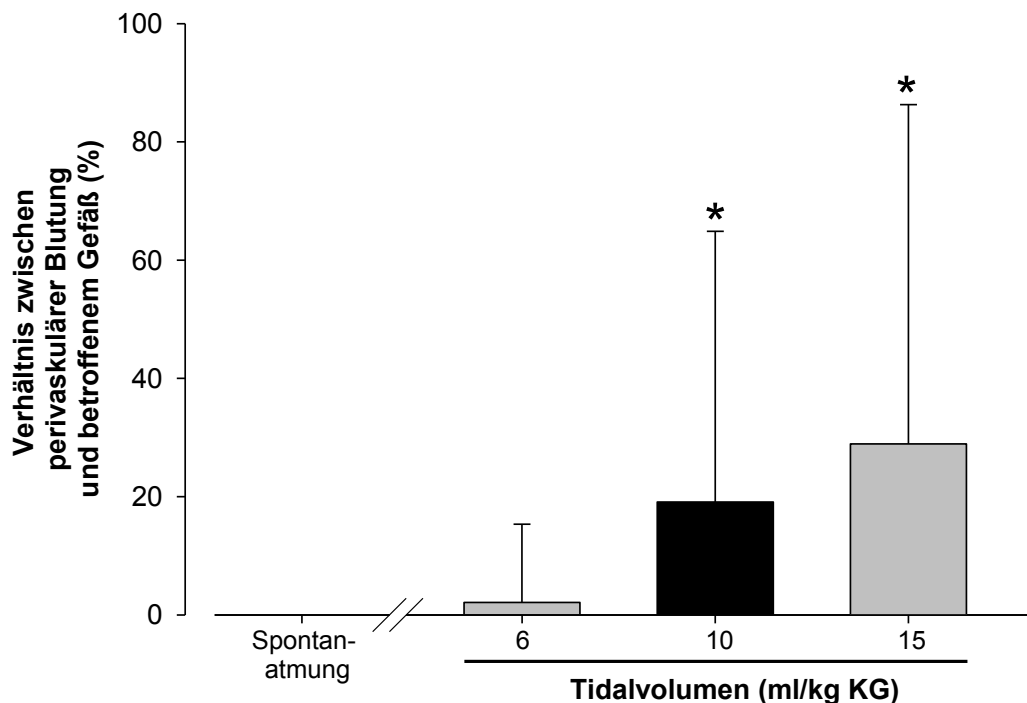
**Abbildung 15: Hämatoxylin-Eosin gefärbte Lungenschnitte**

Repräsentative Bilder von murinen Lungen unter Spontanatmung und nach 50 min unter mechanischer Beatmung mit 6, 10 oder 15 ml/kg KG  $V_T$  in niedriger (obere Reihe) und hoher (untere Reihe) Vergrößerung zeigen eine geringe bis deutliche Verdickung der Alveolarsepten unter mechanischer Beatmung und bei zunehmendem Tidalvolumen  $\geq 10$  ml/kg KG vaskuläre Blutungen peribronchialer Gefäße (Pfeile). Bei einem Tidalvolumen von 15 ml/kg KG kommt es zu gelegentlich auftretenden intraalveolären Blutungen (Pfeilspitzen). Maßstabsbalken = 100 $\mu$ m.

Das hervorstechendste Ergebnis der histologischen Untersuchung waren jedoch großflächige Blutungen ins Interstitium. Gefäße, die parallel zu den größeren Bronchien verlaufen, zeigten bei einer Beatmung von 10 ml/kg KG  $V_T$  perivaskuläre Blutungen (Pfeile), die bei einer Steigerung des Atemzugvolumens auf 15 ml/kg KG  $V_T$  noch zunahmen. Im Vergleich zum niedrigsten Tidalvolumen der mechanischen Beatmung waren die Durchmesser der Blutungsflächen im

Verhältnis zum Durchmesser des betroffenen Gefäßes signifikant, wie die planimetrische Untersuchung von insgesamt 135 ausgewerteten Gefäßen zeigt (Abbildung 16). Die große Streuung der Daten beruht auf der Tatsache, dass unter den gleichen Bedingungen ein Teil der Gefäße keine perivaskulären Blutungen aufwies, während andere Gefäße eine sehr große Blutungsfläche zeigten.

Die Bildung perivaskulärer Hämorrhagien stellt einen raumfordernden Prozess dar, der die Aufdehnung der luftleitenden Bronchien potentiell einschränken könnte. Bei den an kleineren Segmentbronchien verlaufenden Gefäßen konnten vergleichbare histologische Gewebeschäden nicht beobachtet werden.



**Abbildung 16: Planimetrische Analyse der perivaskulären Blutung**

Die histologische Aufarbeitung wurde an Lungen von Mäusen unter Spontanatmung beziehungsweise nach 50 min unter mechanischer Beatmung mit 6, 10 oder 15 ml/kg KG  $V_T$  durchgeführt. Der Durchmesser der Blutungsfläche wurde zum Durchmesser des betroffenen Gefäßes ins Verhältnis gesetzt. In der Gruppe unter Spontanatmung waren keine Gefäße betroffen, bei einer Beatmung mit 6 ml/kg KG  $V_T$  zeigten 5,4% der ausgemessenen Gefäße eine Blutung, bei einem Tidalvolumen von 10 ml/kg KG waren 32,4% und bei 15 ml/kg KG  $V_T$  waren 44,6% der Gefäße betroffen. Daten sind Mittelwerte und SD von  $n=135$  Gefäßen aus jeweils 3 Tieren pro Gruppe. \* $p < 0,05$  gegen Spontanatmungsgruppe. Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn's Test gegen Kontrolle (Spontanatmungsgruppe).

Bei einer Beatmung mit 15 ml/kg KG  $V_T$  kam es schließlich auch zu intraalveolären Blutungen (Abbildung 15, Pfeilspitzen), erkennbar an den Erythrozyten im Alveolarraum. Dies ist ein Zeichen

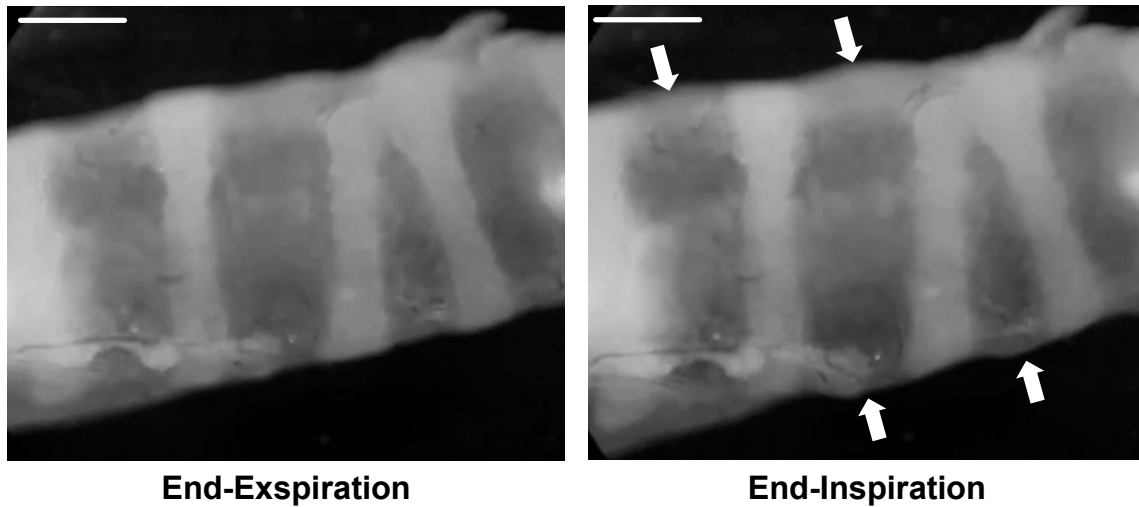


für die pathologische Überdehnung der Alveolen und des Gefäßendothels der Kapillaren mit nachfolgender Undichte der Blut-Luft-Schranke. Die alveolär-kapillare Permeabilität ist ein Kriterium für den beatmungsindizierten Lungenschaden und bestätigt und erweitert die Befunde aus der Intravitalmikroskopie: bei der Überschreitung eines definierten Tidalvolumens kommt es zur deutlichen (Über-)dehnung der Alveolen.

#### **4.2.2. Untersuchung der isolierten und beatmeten Trachea im Organbad**

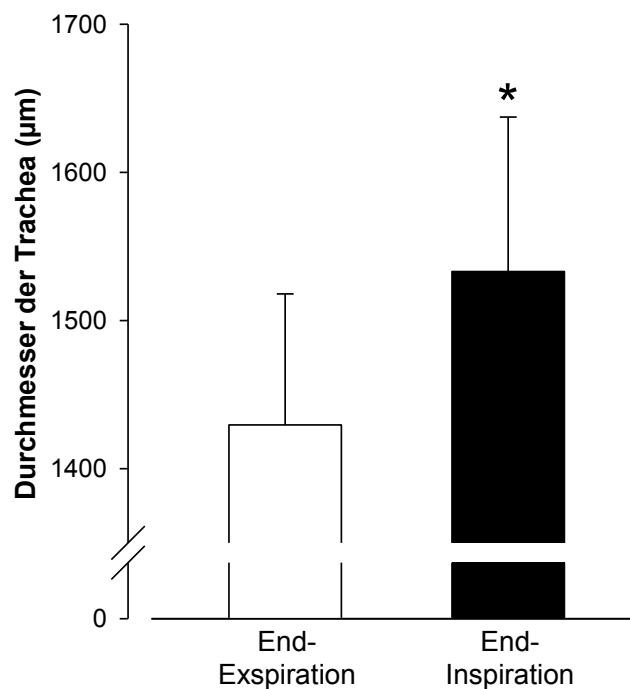
Nachdem in der Histologie nach Beatmung mit einem Tidalvolumen von 15 ml/kg KG das Versagen der Gefäßbarrieren (perivaskuläre und intraalveoläre Blutungen) deutlich zu erkennen war, sollte im Anschluss untersucht werden, ob die Beatmung mit 15 ml/kg KG  $V_T$  nicht nur an den Alveolen sondern auch an den luftleitenden Wegen zu Anzeichen eines beatmungsinduzierten Lungenschadens führen kann. Da für die Validierung des Lungenschadens häufig systemische Entzündungsparameter im Blut (60) oder lokale Entzündungsmarker in der Flüssigkeit der bronchoalveolären Lavage (32) herangezogen werden, sollte die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen lokal in den oberen Atemwegen untersucht werden.

Da bei der Maus auf Grund der Größe und Verzweigung der Hauptbronchien nur eine Isolierung der Trachea im Organbad möglich ist, wurde zunächst überprüft, ob dieser mit Knorpelringen versehene Teil des Bronchialbaums grundsätzlich einer beatmungsabhängigen Aufdehnung *ex vivo* unterliegt. Hierzu wurden die Tracheen von 3 unbeatmeten Tieren isoliert und druckgesteuert mit 17 cmH<sub>2</sub>O als endinspiratorischem Druck wie unter 3.2.7 beschrieben beatmet. Dieser Wert wurde gewählt, da er dem Spitzendruck der Atemwege bei einem Tidalvolumen von 15 ml/kg KG entspricht und so die Bedingungen der volumengesteuerten Beatmung am isolierten Atemweg imitiert werden konnten, während eine volumengesteuerte Beatmung aufgrund der dazu notwendigen Flüssigkeitsverschiebung in Abwesenheit einer Lunge methodisch nicht umzusetzen war. Es wurden 14 Zwischenknorpelringe in maximaler Expiration und Inspiration ausgewertet. Wie in Abbildung 17 zu sehen, konnte die zuvor in den vCT-Aufnahmen beobachtete, geringe *in vivo* Aufdehnung der Trachea ( $8,5 \pm 10,2$  %, siehe Abbildung 8) im Organbad *ex vivo* anhand mikroskopischer Aufnahmen bestätigt werden ( $6,8 \pm 2,8$  %, siehe Abbildung 18). Diese Aufdehnung stellte sich sofort mit Beginn der druckgesteuerten Beatmung ein.



**Abbildung 17: Mikroskopische Aufnahmen der isolierten Trachea im Organbad**

Repräsentative Bilder zeigen die Aufdehnung einer isolierten und cannulierten Trachea, die in einem Organbad mit 17 cmH<sub>2</sub>O end-inspiratorischem Druck und einem positiven end-expiratorischen Druck von 2 cmH<sub>2</sub>O beatmet wird. Das entspricht den Spitzendrücken, die bei der volumengesteuerten Beatmung mit 15 ml/kg KG V<sub>T</sub> *in vivo* erreicht wurden. Die Aufdehnung ist im Vergleich zwischen End-Expiration und End-Inspiration zwischen den Knorpelringen (hell) sichtbar (Pfeile). Maßstabsbalken = 500 µm.



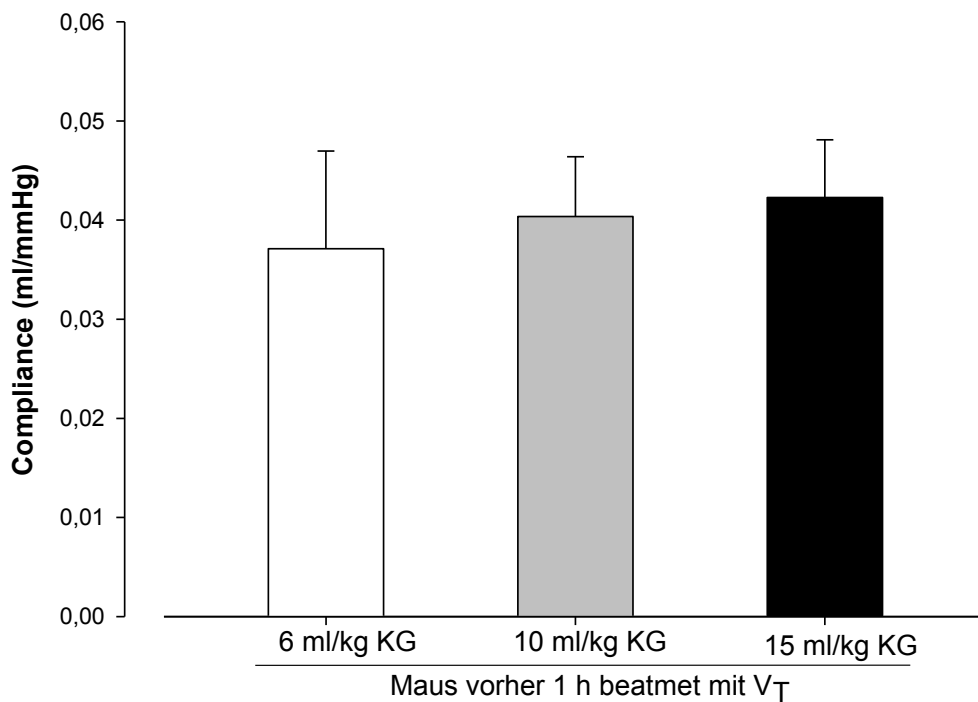
**Abbildung 18: Durchmesser von isolierten Tracheen im Organbad**

In Abhängigkeit zur Beatmungsphase dehnt sich die Trachea unter mechanischer Beatmung an den Zwischenknorpelringen signifikant auf. Daten sind Mittelwerte und SD von n=14 Zwischenknorpelringen aus 3 Tieren. \*p < 0,05 gegen End-Expiration. Gepaarter t-Test.

