

**Aus der Anästhesiologischen Universitätsklinik
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br.**

**Die protektive Wirkung Schwefelwasserstoffs
bei oxidativer und inflammatorischer
Lungenschädigung**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des Medizinischen Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät

der Albert-Ludwigs-Universität

Freiburg i.Br.

Vorgelegt 2012

von Kornelia Katharina Zimmermann

geboren in Freiburg i.Br.

Dekan	Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Hubert E. Blum
1. Gutachter	Prof. Dr. med. Alexander Hötzel
2. Gutachter	Priv.-Doz. Dr. med. Uwe Wittel
Jahr der Promotion	2013

Für meine Großmütter.

Die protektive Wirkung Schwefelwasserstoffs bei oxidativer und inflammatorischer Lungenschädigung

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	9
Abkürzungsverzeichnis.....	11
1 ZUSAMMENFASSUNG.....	13
2 EINLEITUNG.....	14
2.1 Der akute Lungenschaden	14
2.1.1 Der oxidative Lungenschaden	15
2.1.2 Der inflammatorische Lungenschaden.....	16
2.2 Schwefelwasserstoff.....	17
2.2.1 Die Wirkung von H ₂ S auf oxidative Prozesse	19
2.2.2 Die Wirkung von H ₂ S auf das Entzündungsgeschehen	19
2.3 Fragestellung.....	20
3 MATERIAL UND METHODEN.....	21
3.1 Materialien	21
3.1.1 Geräte.....	21
3.1.2 Software.....	21
3.1.3 Gase	21
3.1.4 Chemikalien, Reagenzien, Medikamente.....	22
3.1.5 Puffer, Lösungen und Gele	22
3.1.6 Kits und Assays	24
3.2 In vivo Tierversuche.....	25
3.2.1 Tiere.....	25
3.2.2 Modell 1: Hyperoxischer Lungenschaden	25
3.2.2.1 Hyperoxie-Exposition	25
3.2.2.2 NaHS-Applikation	26
3.2.3 Modell 1: Versuchsetablierung und -gruppen	26
3.2.3.1 Der Effekt von NaHS auf die Proteinkonzentration, Zell- und Neutrophilenanzahl in der BAL nach 72 Std Hyperoxie	26

3.2.3.2	<i>Der Effekt von Hyperoxie auf die Proteinkonzentration, Zell- und Neutrophilenanzahl in der BAL im zeitlichen Verlauf.....</i>	27
3.2.3.3	<i>Der Effekt unterschiedlicher Konzentrationen an NaHS auf die Proteinkonzentration, Zell- und Neutrophilenanzahl in der BAL nach 60 Std Hyperoxie.....</i>	27
3.2.3.4	<i>Der Einfluss einer NaHS-Applikation auf den hyperoxischen Lungenschaden.....</i>	28
3.2.4	Modell 2: Lipopolysaccharid (LPS)-induzierter Lungenschaden	28
3.2.4.1	<i>H₂S-Exposition</i>	28
3.2.4.2	<i>LPS-Applikation.....</i>	29
3.2.5	Modell 2: Versuchsetablierung und -gruppen	29
3.2.5.1	<i>