Welchen Einfluss die unterschiedlichen Beatmungsvolumina auf die Dehnbarkeit der Trachea haben, wurde mittels IAM erfasst. Allerdings war es aufgrund von Softwarelimitationen des IAMs nicht möglich, eine direkte Berechnung der Compliance der Trachea unter verschiedenen Atemzugvolumina im IAM durchzuführen, daher wurde der Versuchsaufbau so geändert, dass durch eine *in vivo* Beatmung mit den bekannten Volumina eine mögliche „Vordehnung“ ausgelöst wurde und im Anschluss die Compliance des isolierten Atemwegs untersucht wurde.

Hierzu wurden jeweils n=6 Tiere entsprechend dem Protokoll der kontinuierlichen Beatmung für 50 Minuten mit einem der drei Tidalvolumina (6, 10 bzw. 15 ml/kg KG) beatmet und danach mittels einer Überdosis Narkotikums schmerzfrei getötet. Die Tracheen wurden entnommen, in das Organbad eingespannt, mit PBS gefüllt und umspült. Mittels des computergesteuerten Durchströmungsverfahrens wurden die Druck-Volumen-Schleifen aufgezeichnet und so die Compliance der zuvor *in vivo* beatmeten isolierten Tracheen berechnet (Abbildung 19).

Es konnte gezeigt werden, dass diese vorangehende Beatmung *in vivo* zwar keine signifikanten Unterschiede der Compliance zwischen den Volumengruppen zur Folge hatte, allerdings scheint es doch eine Tendenz zu geben, dass mit größerem Atemzugvolumen die Compliance zunimmt und dies auch *ex vivo* noch nachweisbar ist. Dieser leichte Anstieg der Volumendehnbarkeit nach einer 50 minütigen Beatmungssequenz würde zu der in den vCT Scans beobachteten linearen Aufdehnung der Trachea mit zunehmendem Tidalvolumen passen.

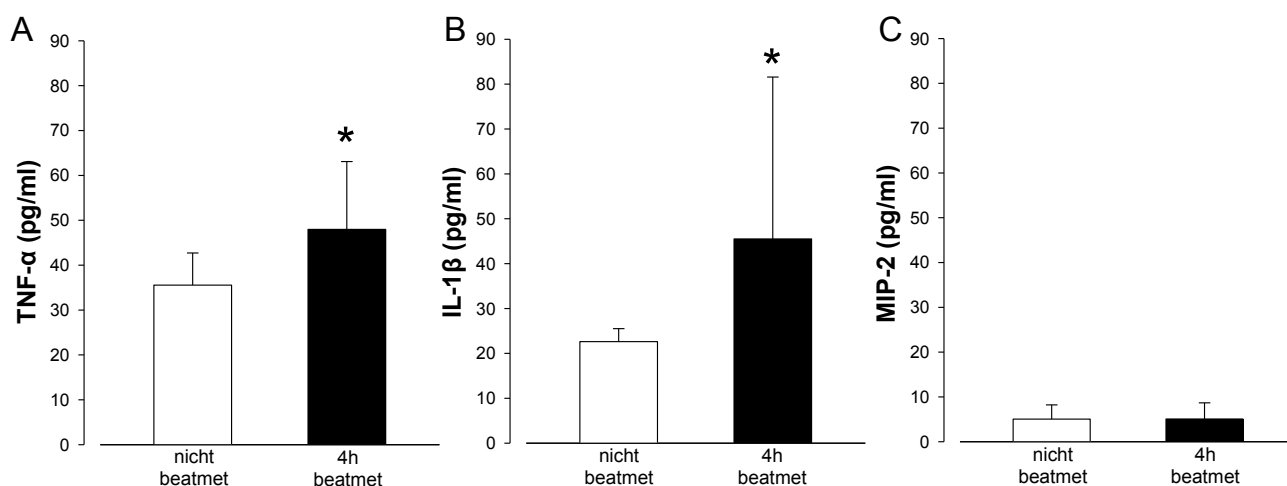


**Abbildung 19: Compliance der Trachea nach vorheriger Beatmung**

Eine vorherige Beatmung *in vivo* führt in der anschließenden Messung im Organbad nicht zu einer signifikanten Veränderung der Compliance. Ein Zusammenhang zwischen der Compliance und dem zuvor verwendeten Tidalvolumen war nicht herzustellen, allerdings lässt sich ein Trend zu einer beatmungsbedingten Compliance-Zunahme beobachten. Daten sind Mittelwerte und SD von n=6 Tieren je Gruppe.

Nachdem gezeigt wurde, dass die Trachea als Atemweg für die Untersuchung hinsichtlich der Dehnungsreaktion auf mechanische Beatmung geeignet ist, sollte die proinflammatorische Reaktion auf den Dehnungsreiz überprüft werden. Hierzu wurden Tracheen von nicht-vorbehandelten Mäusen für 4 Stunden im Organbad beatmet und im Anschluss die intratracheale Flüssigkeit auf die Ausschüttung von 3 Zytokinen hin untersucht. Zehn isolierte und für 4 Stunden im Organbad fixierte, aber nicht beatmete Tracheen dienten als Kontrolle.

Bereits die im Verhältnis zu den Hauptbronchien relativ geringe Aufdehnung der Trachea führte unter Beatmung zu einer signifikanten Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (Abbildung 20, A und B). Als Negativkontrolle für den Versuch diente die Quantifizierung von MIP-2 in der luminalen Flüssigkeit (Abbildung 20 C). Dieses Zytokin wird vornehmlich von Monozyten und Makrophagen exprimiert (6) und blieb in den isolierten, vom systemischen Immunsystem getrennten Tracheen auch nach der vierstündigen Beatmung unverändert.



**Abbildung 20: Analyse der Zytokine TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B) und MIP-2 (C)**

Die Zytokin-Messung mittels ELISA aus der PBS-Lösung im Lumen von isolierten Tracheen, die nicht oder über 4 Stunden im Organbad beatmet wurden, zeigen einen signifikanten Anstieg der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , aber keinen Anstieg der Negativkontrolle MIP-2. Daten sind Mittelwerte und SD von n=3-10 Tracheen. \*p < 0,05 gegen nicht beatmete Tracheen. Mann-Whitney-U-Test.

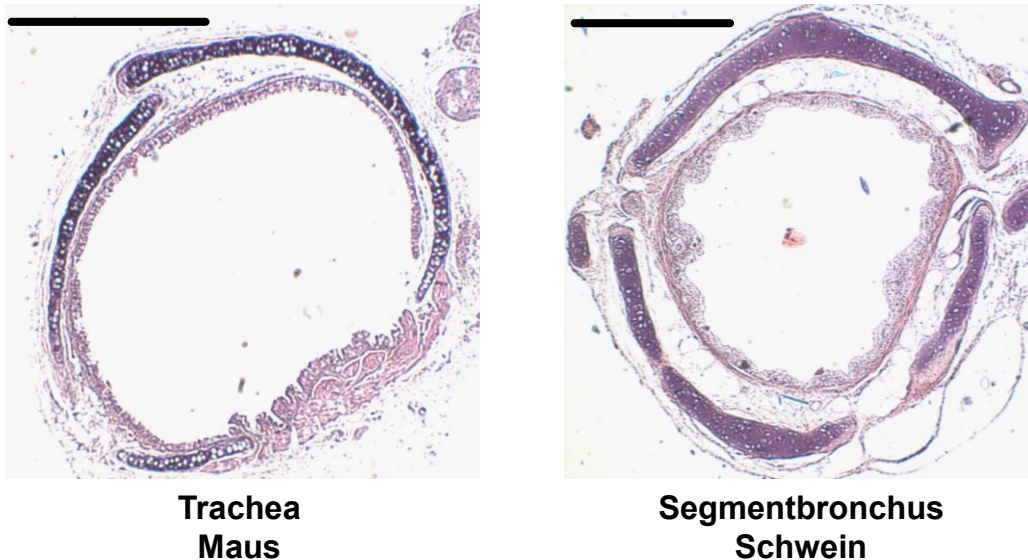
### 4.3. Die elastischen Eigenschaften der isolierten Atemwege von Maus und Schwein weisen Homologien auf

Im Mausmodell des beatmungsinduzierten Lungenschadens konnten die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die Pathogenese des beatmungsinduzierten Lungenschadens vermutlich nicht nur auf eine Überdehnung des Lungenparenchyms begrenzt werden kann, sondern die luftleitenden Atemwege in die pathophysiologischen Überlegungen mit einbezogen werden sollten.

Da diese Ergebnisse jedoch schon aus den anatomischen Unterschieden heraus nicht problemlos auf den Menschen und seine entsprechenden Atemwege übertragbar sind, musste ein Modell gefunden werden, das dem menschlichen Bronchialbaum in Größe und anatomischer Grundstruktur ähnlicher ist als das der Labornagetiere.

Die feinen Segmentbronchien des Schweins stellen einen guten Kompromiss zwischen den anatomischen Voraussetzungen im humanen Bronchialbaum – Knorpelscherben bis in die feinsten Verzweigungen der Bronchien - und den im Durchmesser vergleichbaren murinen Tracheen dar. Zudem sind die porcinen Bronchien aus ethischer Sicht, auch aufgrund der Verfügbarkeit aus Schlachttieren, das geeignetere Untersuchungsobjekt als direkt Untersuchungen an humanem Gewebe durchzuführen.

Zunächst wurde die anatomische Struktur der jeweiligen Atemwege verglichen (Abbildung 21).



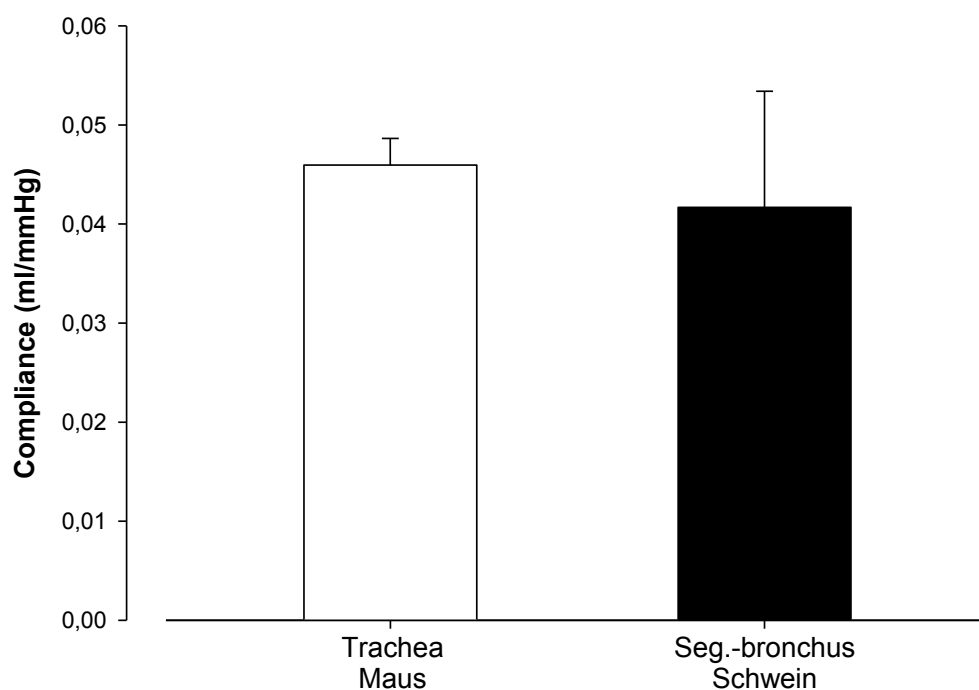
**Abbildung 21: Murine Trachea und porciner Segmentbronchus im histologischen Querschnitt**

H.E. gefärbte Querschnitte einer distalen murinen Trachea (links) und eines porcinen Segmentbronchus (rechts) weisen deutliche Analogien auf. Der unvollständige C-förmige Knorpel und der sich daran anschließende *M. trachealis* der Maus stellen eine ähnliche anatomische Struktur wie die großen Knorpelscherben, die über Bindegewebe miteinander verbunden sind, beim Segmentbronchus des Schweins dar. Die Dehnbarkeit ist in beiden Atemwegen aufgrund des nahezu geschlossenen knorpeligen Stützgewebes nur eingeschränkt möglich. Maßstabsbalken = 500µm.

Die murine Trachea dient aufgrund der bisher gezeigten Ergebnisse hinsichtlich ihrer im vCT und im Organbad reproduzierbaren Dehnungseigenschaften als Referenzatemweg für den Vergleich mit dem Schwein. Im histologischen Querschnitt kann der unterbrochene C-förmige Knorpel und der aufgelagerte *M. trachealis* als nahezu geschlossener Ring betrachtet werden, die Maus zeigt den charakteristischen C-förmigen Ringknorpel allerdings nur im oberen Teil der Trachea (45). Die umliegenden Strukturen (Gefäße, Muskulatur, Ösophagus) sind durch die Präparation für die Untersuchung im Organbad in Abbildung 21 nicht dargestellt, stellen aber für die Dehnungseigenschaften neben den Knorpelringen eine mechanische Begrenzung dar. Die im Folgenden verwendeten kleinen Segmentbronchien des Schweins sind dem Durchmesser der murinen Trachea sehr ähnlich und weisen mit ihren ausgedehnten Knorpelscherben, die über bindegewebige Brücken miteinander verbunden sind, einen ähnlichen zusammenhängenden Stützring wie die murine Trachea auf. Die Segmentbronchien werden allerdings nicht von

Muskulatur, sondern von elastischem Lungengewebe umgeben, welches in Abbildung 21 ebenfalls nicht dargestellt ist.

Während gezeigt wurde, dass sich die murine Trachea unter mechanischer Beatmung trotz der vorhandenen Stützstruktur weiten kann und die Anatomie der Knorpelstrukturen in den Atemwegen der beiden Spezies einen ersten Analogschluss zulässt, sollte die Volumendehnbarkeit beider Atemwege quantitativ verglichen werden. Hierzu wurden die isolierten Atemwege im Organbad eingespannt, mit PBS gefüllt und umspült und bei computergesteuertem Durchströmungsverfahren die Druck-Volumen-Schleifen aufgezeichnet (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Compliance muriner Tracheen und porciner Segmentbronchien im Organbad**

Beim Vergleich der Compliance der Luftröhre der Maus und des im Durchmesser ähnlichen Segmentbronchus des Schweins konnten keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden. Die Daten wurden ex vivo computergestützt im Organbad des IAM ermittelt und sind Mittelwerte und SD von jeweils n=6 isolierten Atemwegen.

Die so analysierte Compliance konnte zwischen den murinen Tracheen und den porcinen Segmentbronchien direkt quantitativ verglichen werden und ergab keinen signifikanten Unterschied.

## 5. Diskussion

In der hier vorgelegten experimentellen Studie wurde die Hypothese geprüft, ob durch mechanische Beatmung eine Erweiterung der luftleitenden Atemwege verursacht wird und ob eine solche Erweiterung zur Entstehung des beatmungsinduzierten Lungenschadens beitragen kann, der bislang vornehmlich einer Überdehnung der Alveolen zugeschrieben wurde.

Anhand umfassender vCT Untersuchungen beatmeter Mäuse konnte gezeigt werden, dass es durch die mechanische Beatmung zu einer raschen, deutlichen und reversiblen Aufdehnung der oberen Atemwege kommt. Diese Aufdehnung ist sowohl bereits unter protektiven (6 ml/kg KG  $V_T$ ) bis moderaten (10 ml/kg KG  $V_T$ ) als auch unter schädigenden (15 ml/kg KG  $V_T$ ) Tidalvolumina zu beobachten. Mit der visuell dargestellten Erweiterung des Totraums ging auch eine kapnographisch ermittelte Vergrößerung des funktionellen Totraums einher.

Während sich die Aufdehnung der Trachea und der kleineren Segmentbronchien, die Belüftung des Lungenparenchyms und die Erweiterung des funktionellen Totraums als lineare Folge eines zunehmenden Tidalvolumens darstellen ließen, zeigten die Hauptbronchien ein nicht-lineares, glockenförmiges Verhalten und waren unter einem Tidalvolumen von 10 ml/kg KG am deutlichsten erweitert. Dies ist auf eine Abnahme der Volumendehnbarkeit der oberen Atemwege bei einem Tidalvolumen von 15 ml/kg KG zurückzuführen. Der Grund für diese Abnahme der Compliance konnte nicht abschließend bewiesen werden, allerdings kam es durch die schädigende Beatmung mit 15 ml/kg KG  $V_T$  zu strukturellen Veränderungen an peribronchialen Gefäßen, namentlich Blutungen in das umliegende Gewebe und die Alveolen, die eine solche Veränderung der Dehnbarkeit mit sich bringen könnten. Während die beiden Hauptbronchien die maximale Dehnung bei moderatem Tidalvolumen zeigten, konnte mittels intravitalmikroskopischen Aufnahmen der subpleuralen Alveolen demonstriert werden, dass die Alveolen als letzte Einheit des Bronchialbaums eine unverhältnismäßig große Aufdehnung unter 15 ml/kg KG Tidalvolumen im Vergleich zur Aufdehnung bei 6 und 10 ml/kg KG  $V_T$  zeigten. Dies spricht für eine Umverteilung des Tidalvolumens von den zentralen größeren Atemwegen auf die distalen kleineren Atemwege und die Alveolen, wenn die maximale Dehnbarkeit der oberen Atemwege erreicht ist. Diese Beobachtung lässt schließen, dass die oberen Atemwege eine Art Volumenreservoir darstellen, das die dehnungsempfindlichen Alveolen bei überschießenden Tidalvolumina zu schützen vermag, das aber seine protektiven Eigenschaften verliert, wenn ein gewisser Volumenschwellenwert überschritten wird.



Es war allerdings auch zu beobachten, dass die beschriebene Dehnung der Atemwege selbst eine entzündliche Reaktion zur Folge hat und damit Teil der Pathogenese des beatmungsinduzierten Lungenschadens ist. Die Frühphasen-Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  konnten selbst in isoliert beatmeten Tracheen nachgewiesen werden, also in einem Abschnitt des Bronchialbaums, der sich aufgrund der knorpeligen Struktur nur gering dehnen kann, wie anhand von vCT Bildern und mikroskopischen Untersuchungen gezeigt werden konnte. Extrapoliert man diese Zytokinausschüttung auf die wesentlich dehnbaren Bronchien und zieht noch die histologisch nachgewiesenen Beobachtungen der peribronchialen Blutungen hinzu, kann man schließen, dass die Erweiterung des Totraums durch mechanische Beatmung *per se* die klassischen Aspekte des beatmungsinduzierten Lungenschadens wie Entzündung und Barrieredefekte zur Folge hat und damit eine bislang unbekannte Rolle bei der Entstehung des beatmungsinduzierten Lungenschadens spielen kann.

### **5.1. Die Beurteilung der verwendeten Methoden**

In der vorliegenden Untersuchung wurden sowohl bildgebende Methoden wie das vCT und die Intravitalmikroskopie als auch funktionelle Messverfahren wie die Kapnographie und die Zytokinmessung isolierter Atemwege im Organbad miteinander verknüpft. Die verschiedenen Herangehensweisen an die Fragestellung konnten so ergänzende beziehungsweise in unterschiedlichen Methoden wiederholbare Ergebnisse liefern. Während das erstmals für diesen Zweck verwendete vCT dazu geeignet war, minimalinvasiv das Volumen der oberen Atemwege über den Zeitraum von einer Stunde darzustellen, entbehrte es jedoch der Möglichkeit, die kleineren Atemwege und die Alveolen zu untersuchen. Dieser Mangel konnte durch die Intravitalmikroskopie der Alveolen, einer erst 2008 in unserem Labor entwickelten Methode, ausgeglichen werden, die zwar mit einer aufwendigen operativen Präparation für das tief anästhesierte Versuchstier verbunden ist, aber bei geschlossenem Thorax eine *in situ* Beobachtung und Auswertung der subpleuralen Alveolen zulässt. Aufgrund der hochinvasiven Methode ist es jedoch nicht möglich, auf diese Weise spontanatmende Tiere zu untersuchen, da die notwendige Narkosetiefe eine Abkopplung vom Beatmungsgerät untersagt. Die Ergebnisse der beiden neuartigen bildgebenden Methoden vCT und Intravitalmikroskopie der Alveolen konnten durch den Goldstandard der Totraummessung, der Kapnographie, validiert werden. Zusätzlich lieferte die Kapnographie Aussagen über den gesamten physiologischen Totraum und deckte damit auch Bereiche der Lunge ab, die sich der Bildgebung bislang entzogen, wie die distal der

Segmentbronchien gelegenen Bronchien und Bronchiolen und die zentral gelegenen Alveolen. Da diese Untersuchungen nur an der beatmeten Maus erfolgen konnten, entbehrt auch die Kapnographie Werte unter Spontanatmung. Ein weiteres Manko der Kapnographie, bei der der  $\text{CO}_2$ -Gehalt über die Expirationsphase mehrerer Atemzyklen im Mittel gemessen und anschließend mit dem gemessenen  $\text{CO}_2$ -Partialdruck im arteriellen Blut und der Bohr-Formel in das Volumen des funktionellen Totraums umgerechnet wird, ist der Verlust der Messgenauigkeit, wie sie aus der Humanmedizin bei der Kapnovolumetrie bekannt ist. Aufgrund der geringen Volumina und der hohen Atmungsfrequenz bei der Maus ist so eine Unterscheidung in anatomischen und alveolären Totraum anhand eines einzelnen Atemzuges nicht möglich. Eine weitere ergänzende Methode war die Messung der Strahlendichte, anhand derer die Belüftung des Lungenparenchyms beurteilbar wurde. So konnten mit komplementären Methoden alle Bereiche der Lunge untersucht werden und neue Methoden durch bereits standardmäßig verwendete Methoden validiert und unterstützt werden.

Zu den bereits länger etablierten Methoden gehören auch die Messung des mittleren Atemwegdruckes und die unter hinzuziehen des Tidalvolumens berechnete Lungencompliance. Diese konventionelle Berechnung wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls für die Daten aus der Kapnographie, also für die Compliance des funktionellen Totraums, verwendet, daran angeschlossen wurde aber die Berechnung der Compliance der oberen Atemwege, was durch die vorliegenden Daten aus dem vCT erstmals möglich war. Die hier gemachten Beobachtungen zu den unterschiedlichen Dehnungsfähigkeiten der einzelnen Atemwegsabschnitte, waren also nur aufgrund der Synthese von bekannten und neuen Methoden realisierbar und sind damit ein gutes Beispiel für eine Weiterentwicklung vorhandener Messverfahren. Auch die Histologie von Lungenschnitten gehört zu den bewährten Methoden für die Evaluierung des Lungenschadens und gab mit den gefundenen perivaskulären Blutungen erste Erklärungsversuche für die Beobachtungen aus den neuartigen bildgebenden Verfahren.

Neben den unterschiedlichen Messverfahren wurden in der vorliegenden Studie auch verschiedene Messsysteme verwendet. Das Versuchstier Maus bildete den Schwerpunkt für die Untersuchungen. An der Maus war es möglich, Versuche mit den neuen Messmethoden wie dem vCT zu machen und die gewonnenen Erkenntnisse mit bereits bestehenden Ergebnissen aus zurückliegenden Studien zu vergleichen. Die geringe Größe der Maus machte es einerseits möglich, vCT Aufnahmen des gesamten Thorax in sehr kurzer Zeit aufzunehmen, die hohe Atmungsfrequenz

verhinderte allerdings Atemzug-getriggerte Studien. So musste auf die Darstellung der Atemwege zu den verschiedenen Phasen des Atemzyklus verzichtet werden. Während die meisten Untersuchungen *in vivo* möglich waren, konnten anhand der *ex vivo*-Methoden, nämlich die Untersuchungen im Organbad, die Dehnungseigenschaften und die Entzündungsreaktion der Trachea gemessen werden. Die Analyse der lokalen Entzündungsreaktion ermöglichte es, wichtige Rückschlüsse auf die schädigenden Folgen der Dehnung der oberen Atemwege zu ziehen, was anhand systemisch im Blut oder organweit in der BAL gemessener Zytokinkonzentrationen nicht zielführend gewesen wäre. Die Analyse der Dehnungseigenschaften isolierter Atemwege im Organbad erlaubte es, ein weiteres Untersuchungsobjekt in die Studie miteinzubeziehen. Die an murinen Tracheen gewonnenen Werte konnten mit denen kaliberähnlicher porciner Atemwege verglichen werden und so wurde die Voraussetzung für eine erste Übertragungsmöglichkeit auf größere Säugetiere geschaffen. Wenngleich das Schwein kein optimales Forschungsobjekt für die Pathogenese humaner Lungenerkrankungen gilt, stellen Untersuchungen an porcinen Lungen doch einen annehmbaren Kompromiss zwischen der Anatomie des Menschen und der, hinsichtlich ethischer, finanzieller und praktischer Gesichtspunkte, einfacheren Durchführbarkeit der Untersuchungen an der Maus dar. Eben jene anatomische Vergleichbarkeit zwischen murinen und porcinen Atemwegen wurde hier anhand histologischer Kriterien wie die Anordnung der Knorpelscherben überprüft.

Die vorliegende Studie verbindet demnach neuartige und bewährte Methoden und kombiniert sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* Messsysteme an zwei verschiedenen Spezies. So werden die Ergebnisse methodisch ergänzt, systemspezifische Nachteile größtenteils ausgeglichen und die gewonnenen Erkenntnisse zugleich validiert.

## **5.2. Die mechanische Beatmung führt zur Aufdehnung der oberen Atemwege der Maus**

Die Möglichkeit, anästhesierte und beatmete Mäuse in einem Prototyp des neuartigen Volumen-Computertomographen mit Flächendetektoren untersuchen zu können, eröffnete erstmals die Voraussetzungen, die Atemwege beatmeter Mäuse sowohl unter sehr hoher räumlicher als auch zeitlicher Auflösung darstellen zu können. Dies erlaubte die Darstellung und volumetrische Analyse der Atemwege bis auf Höhe der Segmentbronchien mit einem Durchmesser von etwa 0,8 mm unter Beatmung mit verschiedenen Tidalvolumina. Wenngleich es aufgrund der kurzen Aufnahmedauer von 19 Sekunden zwar gelang, mehrere Scans an einem Tier hintereinander

durchzuführen, war es nicht möglich, die einzelnen Scans auf eine bestimmte Atemphase auszurichten. Der Versuch, die Aufnahme mit Hilfe eines Atemgatings zu triggern, also innerhalb eines Scans einem definitiven Zeitpunkt in der Inspirations- oder Expirationsphase zuzuordnen, scheiterten an der hohen Atmungsfrequenz der Mäuse, für die der Prototyp aus der Humanmedizin nicht ausgelegt war. Das Ansteuern (triggern) einer bestimmten Phase des Atemzyklus hätte die Aufnahmezeit für jeden Scan zudem derart verlängert, dass dann keine Untersuchungen in der erfolgten zeitlichen Dichte zu den unterschiedlichen Beatmungssettings möglich gewesen wären. So wurde der Fokus der Untersuchungen auf das Verhalten der Atemwege unter verschiedenen Bedingungen und über eine klinisch relevante Beobachtungszeit und nicht auf die einzelnen Phasen des Atemzyklus gelegt. Die Datenanalyse erfolgte demnach an nicht getriggerten, über den gesamten Atemzyklus verteilten Aufnahmen. Jede dieser Aufnahme umfasst in den dargestellten Ergebnissen unter einer Beatmung mit 15 ml/kg KG etwa 32 Atemzyklen beziehungsweise unter einer Beatmung mit 6 ml/kg KG durchschnittlich 54 aufeinanderfolgende Atemzyklen.

Die ausgewerteten Ergebnisse zur Aufdehnung der oberen Atemwege wären also einerseits in maximaler Inspiration eventuell noch deutlicher darzustellen, andererseits sind sie in der endinspiratorischen Phase durch das Anlegen eines PEEPs von 2 cmH<sub>2</sub>O beeinflusst, da es nie zu einem vollständigen Druckabfall in der Ausatemungsphase kommt. Es kann hier also eine quantitative und qualitative Aussage über die Aufdehnung der Atemwege unter mechanischer Beatmung gemacht werden.

Die Arbeitsgruppe um Sinclair konnte bereits sehr detaillierte mikrofokale Röntgenaufnahmen jeweils in der endinspiratorischen und endexpiratorischen Phase von Ratten machen, die das Röntgenkontrastmittel Tantalumstaub inhaliert hatten (83). Hier konnte gezeigt werden, dass es bereits unter Spontanatmung bei jeder Inspiration zu einer Aufdehnung der oberen Atemwege kommt. Des Weiteren zeigte die Arbeitsgruppe, dass unter mechanischer Beatmung die circumferentielle Dehnung der Atemwege mit zunehmenden Atemwegsdrücken steigt. Beide Ergebnisse festigen die Beobachtungen, die in der vorliegenden Arbeit gemacht werden konnten: Eine mechanische Beatmung führt zu einer deutlichen und reversiblen Aufdehnung der oberen Atemwege.

Durch die dreidimensionale Aufarbeitung der vCT Scans konnten die gewonnenen Daten in der vorliegenden Arbeit zudem auch erstmals volumetrisch ausgewertet werden. Es konnte gezeigt werden, dass es bereits unter einer protektiven Beatmung mit 6 ml/kg KG  $V_T$  nahezu zu einer

Verdopplung des anatomischen Totraums der dargestellten Atemwege kommt, vergleicht man die Zeitpunkte unter Spontanatmung und unter Beatmung. Während der Totraum der mittels vCT darstellbaren oberen Atemwege der Maus unter Spontanatmung etwa ein Drittel des Gesamttotraums ausmacht (anatomischer Totraum einer 25g Maus unter Spontanatmung ist etwa 0,06125 ml (81; 90; 101)), wird dieser Wert unter einer Beatmung mit 6 ml/kg KG  $V_T$  einerseits verdoppelt, andererseits macht dieses zusätzliche Volumen dann bereits knapp 23% des eingebrachten Tidalvolumens (0,175 ml bei einer 25 g Maus bei 6 ml/kg KG  $V_T$  (90; 101)) aus, das Volumen der distalen Atemwege noch gar nicht mit einberechnet. Die Vermutung liegt nahe, dass es unter diesen Bedingungen zu einer Unterversorgung der Alveolen mit Volumen beziehungsweise Sauerstoff kommt, da das Atemzugvolumen sozusagen „ungenutzt“ in den zuleitenden Atemwegen „versackt“. Unter den hier gemachten Versuchen kam es jedoch nicht zu einem volumenbedingten Sauerstoffmangel, da alle Versuche *in vivo* mit einer  $FiO_2$  von 1,0 durchgeführt wurden.

### **5.3. Die oberen Atemwege übernehmen eine Pufferfunktion in der Atmungsphysiologie**

Anhand der Kapnographie konnten die Effekte der mechanischen Beatmung als lineare Zunahme des gesamten funktionellen Totraums bei ansteigendem Tidalvolumen beschrieben werden. Auch der Atemwegsdruck nahm mit zunehmendem Tidalvolumen nahezu linear zu. Beide Ergebnisse bestätigen die abstrakte Überlegung, dass es mit zunehmendem zugeführtem Volumen in einem in sich abgeschlossenen Körper sowohl zu einer Erhöhung des Drucks als auch zu einer Erweiterung des gefüllten Raums kommen muss. Diese abstrakte These trifft auch für die Dehnung der Lunge bei einem einzelnen Atemzug zu, zumindest bei einem mittleren Füllungsstand. Zu Beginn der Einatmung ist die Compliance der Lunge jedoch noch größer und bei maximaler Inspiration erreicht die Dehnbarkeit, ähnlich wie bei einem Luftballon, ein Plateau. Während der Druck weiter ansteigt, bleibt das Volumen dann konstant (49). Erst wenn die Dehnbarkeit der Lunge überschritten wird, folgt eine Überdehnung mit strukturellen Gewebeschäden der anatomischen Strukturen, namentlich der Alveolen und die Elastizität geht gänzlich verloren. Hinsichtlich des funktionellen Totraums waren die Ergebnisse zur Dehnbarkeit also eher erwartet als überraschend. Durch die hochauflösende Bildgebung im vCT konnte jedoch erstmals eindrücklich gezeigt werden, dass die oberen Atemwege mit zunehmendem Tidalvolumen ein nicht-lineares, sondern vielmehr glockenförmiges Verhalten zeigen und bei einem moderaten Atemzugvolumen von 10

ml/kg KG der größten Aufdehnung unterliegen, einer signifikant geringeren Aufdehnung jedoch bei einer hochvolumigen Beatmung von 15 ml/kg KG. Daraufhin wurde untersucht, in welchen Segmenten der oberen Atemwege diese Erweiterung stattfindet, und es konnte gezeigt werden, dass das glockenförmige Verhalten ausschließlich in den beiden Hauptbronchien erfolgt. Dieser proximale Abschnitt liegt bei der Maus noch extrapulmonal und zeigt, trotz der histologisch nachweisbaren Knorpelscherben (44) in der Bronchialwand, die größte Dehnung im Verhältnis zum Durchmesser unter Spontanatmung. Dem entgegengesetzt zeigen die Trachea mit ihren nahezu vollständig geschlossenen C-förmigen Knorpelspannen und die kleineren Segmentbronchien ein lineares Aufdehnungsverhalten mit zunehmendem Tidalvolumen. Gerade letztere stellen unter physiologischen Bedingungen den Großteil des Gesamttotraums, so dass sich hier eine Erklärung für die lineare Zunahme des kapnographisch ermittelten funktionellen Totraums findet. Die ebenso gleichmäßig abnehmende Röntgendichte des Lungenparenchyms, anhand derer die zunehmende Belüftung des Gewebes beschrieben werden kann, unterstützt diese Annahme, ist aber anteilig am Gesamtgewebe eher der Aufdehnung der Alveolen als den kleineren Bronchien geschuldet.

Ein weiteres Aufdehnungsverhalten zeigen eben diese Alveolen in der intravitalmikroskopischen Untersuchung. Hier konnte unter einer Beatmung mit 15 ml/kg KG  $V_T$  eine sprunghafte, unverhältnismäßig starke Aufdehnung beobachtet werden. Dieser intravitalmikroskopisch erhobene Befund ist sogar noch eine Unterschätzung der tatsächlichen Aufdehnung, da in den dargestellten Ergebnissen nur die Durchschnittsflächenzunahme beschrieben wird, sich die Alveolen aber dreidimensional ausdehnen. Nimmt man etwa die hier angeschnittene Alveolenfläche vereinfacht als Kugelquerschnittsfläche ( $\pi \cdot r^2$ ), vergrößert sich bei einer Zunahme des Tidalvolumens von 10 auf 15 ml/kg KG die Fläche um etwa 38%, das Volumen ( $\frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r^3$ ) der zugehörigen Kugel mit gleichem Radius aber um etwa 63%. Bei der immensen Anzahl der Alveolen hat diese drastische Aufdehnung einerseits einen bedeutenden Volumeneffekt, andererseits wird hier deutlich, welcher Dehnung die Alveolen bei einer Überbeatmung unterliegen.

In der hier vorgestellten Studie wurden zwar unterschiedliche Methoden der Compliance-Messung herangezogen (kapnographisch beziehungsweise durch Bildgebung ermitteltes Volumen, quasi-statische Messung im Organbad beziehungsweise dynamische Messung *in vivo*, isolierter Atemweg beziehungsweise Gesamtorganismus), wodurch die quantitativen Unterschiede in den

Werten zu begründen sind, dennoch lässt sich durch die jeweils beibehaltene Messmethode für den einzelnen Atemwegsabschnitt eine Aussage über das Verhalten der Compliance unter den verschiedenen Tidalvolumina treffen.

Die unterschiedlichen Abschnitte des Bronchialbaums bis hin in die gasaustauschenden Alveolen weisen also unterschiedliche Druck-Dehnungs-Beziehungen und dementsprechend auch unterschiedliche Compliances auf. Diese segmentspezifische Eigenschaft hat eine enorme funktionelle Auswirkung: Während unter einem nahezu physiologischen Atemzugvolumen von 6 ml/kg KG gut ein Drittel des Volumens in den dehnbaren oberen Atemwegen verbleibt, so wie es auch Sinclair unter der Spontanatmung bei Ratten beobachten konnte (83), können diese oberen Atemwege, und hier namentlich die beiden Hauptbronchien, ihre Dehnbarkeit unter einem unphysiologisch erhöhten Volumen von 10 ml/kg KG noch steigern und fangen so einen Großteil des zusätzlichen, schädigenden Volumens ab. Ist aber ein gewisser Volumenschwellenwert überschritten - in der vorliegenden Studie lag dieser Schwellenwert zwischen 10 und 15 ml/kg KG  $V_T$  - versagt die Dehnbarkeit der oberen Atemwege unter Verlust der protektiven Puffer-Funktion und gibt das überschießende Volumen nahezu unvermindert an die dehnungsempfindlichen Alveolen weiter. Es kommt zu der beschriebenen unverhältnismäßig großen Aufdehnung der Alveolen mit den zuvor erwähnten, schädigenden Folgen eines beatmungsinduzierten Lungenschadens.

Die maximale Dehnbarkeit der Hauptbronchien mit ihrem glockenförmigen Aufdehnungsverhalten, ist also bei einem Tidalvolumen von etwa 10 ml/kg KG beziehungsweise den entsprechenden Atemwegsdrücken erreicht. Diese Beobachtung einer maximalen Dehnbarkeit machten auch die Arbeitsgruppen um Waters in Ratten (83) und Hyatt und Flath in beatmeten Hunden (43). Auf die funktionellen Folgen dieser Restriktion wurde dort aber nicht eingegangen. Erstaunlich ist jedoch die Beobachtung, dass die Compliance der gesamten oberen Atemwege (Trachea bis Segmentbronchien), wie sie aus den durch die vCT Scans ermittelten Volumina und den gemessenen Atemwegsdrücken berechnet wurde, unter der großvolumigen Beatmung mit 15 ml/kg KG  $V_T$  nicht das erwartete Plateau, sondern tendenziell eine Abnahme aufweist, obwohl der Atemwegsdruck und das eingebrachte Volumen noch ansteigen. Folglich zeigen auch die beiden Hauptbronchien das unerwartete glockenförmige Dehnungsverhalten. Die Vermutung liegt also nahe, dass die Dehnbarkeit zum einen durch die anatomischen Bedingungen, also Knorpelscherben und begrenzte Volumenzunahme durch den Widerstand des umliegenden Thorax, vorgegeben

wird, diese maximal mögliche Dehnbarkeit aber bei hohen Tidalvolumina durch gewisse Strukturveränderungen zusätzlich eingeschränkt wird.

Was diese Strukturveränderung bewirkt und ausmacht, kann derzeit nur gemutmaßt werden. Relevante Hinweise auf eventuell zugrundeliegende Pathomechanismen erschließen sich aus den deutlichen histologischen Veränderungen nach einer Beatmung mit 15 ml/kg KG  $V_T$ . Die hier gesehenen Blutungen um peribronchiale Gefäße könnten einen ersten Hinweis auf die Einschränkungen der Durchmesserzunahme der betroffenen Bronchien liefern. Ähnliche Anzeichen fanden auch Lowe und Kollegen, die eine Abnahme der Compliance der Lunge aufgrund perivaskulärer Ödeme, die durch eine intravenöse Thapsigargin-Infusion verursacht wurden, zeigen konnten (55). Dieses Entstehen perivaskulärer Ödeme konnten ebenfalls in eigenen Versuchen, ohne Thapsigargin-Gabe aber nach bronchoalveolärer Lavage, gezeigt werden (70). Die in der vorliegenden Studie beobachteten histologischen Veränderungen an den intrapulmonalen Gefäßen und Bronchien erklären also möglicherweise, warum es zur Abnahme der Compliance in den extrapulmonalen Hauptbronchien der Maus kommt.

Eine zunehmende Versteifung der oberen Atemwege bei anhaltender Beatmung wäre auch denkbar durch eine Akkumulation von Leukozyten, wie sie Wagner mit Kollegen nach einer Beatmung mit hohen Drücken in der Trachea von Mäusen zeigen konnte (104) und durch die nachfolgende Entzündung mit klassischer Gewebeswellung.

Beide Erklärungen für das glockenförmige Aufdehnungsverhalten der Hauptbronchien, die perivaskulären Blutungen und die sich eventuell entwickelnde Entzündungsreaktion lassen sich aber nur schwer mit der Tatsache vereinen, dass einige der gemachten Beobachtungen (Kapnographie, Intravitalmikroskopie der Alveolen) zum Verhalten der Atemwege vollständig reversibel und im selben Tier auch wiederholbar waren. Während eine Abnahme des Volumens noch möglich ist, wäre also die erneute glockenförmige Dehnung der Hauptbronchien dadurch ausgeschlossen, dass eine größere Dehnung bei 10 ml/kg KG  $V_T$  durch raumfordernde strukturelle Veränderungen verhindert wird. Die Studien im vCT erfolgten nicht in randomisierter Reihenfolge, denn auch bei der mit Spontanatmungsphasen unterbrochenen Beatmung wurde das Tidalvolumen sequentiell erhöht. Die direkte Bildgebung der Hauptbronchien scheidet für die Überprüfung dieser Überlegung also aus. Die kapnographische Messung des funktionellen Totraums wurde allerdings in randomisierter Reihenfolge und wiederholt im selben Tier untersucht, ebenso die sprunghafte Aufdehnung der Alveolen unter den verschiedenen Atemzugvolumina. Beide Untersuchungen



sprechen für eine Reversibilität der maximalen Dehnung der Hauptbronchien bei 10 ml/kg KG  $V_T$ , die auch nach einer Beatmung mit 15 ml/kg KG  $V_T$  vollständig zu wiederholen war. Für die These, dass die Hauptbronchien nicht erneut maximal aufgedehnt werden können, sondern durch die Entzündungsreaktion und die raumfordernden perivaskulären Blutungen dauerhaft in ihrer Dehnungsfähigkeit eingeschränkt sind, spricht aber, dass allein aus der Alveoldynamik und der Kapnographie keine Rückschlüsse auf das Verhalten der Hauptbronchien gezogen werden sollte. Das besondere Dehnungsverhalten, wie es für die Hauptbronchien gezeigt werden konnte, unterstützt die These, dass überschüssiges Volumen bei einer moderaten Beatmung vorrangig in extraalveolären luftleitenden Bereichen abgefangen wird. Dies wird auch bereits 1999 in der wichtigen Studie von Tschumperlin und Marguelies angedeutet, die zeigen konnten, dass die Fläche der alveolären Basalmembran mit zunehmendem Lungenvolumen hyperbol zunimmt (96). Während das Lungenvolumen und der Atemwegsdruck mit zunehmendem Tidalvolumen linear ansteigen, werden die Alveolen zunächst nur gering, bei höherem Lungenvolumen aber stark gedehnt. Auch bei den an isolierten Rattenlungen durchgeführten Messungen von Tschumperlin und Margulies lässt sich also ein „Versacken“ des Tidalvolumens in den proximalen Atemwegen ablesen. Was die Abnahme der Compliance der oberen Atemwege bei einer deutlichen Überbeatmung mit 15 ml/kg KG  $V_T$  verursacht und ob die hier erstmals postulierten Pufferfunktion der Hauptbronchien durch eine einmalige Schädigung dauerhaft eingeschränkt wird, kann an dieser Stelle nicht abschließend geklärt werden.

#### **5.4. Die Aufdehnung der Atemwege trägt zur Entstehung des beatmungsinduzierten Lungenschadens bei**

Die Entstehung des beatmungsinduzierten Lungenschadens wird bislang in der Literatur vornehmlich einer Überdehnung der Alveolen zugeschrieben (27; 62; 95; 98; 102), eine Beobachtung, die auch in der hier vorliegenden Studie bei einer Überbeatmung mit 15 ml/kg KG gemacht werden konnte. Folgen dieser alveolären Überdehnung können die Ausschüttung von Zytokinen aus dem Lungengewebe sein (41; 95), die eine Rekrutierung von Leukozyten in das Lungenparenchym und Barrierefunktionsstörungen der Blut-Luft-Schranke mit Lungenödembildung verursachen können. Mit der Zytokinausschüttung ist das entscheidende Kriterium des Biotrauma-Konzepts (27; 95; 102) des beatmungsinduzierten Lungenschadens erfüllt. Im Experiment und auch in der Klinik wird die Zytokinausschüttung aus dem Lungengewebe und einwandernden Leukozyten meist systemisch im Blut (60) oder

lungenspezifisch in der BAL (32) gemessen, eine Ergänzung dazu ist die Bestimmung der Infiltration neutrophiler Granulozyten beziehungsweise der Myeloperoxidaseaktivität im Lungengewebe als Indikator der Neutrophilenakkumulation (52). Mit den hier gezeigten Ergebnissen können die bisherigen Daten, die diese Entzündungssymptome alleinig auf die Überdehnung der empfindlichen Alveolen zurückführen, jedoch hinterfragt werden.

Bereits in den durch die anatomischen Voraussetzungen relativ steifen Tracheen von Mäusen ließ sich durch die Beatmung und die dadurch verursachte Dehnung an den Zwischenknorpelringen eine signifikante Zytokinausschüttung provozieren. Die druckgesteuerte Beatmung im Organbad lässt sich zwar nicht deckungsgleich auf die volumengesteuerte Beatmung *in vivo* übertragen, erreicht mit einem Spitzendruck von 17 cmH<sub>2</sub>O jedoch vergleichbare Werte wie die Beatmung mit einem Tidalvolumen von 15 ml/kg KG und imitiert zusätzlich die reziproke Durchströmung des Atemwegs in Abwesenheit der nachgeschalteten Lunge. Vergleicht man nun die Dehnungsfähigkeit der Trachea mit der der Hauptbronchien oder die gedehnte Reaktionsfläche, also die reaktive innere Auskleidung, der Trachea mit der der Segmentbronchien, könnte die Zytokinausschüttung der beiden hier untersuchten proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in den sich der Trachea anschließenden Atemwege aufgrund mangelnder Knorpelspannen und größere Gesamtoberfläche noch um ein vielfaches größer sein. Die Ausschüttung von MIP-2 hingegen bleibt sowohl in der unbeatmeten als auch durch Beatmung gedehnten Trachea bei gleichem Niveau, da MIP-2 vornehmlich von mobilen Entzündungszellen exprimiert wird (6), die in der isolierten Trachea mit vor allem epithelialen und mesenchymalen Zellen nur in geringem Maße vorhanden sind. Die Überprüfung der MIP-2 Konzentration diene hier damit als Negativkontrolle.

Erste Beobachtungen zur lokalen Zytokinausschüttung konnte 2003 bereits die Arbeitsgruppe um Kavanagh machen, die in für 90 Minuten mit 25 ml/kg KG V<sub>T</sub> überbeatmeten Rattenlungen anhand von Microarrays eine Hochregulierung von IL-1 $\beta$  nachweisen konnten. Mit Hilfe von *in situ* Hybridisierung und Laser-assistierter Microdissektion konnte die Hochregulierung von IL-1 $\beta$  sowie dreier weiterer Zielgene (Egr-1, c-Jun und HSP70) vornehmlich im bronchiolären und nicht etwa im alveolären Epithel lokalisiert werden (23). Diese Ergebnisse auf Ebene der Gene unterstützen unsere Hypothese, dass die Dehnung der oberen Atemwege zu einer lokalen Entzündungsreaktion führt. Funktionelle Untersuchungen der Folgen einer solchen Hochregulierung inflammatorischer Gene konnte Wagner mit ihren Kollegen machen, indem sie

mittels Intravitalmikroskopie nachwies, dass eine Beatmung mit hohen PEEP-Werten die Adhäsion von Leukozyten an postkapillären Venolen der Atemwege in beatmeten Mäusen und Ratten stimuliert (54; 104). Diese PEEP-stimulierte Adhäsion konnte mit einem unspezifischen Selektin-Inhibitor, Fucoidin, blockiert werden (54) und fehlte in Mäusen mit einer Defizienz für P-Selektin oder das interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1 (104). Das spricht dafür, dass die Dehnung der Atemwege die Expression von Leukozyten-Adhäsionsmolekülen im Endothel peribronchialer Blutgefäße verstärkt. Eine Auswirkung der Dehnung auf die peribronchialen Blutgefäße konnte auch in der hier vorgestellten Studie nachgewiesen werden: Die Blutungen aus den Gefäßen in der Nähe der gedehnten Atemwege könnten die Folge einer Permeabilitätssteigerung sein, wie sie durch die vom Parenchym sowie von eingewanderten und aktivierten Leukozyten ausgeschütteten Zytokinen herrühren können (57). Die peribronchialen Blutungen traten bereits bei einem Tidalvolumen von 10 ml/kg KG auf und die ursächliche Dehnung der Atemwege zeigte sich bereits bei einer mechanischen Beatmung mit 6 ml/kg KG  $V_T$ . Damit spielen die gezeigten Veränderungen auf Gen-, Protein- und funktioneller Ebene vermutlich bereits bei moderaten und klinisch relevanten Atemzugvolumina eine Rolle, und es konnte gezeigt werden, dass die Reaktion nicht nur auf die Atemwege begrenzt bleibt, sondern Auswirkungen auf das umliegende Gewebe beziehungsweise die umliegenden Gefäße hat. Werden diese moderaten Atemzugvolumina überschritten und die oben beschriebene protektive Pufferfunktion der oberen Atemwege ausgereizt, kommt es, wie in der Literatur postuliert (27) und in den histologischen Schnitten bestätigt, bei einer Beatmung mit 15 ml/kg KG  $V_T$  zur Überdehnung der Alveolen mit einer Verletzung der Blut-Luft-Schranke und Einblutungen in den Alveolarraum. Während sich die hier gemachten Beobachtungen zur Alveolenschädigung unter hochvolumiger Beatmung also mit der bisher angenommenen Ursache für die Entstehung des beatmungsinduzierten Lungenschadens decken, konnte jetzt gezeigt werden, dass schon vor der klinisch nachweisbaren Alveolenschädigung die luftleitenden Atemwege auch unter wesentlich geringeren Tidalvolumina gedehnt werden und die gezeigten proinflammatorischen Reaktionen auslösen können. Es kann also angenommen werden, dass die bisher experimentell untersuchten Entzündungsparameter, die anhand systemischer Zytokinwerte im Blut gemessen wurden beziehungsweise anhand ermittelter Zellzahlen von neutrophilen Granulozyten im vollständigem Lungengewebe bestimmt wurden, nicht ausschließlich der Reaktion der Alveolen, sondern zumindest anteilig auch der Dehnung der Atemwege zugeschrieben werden müssen. Damit konnte mit der vorliegenden Untersuchung

erstmalig gezeigt werden, dass die oberen Atemwege eine bislang unerkannte, aber durchaus zu berücksichtigende Rolle in der Pathogenese des beatmungsinduzierten Lungenschadens spielen.

### **5.5. Übertragbarkeit der Ergebnisse auf größere Säugetiere und den Menschen**

Es konnte gezeigt werden, dass den oberen Atemwegen in der Pathogenese des beatmungsinduzierten Lungenschadens der Maus eine erhebliche Bedeutung zukommen könnte. Doch lassen sich die gewonnenen Erkenntnisse auch auf größere Säugetiere oder gar den Menschen übertragen? Eine derartige Aufdehnung der oberen Atemwege, wie sie bei der Maus beobachtet werden konnte, wurde bei beatmeten Patienten bislang nicht dokumentiert. Es ist davon auszugehen, dass die oberen Atemwege des Menschen keiner solchen deutlichen Aufdehnung unter mechanischer Beatmung unterliegen, da sie deutlich rigider als bei der Maus scheinen. Dies stimmt auch mit der Anatomie der Hauptbronchien des Menschen mit ihren geschlossenen Knorpelringen (7) überein, die einer widerstandslosen Aufdehnung widerspricht. Demgegenüber entspricht die Anatomie der murinen Hauptbronchien mit den in die Wand der Atemwege eingelagerten Knorpelscheiben vielmehr dem Aufbau der distalen Bronchien zwischen Segment- und terminalen Bronchien bei größeren Säugetieren. Um eine Vergleichbarkeit herzustellen, musste untersucht werden, ob die distalen Atemwege von größeren Säugern einer vergleichbaren Dehnung wie die oberen Atemwege bei der Maus bei mechanischer Beatmung unterliegen. Um erste Daten zu dieser Fragestellung zu sammeln, wurden im Durchmesser der Trachea ähnliche Segmentbronchien des Schweins untersucht, mit dem Ergebnis, dass die umfassenden Knorpelscherben der porcinen Segmentbronchien einen angemessenen Vergleich hinsichtlich der Anatomie der murinen Trachea zulassen. Die Knorpelscherben treten sowohl beim Schwein als auch beim Menschen bis in sehr kleine Bronchien auf und halten durch diese Stützfunktion die Atemwege passiv offen. Bei der Maus treten diese großen Knorpelscherben neben der unteren Trachea nur in den Hauptbronchien auf (44; 47) und letztere zeigen in den bisherigen Ergebnissen eine noch deutlichere Dehnbarkeit als die Trachea. Es ist also zunächst davon auszugehen, dass auch die von Scherben gestützten Segmentbronchien des Schweins noch eine deutlich höhere Dehnbarkeit aufweisen als die der murinen Trachea und eventuell in der Dehnbarkeit den Hauptbronchien der Maus ähneln, die sich einer weitergehenden Untersuchung aber aufgrund der geringen Segmentlänge und Verästelung entzogen.

Der direkte Vergleich hinsichtlich der Compliance beider Atemwege unterstützt die Vermutung, dass in den kleineren Atemwegen des Schweins ähnliche Druck-Dehnungsbeziehungen wie in der

Trachea der Maus vorliegen. Auch wenn dadurch die potentielle Dehnbarkeit der isolierten porcinen Segmentbronchien gezeigt werden konnte, ist es anhand der präliminären Daten jedoch nicht möglich, die an der Maus gewonnenen Hinweise direkt auf die distalen Atemwege größerer Säugetiere und des Menschen zu übertragen. Die Tatsache, dass die Hauptbronchien der Maus im Gegensatz zu den intrapulmonalen Atemwegen der größeren Säuger extrapulmonal liegen, die Unterschiede in der Verteilung der Knorpelscherben und die verschiedenen Aufzweigungsmuster des Bronchialbaumes in den unterschiedlichen Spezies sind nur einige Gegebenheiten, die die Übertragbarkeit erschweren. Zudem muss davon ausgegangen werden, dass das Druck-Dehnungsverhalten vor allem der kleineren Atemwege stark von den Eigenschaften, also unter anderem von Widerstand und Elastizität, des umliegenden Gewebes und dessen parenchymalen Verbindungen zu der äußeren Wand der Atemwege abhängen. Auch wenn diese Einwände vermutlich große Einflüsse auf die quantitative Dehnung der kleineren Atemwege größerer Säugetiere haben, ist eine qualitative Übertragung der gewonnen Erkenntnisse aber durchaus durchführbar nämlich insofern dass erstens eine Aufdehnung der konduktiven Atemwege aus anatomischer Sicht möglich ist, dass diese Aufdehnung zweitens ein Volumenreservoir zum Abfangen überschießender Tidalvolumina zum Schutz der dehnungsempfindlichen Alveolen darstellen könnte und dass drittens die Aufdehnung der Atemwege mit einer proinflammatorischen Reaktion einen potentiellen Beitrag zur Entstehung des beatmungsassoziierten Lungenschadens hat. Die Vermutung, dass die bei der Maus beobachteten Effekte der mechanischen Beatmung auf die oberen Atemwege, und hier vor allem auf die Hauptbronchien, bei größeren Säugern und dem Menschen in ähnlicher Weise in den weiter distal gelegenen kleineren Bronchien auftreten, bedarf weiterer Untersuchungen. Lassen sich die in der vorliegenden Arbeit an Mäusen gemachten Daten tatsächlich auch auf beatmete Patienten übertragen, stellen die oberen Atemwege mit ihrer zugleich protektiven als auch dehnungsempfindlichen Reaktion auf die mechanische Beatmung eine neues Zielobjekt für die Verbesserung protektiver Beatmungsverfahren dar.

### **5.6. Physiologische und klinische Relevanz in der Veterinär- und Humanmedizin**

Die präliminären Daten zu den Dehnungseigenschaften der Atemwege geben folglich einen ersten Hinweis auf die Übertragbarkeit der an der Maus gewonnenen Erkenntnisse auf größere Säugetiere beziehungsweise den Menschen. Das hier erstmals postulierte Konzept, dass überschüssiges Tidalvolumen innerhalb der Atemwege umverteilt werden kann, hat sowohl physiologische als

auch klinische Bedeutung in der Medizin. Drei Hauptaussagen zu diesem Phänomen können gemacht werden:

Zunächst konnte gezeigt werden, dass die oberen Atemwege quasi ein Volumenreservoir darstellen, das die empfindlichen Alveolen vor einer schädlichen Dehnung schützen kann.

In tierexperimentellen Studien mit Mäusen führt eine Beatmung mit geringen Tidalvolumina und Raumluft erfahrungsgemäß allerdings zur Hypoxämie und nicht selten zum Versterben des Versuchstieres. Nach den hier gemachten Ergebnissen ist dieses Phänomen mutmaßlich auf ein „Versacken“ des Tidalvolumens in den mechanisch gedehnten oberen Atemwegen zurückzuführen. Durch die Beatmung mit reinem Sauerstoff konnte in der vorliegenden Studie dieses Problem umgangen werden. Auch in der angewandten Medizin ist mit einer Unterversorgung an Sauerstoff nach einer künstlichen Beatmung nicht zu rechnen, da sich die Volumenzunahme der oberen Atemwege als vollständig reversibel darstellte, wenn zur Spontanatmung zurückgekehrt wurde. Auch wenn die hier gemachten Untersuchungen zur Reversibilität erst nach einem Intervall von 10 minütiger Spontanatmung stattfanden, heißt das nicht, dass die Atemwege nicht schon wesentlich früher, eventuell direkt nach der Trennung vom Beatmungsgerät, zu ihrem Ausgangsvolumen zurückkehren. Hierfür liefern die isoliert beatmeten Tracheen Hinweise, die bei einem Atemwegsdruck von 0 mmHg in der Expirationsphase sofort zum Ausgangsdurchmesser ohne Beatmung zurückkehrten und auch die Beobachtungen von Sinclair zeigten, dass die Aufdehnung der oberen Atemwege innerhalb eines Atemzuges auf den Ausgangswert zurückfällt (83). Die Compliance-Messungen im Organbad der zunächst für eine Stunde *in vivo* mit unterschiedlichen Volumina beatmeten Tracheen zeigte zwar eine Tendenz, dass es zu einer Art „Vordehnung“ der Atemwege kommen kann, allerdings konnten hier keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Zudem ist in diese Überlegungen noch nicht das umliegende Gewebe, also sowohl das elastische Lungengewebe als auch der eine annähernd feste Begrenzung gebende Thorax miteinbezogen, wodurch eine dauerhafte Totraumerweiterung nach einer mechanischen Beatmung vermutlich kaum klinische Relevanz hat.

Als zweite Beobachtung konnte das Vorhandensein eines gewissen Schwellenwertes beschrieben werden, bei dessen Überschreiten das Tidalvolumen in die distalen Atemwege und die sensitiven Alveolen weitergeleitet wird. Wo dieser Schwellenwert bei verschiedenen Tierarten, im Experiment und in der Klinik, oder beim Menschen unter künstlicher Beatmung liegt, wie dieser

Wert patientenindividuell ermittelt und therapeutisch genutzt werden kann, bedarf jedoch weitergehender Untersuchungen.

Die dritte Erkenntnis, die sich aus der Umverteilung des Atemzugvolumens über den Bronchialbaum und die daraus abzuleitenden Dehnungseigenschaften der einzelnen Abschnitte ergibt, ist eine mechanistische Erklärung für die bereits erkannte Problematik, dass die Druck-Volumen-Kurve beziehungsweise die daraus abzulesende Compliance der gesamten Lunge ein schlechter Indikator für die tatsächliche Aufdehnung der Alveolen ist (79). Inwieweit also diese protektiven Eigenschaften der Atemwege unter mechanischer Beatmung für die medizinische Anwendung genutzt werden können, aber auch, welche weiteren physiologischen Folgen die mit jedem Atemzug vollzogene geringe Dehnung der Atemwege, wie sie von Sinclair unter Spontanatmung beobachtet wurden (83), nach sich ziehen, sollte Ziel weiterer Untersuchungen sein.

Auch die Erkenntnisse zu der entzündlichen Reaktion der mechanisch gedehnten Atemwege bereits unter klinisch relevanten Atemzugvolumina sollte Einfluss auf zukünftige experimentelle Studien und auf die Verbesserung der medizinisch notwendigen Beatmung haben. So sollte erneut hinterfragt werden, ob die in der ARDS-Netzwerkstudie (1) empfohlene Beatmung mit 6 ml/kg KG  $V_T$  uneingeschränkt als protektiv anzusehen ist, wenn in den vorliegenden Ergebnissen bereits mit diesem geringen Tidalvolumen eine signifikante Aufdehnung der Atemwege nachgewiesen werden konnte, obwohl dieses Volumen noch vergleichbar mit dem physiologischen Tidalvolumen unter Spontanatmung von Mäusen (89; 90) und Menschen (93) ist. Welche klinische Relevanz diese Aufdehnung hat, zeigt sich in diversen Studien, die zeigen, dass auch bei einer kleinvolumigen Beatmung eine deutliche entzündliche Reaktion bei Mäusen (38; 99) und Menschen (112) verursacht wird. Diese Effekte lassen sich nicht ausschließlich auf die Überdehnung der Alveolen zurückführen, da ja das geringe Tidalvolumen dem unter Spontanatmung entspricht (89; 90; 93), und erscheinen mit den hier hinzukommenden Ergebnissen besser erklärbar. Auch wenn in der aktuellen Studie der zusätzlich dehnende Effekt eines 2 cmH<sub>2</sub>O PEEP nicht außer Acht gelassen werden sollte, schwächt das die klinische Relevanz der Ergebnisse nicht ab, da bei der mechanischen Beatmung von tierischen und menschlichen Patienten vergleichbare oder sogar höhere PEEP-Level als Standardeinstellung verwendet wird.

In den 1975 gemachten Beobachtungen von Hedenstierna konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einem Atemversagen bei zunehmendem Tidalvolumen einen etwa 50%igen Anstieg des mittels

CO<sub>2</sub>-Analyse gemessenen anatomischen Totraums zeigen, wenn sie mit einer Langzeitbeatmung versorgt wurden (39). Zudem konnte ein deutlich linearer Zusammenhang zwischen dem anatomischen Totraum und dem endinspiratorischen Trachealdruck gefunden werden. Beide Ergebnisse wiesen demnach bereits damals auf eine mechanische Aufdehnung des anatomischen Totraums hin und lassen sich durch die aktuellen, bildgebenden Verfahren bestätigen. Weiter konnten Hedenstierna und Lundberg in einer anderen Untersuchung darlegen, dass die Atemwegscompliance von narkotisierten und beatmeten Patienten deutlich höher ist als bei spontanatmenden Patienten (40). Diese Feststellung lässt darauf schließen, dass beatmete Patienten, die schon allein durch die maschinelle Beatmung dem Risiko eines beatmungsinduzierten Lungenschadens ausgesetzt sind, durch die zusätzliche Compliance-Erhöhung unter Narkose und Beatmung ein nochmals höheres Risiko der Überdehnung von luftleitenden Atemwegen mit den beschriebenen schädigenden Folgen haben.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass die luftleitenden Atemwege sowohl protektive als auch zusätzlich dehnungssensitive, potentiell entzündliche Eigenschaften vereinen, die bislang keine oder nur geringe Beachtung im aktuellen Stand der Wissenschaft fanden. Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die Aufdehnung der luftleitenden Atemwege unter mechanischer Beatmung ursächlich in die pathogenetischen Konzepte des beatmungsinduzierten Lungenschadens Eingang finden sollte. Darüber hinaus sollte weitere Forschungsenergie in die Frage investiert werden, ob die Aufdehnung der oberen Atemwege als Pufferfunktion gefördert oder ob diese Aufdehnung aufgrund der lokalen Entzündungsreaktion verhindert werden sollte. Weitere funktionelle und translationale Untersuchungen erscheinen vielversprechend, da sich die Atemwege als eine aussichtsreiche Stellgröße für die Entwicklung protektiver Beatmungsmodelle beziehungsweise als ein vielversprechendes Zielorgan für ein therapeutisches Eingreifen darstellen.



## 6. Zusammenfassung

### Quantitative Analyse des Totraums unter mechanischer Beatmung

Die Pathogenese des beatmungsinduzierten Lungenschadens wird in der aktuellen Literatur vornehmlich einer Überdehnung oder dem mechanisch hervorgerufenen Öffnen und Kollabieren der Alveolen zugeschrieben. Die Auswirkungen, die die mechanische Beatmung auf die oberen Atemwege hat, wurden bislang hingegen kaum in Betracht gezogen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass die mechanische Beatmung zu einer Erweiterung der luftleitenden Atemwege führen kann, die wiederum Anteil an der Entstehung des Krankheitsbildes eines beatmungsinduzierten Lungenschadens hat.

Zur Durchführung der Versuche wurden adulte C57Bl/6J Mäuse anästhesiert und mit Tidalvolumina von 6, 10 beziehungsweise 15 ml/kg Körpergewicht beatmet. In volumencomputertomographischen (vCT) Studien wurden die zentralen Atemwege der beatmeten Mäuse erfasst, segmentiert und dreidimensional rekonstruiert, um eine quantitative Analyse des Volumens der oberen Atemwege zu ermöglichen. Mittels intravitalmikroskopischer Aufnahmen wurde sowohl die Dehnung der isolierten Trachea im Organbad als auch die der subpleuralen Alveolen *in vivo* untersucht. Zur Messung des funktionellen Totraums wurde an beatmeten Tieren eine Kapnographie durchgeführt. Die Compliance der oberen Atemwege beziehungsweise des gesamten funktionellen Totraums wurde anhand von entsprechenden Druck-Volumen-Kurven berechnet. An isoliert beatmeten Tracheen wurde die beatmungsinduzierte Ausschüttung von Frühphase-Zytokinen analysiert. Eine Untersuchung von histologischen Schnitten der Lungen nach mechanischer Beatmung ermöglichte die Auswertung des entstandenen Gewebeschadens. Zum Speziesvergleich wurden die mechanischen Eigenschaften muriner Tracheen und von Segmentbronchien vergleichbaren Kalibers des Schweins im Organbad anhand computergestützter Druck-Volumen-Schleifen ermittelt.

Die vCT Studien zeigten einen bis zu zweieinhalbfachen Anstieg des Volumens der oberen Atemwege unter mechanischer Beatmung, der sich nach Rückkehr zu Spontanatmung als vollständig reversibel darstellte. Die größte Aufdehnung wurde in den beiden Hauptbronchien beobachtet und war bereits bei einem moderaten Tidalvolumen von 10 ml/kg KG am deutlichsten ausgeprägt. Die Trachea, die distalen Segmentbronchien und auch der funktionelle Totraum hingegen zeigten eine lineare Zunahme des Volumens mit ansteigendem Tidalvolumen. Die Alveolen als letzte Einheit des Bronchialbaums dehnten sich unverhältnismäßig stark bei Erhöhung

des Tidalvolumens von 10 ml/kg KG auf 15 ml/kg KG. In isolierten Tracheen konnte nach mechanischer Beatmung eine signifikante Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  festgestellt werden. Der Vergleich zwischen Luftröhren der Maus und kleinen Segmentbronchien des Schweins zeigte neben ähnlichen anatomischen Strukturen auch vergleichbare Werte der Volumendehnbarkeit.

Die mechanische Beatmung führt bei Mäusen also zu einer schnellen, deutlichen und reversiblen Aufdehnung der oberen Atemwege mit einer damit einhergehenden Erweiterung des funktionellen Totraums. Die oberen Atemwege, die sich am deutlichsten bei einem moderaten Tidalvolumen weiten, zeigen unter dieser Dehnung neben einer Entzündungsreaktion auch histologisch auffällige Schäden an den umliegenden Gefäßen und können damit selbst maßgeblich zur Entstehung des beatmungsinduzierten Lungenschadens beitragen. Auf der anderen Seite übernehmen sie aber auch eine Pufferfunktion, um die empfindlicheren Alveolen vor einer Überdehnung durch überhöhte Atemzugvolumina zu schützen. Diese protektive Eigenschaft geht aber verloren, sobald ein gewisser Volumenschwellenwert überschritten wird. In diesem Fall wird das schädliche Volumen unvermindert an die distalen Atemwege und die Alveolen weitergegeben und führt dort zu dem bekannten Bild des beatmungsinduzierten Lungenschadens mit Gewebeschaden, Entzündungsreaktion, Funktionsverlust der Blut-Luft-Barriere und nachfolgend zu vermindertem Gasaustausch in der Lunge.

Erste speziesübergreifende Untersuchungen lassen schlussfolgern, dass die Beobachtungen hinsichtlich der Volumendehnbarkeit der oberen Atemwegen der Maus auf die distalen Atemwege größerer Säugetiere wie dem Schwein und den Menschen übertragen werden können, da hier sowohl ähnliche anatomische Strukturen als auch Dehnungseigenschaften in den jeweiligen Abschnitten des Bronchialbaums gezeigt werden konnten. Sowohl die potentiell protektive Funktion als auch das zusätzlich für eine Schädigung empfängliche Gewebe der oberen Atemwege der Maus beziehungsweise der distalen Atemwege größerer Säugetiere sollte daher in pathophysiologische Konzepte zur Entstehung des beatmungsinduzierten Lungenschadens miteinbezogen werden.

## 7. Summary

### **Quantitative analysis of dead space under mechanical ventilation**

According to the current literature, the pathogenesis of ventilator-induced lung injury is exclusively caused by overdistension or forced opening and collapse of the alveoli, while stretch of the upper airways is generally not taken into consideration. In the present thesis we hypothesized that mechanical ventilation may lead to a distension of the upper airways that may contribute relevantly to the characteristic pathophysiologic symptoms of ventilator-induced lung injury.

Experiments were performed on anesthetized adult C57Bl/6J mice that were ventilated with tidal volumes of 6, 10 or 15 ml/kg body weight (bw), respectively. Flat-panel volume CT (vCT) scans were performed and central airways were segmented and rendered to 3D to analyse quantitatively the volume of the upper airways. By intravital microscopy, distension of the isolated trachea as well as of the subpleural alveoli *in vivo* was imaged. Functional dead space was evaluated by capnographic studies. Compliance of the upper airways and of the functional dead space were calculated by appropriate pressure-volume-curves. In isolated and mechanically ventilated tracheae early response cytokine release was measured. Histological analyses of lung tissue after ventilation allowed for assessment of tissue damage subsequent to mechanical ventilation. To compare the mechanical properties between mice and larger mammals, murine trachea and porcine segmental bronchi of equal diameter were analysed in an organ bath by computer-assisted pressure-volume-slopes.

vCT studies revealed a significant up to 2.5-fold increase of upper airway volume under mechanical ventilation, which was reversible upon return to spontaneous breathing. The most significant distension was detected in the main bronchi already under moderate tidal volumes of 10 ml/kg bw, whereas trachea, segmental bronchi and functional dead space showed a linear volume increase with higher tidal volumes. Alveoli as the most distal part of the bronchial tree even showed disproportional distension under mechanical ventilation when  $V_T$  was increased from 10 ml/kg bw to 15 ml/kg bw.

In isolated tracheae mechanical ventilation caused a significant release of the proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . Comparison of murine tracheae and porcine segmental bronchi revealed similar anatomical structures and comparable values of airway compliance.

Mechanical ventilation causes a rapid, pronounced and reversible distension of the upper airways, accompanied by an increase of functional dead space. Upper airways distend mostly under

moderate tidal volumes, associated with a proinflammatory reaction and tissue injury of the surrounding blood vessels. Hence, mechanical ventilation causes upper airway distension that may contribute critically to the pathological features of ventilator-induced lung injury. On the other hand, upper airways seem to act as a buffer system to protect the sensitive alveoli from overdistension by excessive tidal volumes. This protective function is lost as soon as a certain volume threshold is exceeded. In that case, the damaging volume is passed undiminished to the distal airways and alveoli and causes the common clinical pattern of ventilator-induced lung injury, as emphysema or edema formation, loss of function of the blood-air-barrier and reduced gas exchange in the lungs.

Preliminary interspecies comparison between murine tracheae and porcine segmental bronchi allows for the transfer of our findings in terms of a potential distal airway distension with the associated inflammatory reaction and protective function to larger mammals such as pigs and men. Hence, upper airway distension should be taken into consideration in the pathophysiological concept of ventilator-induced lung injury.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. *N Engl J Med* 342: 1301-1308, 2000.
2. International consensus conferences in intensive care medicine: Ventilator-associated Lung Injury in ARDS. This official conference report was cosponsored by the American Thoracic Society, The European Society of Intensive Care Medicine, and The Societe de Reanimation de Langue Francaise, and was approved by the ATS Board of Directors, July 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 2118-2124, 1999.
3. **Allardet-Servent J, Forel JM, Roch A, Guervilly C, Chiche L, Castanier M, Embriaco N, Gannier M and Papazian L.** FIO<sub>2</sub> and acute respiratory distress syndrome definition during lung protective ventilation. *Crit Care Med* 37: 202-206, 2009.
4. **Amato MB, Barbas CS, Medeiros DM, Magaldi RB, Schettino GP, Lorenzi-Filho G, Kairalla RA, Deheinzelin D, Munoz C, Oliveira R, Takagaki TY and Carvalho CR.** Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 338: 347-354, 1998.
5. **Anzueto A, Frutos-Vivar F, Esteban A, Alia I, Brochard L, Stewart T, Benito S, Tobin MJ, Elizalde J, Palizas F, David CM, Pimentel J, Gonzalez M, Soto L, D'Empaire G and Pelosi P.** Incidence, risk factors and outcome of barotrauma in mechanically ventilated patients. *Intensive Care Med* 30: 612-619, 2004.
6. **Armstrong DA, Major JA, Chudyk A and Hamilton TA.** Neutrophil chemoattractant genes KC and MIP-2 are expressed in different cell populations at sites of surgical injury. *J Leukoc Biol* 75: 641-648, 2004.
7. **Arnold G, Beier HM, Herrmann M, Kaufmann P, Kretschmann H-J, Kühnel W, Schiebler TH, Schmidt W, Steiniger B, Winckler J, van der Zypen E and Zilles K.** *Anatomie*. Berlin u.a.: Springer, 489-506, 1997.
8. **Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL and Levine BE.** Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 2: 319-323, 1967.
9. **Bates JH and Smith B.** Assessing the Progression of Ventilator-Induced Lung Injury in Mice. *IEEE Trans Biomed Eng* 2013, Jun 7 (Epub ahead of print).

10. **Bein T, Weber-Carstens S, Goldmann A, Muller T, Staudinger T, Brederlau J, Muellenbach R, Dembinski R, Graf BM, Wewalka M, Philipp A, Wernecke KD, Lubnow M and Slutsky AS.** Lower tidal volume strategy (approximately 3 ml/kg) combined with extracorporeal CO<sub>2</sub> removal versus 'conventional' protective ventilation (6 ml/kg) in severe ARDS: the prospective randomized Xtravent-study. *Intensive Care Med* 39: 847-856, 2013.
  
11. **Bell RC, Coalson JJ, Smith JD and Johanson WG, Jr.** Multiple organ system failure and infection in adult respiratory distress syndrome. *Ann Intern Med* 99: 293-298, 1983.
  
12. **Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A and Spragg R.** The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 149: 818-824, 1994.
  
13. **Bishai JM, Mitzner W, Tankersley CG and Wagner EM.** PEEP-induced changes in epithelial permeability in inbred mouse strains. *Respir Physiol Neurobiol* 156: 340-344, 2007.
  
14. **Bohr C.** Über die Lungenathmung. *Skand.Arch.Physiol.* 2, 236-268. 1891.
  
15. **Bricker MB, Morris WP, Allen SJ, Tonnesen AS and Butler BD.** Venous air embolism in patients with pulmonary barotrauma. *Crit Care Med* 22: 1692-1698, 1994.
  
16. **Brueckl C, Kaestle S, Kerem A, Habazettl H, Krombach F, Kuppe H and Kuebler WM.** Hyperoxia-induced reactive oxygen species formation in pulmonary capillary endothelial cells in situ. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34: 453-463, 2006.
  
17. **Brunkhorst FM, Engel C, Ragaller M, Welte T, Rossaint R, Gerlach H, Mayer K, John S, Stuber F, Weiler N, Oppert M, Moerer O, Bogatsch H, Reinhart K, Loeffler M and Hartog C.** Practice and perception--a nationwide survey of therapy habits in sepsis. *Crit Care Med* 36: 2719-2725, 2008.
  
18. **Cabrera-Benitez NE, Parotto M, Post M, Han B, Spieth PM, Cheng WE, Valladares F, Villar J, Liu M, Sato M, Zhang H and Slutsky AS.** Mechanical stress induces lung fibrosis by epithelial-mesenchymal transition. *Crit Care Med* 40: 510-517, 2012.
  
19. **Caironi P, Carlesso E and Gattinoni L.** Radiological imaging in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Semin Respir Crit Care Med* 27: 404-415, 2006.

20. **Canning BJ.** Anatomy and neurophysiology of the cough reflex: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 129: 33S-47S, 2006.
21. **Carvalho AR, Spieth PM, Guldner A, Cuevas M, Carvalho NC, Beda A, Spieth S, Stroczyński C, Wiedemann B, Koch T, Pelosi P and de Abreu MG.** Distribution of regional lung aeration and perfusion during conventional and noisy pressure support ventilation in experimental lung injury. *J Appl Physiol (1985)* 110: 1083-1092, 2011.
22. **Chacko J and Rani U.** Alveolar recruitment maneuvers in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Indian J Crit Care Med* 13: 1-6, 2009.
23. **Copland IB, Kavanagh BP, Engelberts D, McKerlie C, Belik J and Post M.** Early changes in lung gene expression due to high tidal volume. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 1051-1059, 2003.
24. **Courtney SE, Durand DJ, Asselin JM, Hudak ML, Aschner JL and Shoemaker CT.** High-frequency oscillatory ventilation versus conventional mechanical ventilation for very-low-birth-weight infants. *N Engl J Med* 347: 643-652, 2002.
25. **Derdak S, Mehta S, Stewart TE, Smith T, Rogers M, Buchman TG, Carlin B, Lawson S and Granton J.** High-frequency oscillatory ventilation for acute respiratory distress syndrome in adults: a randomized, controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 166: 801-808, 2002.
26. **Dos Santos CC.** Advances in mechanisms of repair and remodelling in acute lung injury. *Intensive Care Med* 34: 619-630, 2008.
27. **Dreyfuss D and Saumon G.** Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 294-323, 1998.
28. **Fowler WS.** Lung function studies; the respiratory dead space. *Am J Physiol* 154: 405-416, 1948.
29. **Frank JA and Matthay MA.** Science review: mechanisms of ventilator-induced injury. *Crit Care* 7: 233-241, 2003.
30. **Gao L and Barnes KC.** Recent advances in genetic predisposition to clinical acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296: L713-L725, 2009.

31. **Gehr P, Bachofen M and Weibel ER.** The normal human lung: ultrastructure and morphometric estimation of diffusion capacity. *Respir Physiol* 32: 121-140, 1978.
32. **Gharib SA, Nguyen E, Altemeier WA, Shaffer SA, Doneanu CE, Goodlett DR and Schnapp LM.** Of mice and men: comparative proteomics of bronchoalveolar fluid. *Eur Respir J* 35: 1388-1395, 2010.
33. **Guertler H, Ketz H-A, Kolb E, Schröder L and Seidel H.** *Lehrbuch der Physiologie der Haustiere*. Teil II, Jena: VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 481-501, 1980.
34. **Gupta R, Grasruck M, Suess C, Bartling SH, Schmidt B, Stierstorfer K, Popescu S, Brady T and Flohr T.** Ultra-high resolution flat-panel volume CT: fundamental principles, design architecture, and system characterization. *Eur Radiol* 16: 1191-1205, 2006.
35. **Guttman J.** Analysis of respiratory mechanics during artificial ventilation. *Biomed Tech (Berl)* 43: 107-115, 1998.
36. **Guttman J.** Grundlagen der Lungenmechanik unter Beatmung. *Intensivmedizin und Notfallmedizin* 36(1 Suppl), I/1-I/8. 1999. Steinkopff Verlag.
37. **Habicht GS.** Body temperature in normal and endotoxin-treated mice of different ages. *Mech Ageing Dev* 16: 97-104, 1981.
38. **Hauber HP, Karp D, Goldmann T, Vollmer E and Zabel P.** Effect of low tidal volume ventilation on lung function and inflammation in mice. *BMC Pulm Med* 10: 21, 2010.
39. **Hedenstierna G.** The anatomical and alveolar deadspaces during respirator treatment. Influence of respiratory frequency, minute volume and tracheal pressure. *Br J Anaesth* 47: 993-999, 1975.
40. **Hedenstierna G and Lundberg S.** Airway compliance during artificial ventilation. *Br J Anaesth* 47: 1277-1281, 1975.
41. **Held HD, Boettcher S, Hamann L and Uhlig S.** Ventilation-induced chemokine and cytokine release is associated with activation of nuclear factor-kappaB and is blocked by steroids. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 711-716, 2001.



42. **Hudson LD, Milberg JA, Anardi D and Maunder** of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 151: 293-301, 1995.
43. **Hyatt RE and Flath RE**. Influence of lung parenchyma on pressure-diameter behavior of dog bronchi. *J Appl Physiol* 21: 1448-1452, 1966.
44. **Hyde DM, Hamid Q and Irvin CG**. Anatomy, pathology, and physiology of the tracheobronchial tree: emphasis on the distal airways. *J Allergy Clin Immunol* 124: S72-S77, 2009.
45. **Irvin CG and Bates JH**. Measuring the lung function in the mouse: the challenge of size. *Respir Res* 4: 4, 2003.
46. **Jackson RM**. Pulmonary oxygen toxicity. *Chest* 88: 900-905, 1985.
47. **Kaplan HM, Brewer NR and Blair WH**. *The mouse in biomedical research*. New York, London: Academic Press, 252-256, 1983.
48. **Klein N, Gembardt F, Supe S, Kaestle SM, Nickles H, Erfinanda L, Lei X, Yin J, Wang L, Mertens M, Szaszi K, Walther T and Kuebler WM**. Angiotensin-(1-7) protects from experimental acute lung injury. *Crit Care Med* 41: e334-e343, 2013.
49. **Klinke R and Silbernagel S**. *Lehrbuch der Physiologie*. Stuttgart; New York: Georg Thieme Verlag, 217-272, 2001.
50. **Krahl VE**. *Handbook of Physiology*. Washington D.C.: 1964.
51. **Krebs J, Pelosi P, Tsagogiorgas C, Alb M and Luecke T**. Effects of positive end-expiratory pressure on respiratory function and hemodynamics in patients with acute respiratory failure with and without intra-abdominal hypertension: a pilot study. *Crit Care* 13: R160, 2009.
52. **Kuebler WM, Abels C, Schuerer L and Goetz AE**. Measurement of neutrophil content in brain and lung tissue by a modified myeloperoxidase assay. *Int J Microcirc Clin Exp* 16: 89-97, 1996.
53. **Lauche A**. *Pathologie der Laboratoriumstiere*. Hrsg. Cohrs P, Jaffé R, Meessen H, Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer Verlag, 28-39, 1958.

54. **Lim LH and Wagner EM.** Airway distension promotes leukocyte recruitment in rat tracheal circulation. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 1068-1074, 2003.
55. **Lowe K, Alvarez DF, King JA and Stevens T.** Perivascular fluid cuffs decrease lung compliance by increasing tissue resistance. *Crit Care Med* 38: 1458-1466, 2010.
56. **Matt U, Warszawska JM, Bauer M, Dietl W, Mesteri I, Doninger B, Haslinger I, Schabbauer G, Perkmann T, Binder CJ, Reingruber S, Petzelbauer P and Knapp S.** Bbeta(15-42) protects against acid-induced acute lung injury and secondary pseudomonas pneumonia in vivo. *Am J Respir Crit Care Med* 180: 1208-1217, 2009.
57. **Matthay MA and Zimmerman GA.** Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33: 319-327, 2005.
58. **Matute-Bello G, Frevert CW and Martin TR.** Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295: L379-L399, 2008.
59. **Mead J, Takishima T and Leith D.** Stress distribution in lungs: a model of pulmonary elasticity. *J Appl Physiol* 28: 596-608, 1970.
60. **Meduri GU, Annane D, Chrousos GP, Marik PE and Sinclair SE.** Activation and regulation of systemic inflammation in ARDS: rationale for prolonged glucocorticoid therapy. *Chest* 136: 1631-1643, 2009.
61. **Meier T, Lange A, Papenberg H, Ziemann M, Fentrop C, Uhlig U, Schmucker P, Uhlig S and Stamme C.** Pulmonary cytokine responses during mechanical ventilation of noninjured lungs with and without end-expiratory pressure. *Anesth Analg* 107: 1265-1275, 2008.
62. **Menendez C, Martinez-Caro L, Moreno L, Nin N, Moral-Sanz J, Morales D, Cogolludo A, Esteban A, Lorente JA and Perez-Vizcaino F.** Pulmonary vascular dysfunction induced by high tidal volume mechanical ventilation. *Crit Care Med* 41: e149-e155, 2013.
63. **Mertens M, Tabuchi A, Meissner S, Krueger A, Schirrmann K, Kertzscher U, Pries AR, Slutsky AS, Koch E and Kuebler WM.** Alveolar dynamics in acute lung injury: heterogeneous distension rather than cyclic opening and collapse. *Crit Care Med* 37: 2604-2611, 2009.

64. **Mittal N and Sanyal SN.** Exogenous surfactant suppresses inflammation in experimental endotoxin-induced lung injury. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 28: 341-349, 2009.
65. **Monahan LJ.** Acute respiratory distress syndrome. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 43: 278-284, 2013.
66. **Moniz M, Silvestre C, Nunes P, Abadesso C, Matias E, Loureiro H and Almeida H.** High-frequency oscillatory ventilation in children: a 10-year experience. *J Pediatr (Rio J)* 89: 48-55, 2013.
67. **Montgomery AB, Stager MA, Carrico CJ and Hudson LD.** Causes of mortality in patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 132: 485-489, 1985.
68. **Moore RL.** A study of the Hering-Breuer reflex. *J Exp Med* 46: 819-837, 1927.
69. **Newth CJ, Enright P and Johnson RL.** Multiple-breath nitrogen washout techniques: including measurements with patients on ventilators. *Eur Respir J* 10: 2174-2185, 1997.
70. **Nickles HT and Kuebler WM.** Take my breath away: perivascular fluid cuffs impair lung mechanics. *Crit Care Med* 38: 1494-1496, 2010.
71. **O'Neil JJ and Raub JA.** Pulmonary function testing in small laboratory mammals. *Environ Health Perspect* 56: 11-22, 1984.
72. **Pabst R.** Are Animal Models of Asthma Useful? In: *Allergy and Allergic Diseases*, edited by Kay AB, Kaplan AP, Bousquet J and Holt PG. Oxford: Blackwell Publishing, 2008, p. 1214-1222.
73. **Papadakos PJ and Lachmann B.** The open lung concept of mechanical ventilation: the role of recruitment and stabilization. *Crit Care Clin* 23: 241-24x, 2007.
74. **Pearsall MF and Feldman JM.** When does apparatus dead space matter for the pediatric patient? *Anesth Analg* 118: 776-780, 2014.
75. **Putensen C and Muders T.** Should we breathe quiet or noisy? *Crit Care* 18: 116, 2014.

76. **Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, Camporota L and Slutsky AS.** Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA* 307: 2526-2533, 2012.
77. **Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, Stern EJ and Hudson LD.** Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med* 353: 1685-1693, 2005.
78. **Saisch SG.** An introduction to capnography. *Biofeedback Self Regul* 19: 115-134, 1994.
79. **Schiller HJ, Steinberg J, Halter J, McCann U, DaSilva M, Gatto LA, Carney D and Nieman G.** Alveolar inflation during generation of a quasi-static pressure/volume curve in the acutely injured lung. *Crit Care Med* 31: 1126-1133, 2003.
80. **Schiller O, Schonfeld T, Yaniv I, Stein J, Kadmon G and Nahum E.** Bi-level positive airway pressure ventilation in pediatric oncology patients with acute respiratory failure. *J Intensive Care Med* 24: 383-388, 2009.
81. **Schulz H, Johner C, Eder G, Ziesenis A, Reitmeier P, Heyder J and Balling R.** Respiratory mechanics in mice: strain and sex specific differences. *Acta Physiol Scand* 174: 367-375, 2002.
82. **Severinghaus JW, Stupfel MA and Bradley AF.** Alveolar dead space and arterial to end-tidal carbon dioxide differences during hypothermia in dog and man. *J Appl Physiol* 10: 349-355, 1957.
83. **Sinclair SE, Molthen RC, Haworth ST, Dawson CA and Waters CM.** Airway strain during mechanical ventilation in an intact animal model. *Am J Respir Crit Care Med* 176: 786-794, 2007.
84. **Slutsky AS.** Lung injury caused by mechanical ventilation. *Chest* 116: 9S-15S, 1999.
85. **Slutsky AS and Drazen JM.** Ventilation with small tidal volumes. *N Engl J Med* 347: 630-631, 2002.
86. **Spieth PM, Carvalho AR, Guldner A, Kasper M, Schubert R, Carvalho NC, Beda A, Dassow C, Uhlig S, Koch T, Pelosi P and Gama de AM.** Pressure support improves oxygenation and lung protection compared to pressure-controlled ventilation and is

- further improved by random variation of pressure support. *Crit Care Med* 39: 746-755, 2011.
87. **Starling EH**. An improved method of artificial respiration. *J Physiol Suppl* xiii-xv 1926.
88. **Tabuchi A, Mertens M, Kuppe H, Pries AR and Kuebler WM**. Intravital microscopy of the murine pulmonary microcirculation. *J Appl Physiol (1985)* 104: 338-346, 2008.
89. **Tankersley CG, Fitzgerald RS and Kleeberger SR**. Differential control of ventilation among inbred strains of mice. *Am J Physiol* 267: R1371-R1377, 1994.
90. **Tankersley CG, Fitzgerald RS, Levitt RC, Mitzner WA, Ewart SL and Kleeberger SR**. Genetic control of differential baseline breathing pattern. *J Appl Physiol* 82: 874-881, 1997.
91. **Tenney SM and Remmers JE**. Comparative quantitative morphology of the mammalian lung: diffusing area. *Nature* 197: 54-56, 1963.
92. **Ting EY, Hong SK and Rahn H**. Lung volumes, lung compliance and airway resistance during negative-pressure breathing. *J Appl Physiol* 15: 554-556, 1960.
93. **Tobin MJ, Chadha TS, Jenouri G, Birch SJ, Gazeroglu HB and Sackner MA**. Breathing patterns. 1. Normal subjects. *Chest* 84: 202-205, 1983.
94. **Tomashefski JF, Jr**. Pulmonary pathology of the adult respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* 11: 593-619, 1990.
95. **Tremblay L, Valenza F, Ribeiro SP, Li J and Slutsky AS**. Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model. *J Clin Invest* 99: 944-952, 1997.
96. **Tschumperlin DJ and Margulies SS**. Alveolar epithelial surface area-volume relationship in isolated rat lungs. *J Appl Physiol* 86: 2026-2033, 1999.
97. **Tusman G, Sipmann FS, Borges JB, Hedenstierna G and Bohm SH**. Validation of Bohr dead space measured by volumetric capnography. *Intensive Care Med* 37: 870-874, 2011.

98. **Uhlig S.** Ventilation-induced lung injury and mechanotransduction: stretching it too far? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L892-L896, 2002.
99. **Vaneker M, Joosten LA, Heunks LM, Snijdelaar DG, Halbertsma FJ, van EJ, Netea MG, van der Hoeven JG and Scheffer GJ.** Low-tidal-volume mechanical ventilation induces a toll-like receptor 4-dependent inflammatory response in healthy mice. *Anesthesiology* 109: 465-472, 2008.
100. **Verloop MC.** On the arteriae bronchiales and their anastomosing with the arteria pulmonalis in some rodents; a micro-anatomical study. *Acta Anat (Basel)* 7: 1-32, 1949.
101. **Vinegar A, Sinnett EE and Leith DE.** Dynamic mechanisms determine functional residual capacity in mice, *Mus musculus*. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 46: 867-871, 1979.
102. **von Bethmann AN, Brasch F, Nusing R, Vogt K, Volk HD, Muller KM, Wendel A and Uhlig S.** Hyperventilation induces release of cytokines from perfused mouse lung. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 263-272, 1998.
103. **von Dossow-Hanfstingl V.** Advances in therapy for acute lung injury. *Anesthesiol Clin* 30: 629-639, 2012.
104. **Wagner EM and Jenkins J.** Effects of airway distension on leukocyte recruitment in the mouse tracheal microvasculature. *J Appl Physiol* 102: 1528-1534, 2007.
105. **Wang L, Yin J, Nickles HT, Ranke H, Tabuchi A, Hoffmann J, Tabeling C, Barbosa-Sicard E, Chanson M, Kwak BR, Shin HS, Wu S, Isakson BE, Witzernath M, de WC, Fleming I, Kuppe H and Kuebler WM.** Hypoxic pulmonary vasoconstriction requires connexin 40-mediated endothelial signal conduction. *J Clin Invest* 122: 4218-4230, 2012.
106. **Wang X, Heimann T, Lo P, Sumkauskaitė M, Puderbach M, de BM, Meinzer HP and Wegner I.** Statistical tracking of tree-like tubular structures with efficient branching detection in 3D medical image data. *Phys Med Biol* 57: 5325-5342, 2012.
107. **Weibel ER.** *Morphometry of the Human Lung*. Berlin, New York: Springer Verlag and Academic Press, Heidelberg-New York, 133-142, 1963.

108. **Weibel ER and Bachofen H.** How to Stabilize the Pulmonary Alveoli: Surfactant or Fibers? *NIPS* 2, 72-75. 1-4-1987.
109. **Weinert CR, Gross CR and Marinelli WA.** Impact of randomized trial results on acute lung injury ventilator therapy in teaching hospitals. *Am J Respir Crit Care Med* 167: 1304-1309, 2003.
110. **Wilson MR, Patel BV and Takata M.** Ventilation with "clinically relevant" high tidal volumes does not promote stretch-induced injury in the lungs of healthy mice. *Crit Care Med* 40: 2850-2857, 2012.
111. **Wolf I, Vetter M, Wegner I, Bottger T, Nolden M, Schobinger M, Hastenteufel M, Kunert T and Meinzer HP.** The medical imaging interaction toolkit. *Med Image Anal* 9: 594-604, 2005.
112. **Wolthuis EK, Choi G, Dessing MC, Bresser P, Lutter R, Dzoljic M, van der PT, Vroom MB, Hollmann M and Schultz MJ.** Mechanical ventilation with lower tidal volumes and positive end-expiratory pressure prevents pulmonary inflammation in patients without preexisting lung injury. *Anesthesiology* 108: 46-54, 2008.

## 9. Anhang

### 9.1. Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Arteria</i> , Arterie
ALI	<i>acute lung injury</i> , akuter Lungenschaden
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i> , akutes progressives Lungenversagen
BiPAP	<i>biphasic positive airway pressure</i> , zweiphasiger positiver Atemwegsdruck
bpm	<i>breaths per minute</i> , Atmungsfrequenz
bw	<i>body weight</i> , Körpergewicht
C <sub>0AW</sub>	Compliance der oberen Atemwege (ml/mmHg)
C <sub>L</sub>	Compliance der Lunge (ml/mmHg)
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i> , chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CT	Computertomographie
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg
E <sub>CO<sub>2</sub></sub>	CO <sub>2</sub> -Anteil im Exhalat (%)
EIP	endinspiratorischer Druck (cmH <sub>2</sub> O)
FEM	Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin der Charité Berlin
FiO <sub>2</sub>	Fraktion des inspirierten Sauerstoffes
HFOV	<i>high frequency oscillation ventilation</i> , Hochfrequenzbeatmung
HU	<i>Hounsfield units</i> , Hounsfield Einheit
IAM	<i>Isolated Airway Module</i> , Modul für isolierte Atemwege
Il-1 $\beta$	Interleukin-1beta, Zytokin
i.p.	intraperitoneal
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LAGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales (zuständige Behörde für Tierversuche in Berlin)
MIP-2	<i>Macrophage Inflammatory Protein 2</i> , Zytokin
MITK	Medical Imaging Interaction Toolkit
Mm.	<i>Musculi</i> , Muskel (Pl.)
N.	<i>Nervus</i> , Nerv



P	<i>probability</i> , Signifikanzwert
P <sub>0</sub>	Atemwegsdruck unter Spontanatmung (0 mmHg)
PaCO <sub>2</sub>	arterieller Partialdruck von CO <sub>2</sub> (mmHg)
P <sub>AW</sub>	Druck der Atemwege (mmHg)
P <sub>X</sub>	Atemwegsdruck (mmHg) in Abhängigkeit zum angelegten Tidalvolumen
P <sub>H<sub>2</sub>O</sub>	Partialdruck des Wassers (mmHg)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphat-gepufferte Salzlösung
P <sub>E</sub> CO <sub>2</sub>	Partialdruck von CO <sub>2</sub> im Exhalat (mmHg)
PEEP	positiver endexpiratorischer Druck (cmH <sub>2</sub> O)
PIP	positiver inspiratorischer Druck (cmH <sub>2</sub> O)
r	Korrelationskoeffizient der Pearson-Korrelation
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha, Zytokin
vCT	Volumen-Computertomographie, Volumen-Computertomograph mit Flächendetektoren
V.	<i>Vena</i> , Vene
VALI	<i>ventilator associated lung injury</i> , beatmungsassoziierter Lungenschaden
V <sub>T</sub>	Tidalvolumen, Atemzugvolumen (ml)
V <sub>D</sub>	<i>Volume of dead space</i> , Totraum (ml)

## 9.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bronchioläres Verzweigungsmuster von Mensch und Maus im Vergleich.....	10
Abbildung 2: Kontinuierliche Beatmung während der Bildgebung im vCT .....	38
Abbildung 3: Intermittierende Beatmung während der Bildgebung im vCT.....	39
Abbildung 4: Exemplarische Darstellung der oberen Atemwege im vCT.....	43
Abbildung 5: Segmentierter und dreidimensional rekonstruierter Bronchialbaum einer Maus ...	44
Abbildung 6: Quantitative Dehnung der oberen Atemwege unter kontinuierlicher Beatmung.....	46
Abbildung 7: Quantitative Dehnung der oberen Atemwege unter intermittierender Beatmung ...	47
Abbildung 8: Lokalisation der Aufdehnung der oberen Atemwege im Bronchialbaum .....	48
Abbildung 9: Die Röntgendichte des Lungenparenchyms im vCT .....	49
Abbildung 10: Intravitalmikroskopische Aufnahmen der subpleuralen Alveolen.....	50
Abbildung 11: Quantitative Analyse der alveolären Querschnittsfläche .....	51
Abbildung 12: Funktioneller Totraum (Kapnographie) .....	52
Abbildung 13: Mittlerer Atemwegsdruck .....	53
Abbildung 14: Compliance der oberen Atemwege und des funktionellen Totraums .....	54
Abbildung 15: Hämatoxylin-Eosin gefärbte Lungenschnitte.....	55
Abbildung 16: Planimetrische Analyse der perivaskulären Blutung .....	56
Abbildung 17: Mikroskopische Aufnahmen der isolierten Trachea im Organbad .....	58
Abbildung 18: Durchmesser von isolierten Tracheen im Organbad.....	58
Abbildung 19: Compliance der Trachea nach vorheriger Beatmung.....	60
Abbildung 20: Analyse der Zytokine TNF- $\alpha$ (A), IL-1 $\beta$ (B) und MIP-2 (C) .....	61
Abbildung 21: Murine Trachea und porciner Segmentbronchus im histologischen Querschnitt ..	62
Abbildung 22: Compliance muriner Tracheen und porciner Segmentbronchien im Organbad ...	63

### 9.3. Publikationsverzeichnis

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab in folgenden Arbeiten veröffentlicht:

#### **Originalarbeiten (peer-reviewed)**

**Nickles HT**, Sumkauskaitė M, Wang X, Wegner I, Puderbach M and Kuebler WM. Mechanical ventilation causes airway distension with proinflammatory sequelae in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 307: L27-L37, 2014.

Klein N, Gembardt F, Supé S, Kaestle SM, **Nickles H**, Erfinanda L, Lei X, Yin J, Wang L, Mertens M, Szaszi K, Walther T and Kuebler WM. Angiotensin-(1-7) protects from experimental acute lung injury. *Crit Care Med* 41: e334-e343, 2013.

Wang L, Yin J, **Nickles HT**, Ranke H, Tabuchi A, Hoffmann J, Tabeling C, Barbosa-Sicard E, Chanson M, Kwak BR, Shin HS, Wu S, Isakson BE, Witzernath M, de WC, Fleming I, Kuppe H and Kuebler WM. Hypoxic pulmonary vasoconstriction requires connexin 40-mediated endothelial signal conduction. *J Clin Invest* 122: 4218-4230, 2012.

**Nickles HT** and Kuebler WM. Take my breath away: perivascular fluid cuffs impair lung mechanics. *Crit Care Med* 38: 1494-1496, 2010.

#### **Poster und Vorträge**

09/2012 Proinflammatory distension of the upper airways may contribute to ventilator-induced lung injury; Vortrag bei der internationalen Konferenz der European Respiratory Society (ERS), Wien, Österreich

05/2012 Mechanical ventilation causes profound upper airway distension in mice; Thematic poster session bei der internationalen Konferenz der American Thoracic Society (ATS), San Francisco, CA, USA  
**International Trainee Travel Award (ITTA)** der American Thoracic Society (ATS)

03/2012 Quantitative analysis of dead space in ventilated rats and mice; Vortrag beim Abschlusstreffen des DFG-Programms "Protective Artificial Respiration", München

01/2012 Proinflammatory distension of the upper respiratory tract as a new mechanism of ventilator-induced lung injury in mice; Vortrag bei der 20. Tagung der Fachgruppe für Biochemie und Physiologie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, München

- 07/2011 Mechanical ventilation causes profound upper airway distension in mice; Vortrag beim 6. Symposium für Doktoranden der Tiermedizin, Berlin
- 12/2010 Quantitative analysis of dead space ventilation in animal models; Vortrag beim Jahreskongress des Forschungsprogramms "Protective Artificial Ventilation" der DFG, Dresden
- 07/2010 Quantitative analysis of dead space ventilation in animal models; Vortrag beim Arbeitstreffen des Forschungsprogramms "Protective Artificial Ventilation" der DFG, Frankfurt (Main)
- 11/2009 Quantitative analysis of dead space ventilation in animal models with acute lung injury; Vortrag beim 2ten Aachener Symposium für natürliche und künstliche Beatmung, Aachen

## **Danksagung**

Zur erfolgreichen Fertigstellung dieser Promotion trugen viele Personen auf unterschiedlichste Weise bei. An dieser Stelle möchte ich mich bei allen sehr herzlich bedanken. Im Besonderen gilt mein Dank:

Frau Prof. Dr. Dr. Petra Reinhold, Arbeitsgruppenleiterin am Institut für molekulare Pathogenese am Friedrich-Loeffler-Institut in Jena und Lehrbeauftragte am Institut für Veterinär-Physiologie der Freien Universität Berlin, zunächst für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit über das Institut für Veterinär-Physiologie der FU Berlin einzureichen, vor allem aber für die stets hilfreiche und weit über das übliche Maß hinausgehende Betreuung dieses Promotionsvorhabens. Vielen Dank für so manchen Schubs.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kübler, Arbeitsgruppenleiter für Lungen- und Kreislaufphysiologie am Institut für Physiologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, für die umfassende Unterstützung in allen Bereichen der Doktorarbeit und des wissenschaftlichen Arbeitens. Die Gelegenheit, Neues auszuprobieren, zu diskutieren, zu präsentieren, dafür zu reisen und zu organisieren, Dinge zu hinterfragen, wieder zu verwerfen, weiterzumachen und schließlich Projekte mit Erfolg zu Ende zu bringen, war eine abenteuerliche und bisweilen herausfordernde Lektion. Vielen Dank für alles.

Herrn Prof. Dr. Axel Pries, Leiter des Instituts für Physiologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, für die Möglichkeit, meine veterinärmedizinische Dissertation am Institut für Physiologie durchzuführen und die Chance, hier einen Raum des wissenschaftlichen Arbeitens in allen Bereichen der Universität, Forschung, Lehre und nicht zuletzt Labororganisation, kennenzulernen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die finanzielle Unterstützung dieses Projekts im Rahmen des nationalen Forschungsschwerpunktes „Protektive Beatmungskonzepte“.

Herrn PD Dr. Michael Puderbach und Mingle Sumkauskaitė aus der Abteilung für Radiologie des Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg (DKFZ) für die Kooperation hinsichtlich der Untersuchungen im vCT und die umfassende Unterstützung bei der Auswertung der Ergebnisse. Ebenso Dr. Ingmar Wegner und Xin Wang aus der Abteilung für Medizinische und Biologische Informatik am DKFZ in Heidelberg für die computergestützte Segmentierung der murinen

Atemwege, die die Auswertung der Bilder erst möglich machten. Vielen Dank für die vielen Stunden an den Rechnern und die guten Diskussionen bei so mancher Konferenz.

Herrn Dr. med. vet. Wolfram Haider, Institut für Tierpathologie in Berlin, für die Anfertigung der histologischen Schnitte der Mäuselungen und Schweinebronchien.

Herrn Dr. med. Arata Tabuchi, einem großartigen Forscher aus dem Labor der AG Kübler in Toronto, für die geduldige und umfassende Unterweisung in seiner Methode des Lungenfensters und der Intravitalmikroskopie.

Herrn Norbert Brandes vom Institut für Fleischhygiene und -technologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der FU Berlin für die Bereitstellung der Schweinelungen.

Herrn Prof. Dr. Helmut Habazettl, Institut für Physiologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, für die perfekte Büro-WG und so manche unkomplizierte Hilfeleistung auf Zuruf.

Den Tierpflegerinnen und Tierpflegern und den Tierschutzbeauftragten der FEM für die stets zuverlässige und tadellose Betreuung der Versuchstiere und die umfassende Beratung in allen Fragen um die Tierversuche. Ebenso Herrn Dr. Stefan Nagel, Leiter der FEM, für die großzügige Freistellung zum Schreib-Urlaub.

Meinen Kollegen, die über die Jahre auch oft zu Freunden wurden und mir bei allen Fragen und Problemen, in den schwierigen wie in den erfolgreichen Phasen zur Seite standen und in den entscheidenden Momenten so manches Mal den richtigen Tipp hatten. Danke an Julia Hoffmann, Michael Mertens, Björn Hoffmann, Rudi Samapati, Bianca Nitzsche, Laura Michalick und Lasti Erfinanda.

Mein großer Dank gilt nicht zuletzt meinen Freunden und meiner Familie. Ohne euch wär's nicht gegangen. Durststrecken und Erfolge – ihr seid immer dabei gewesen. Vielen Dank.

**Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 27.01.2015

Hannah Theresa Nickles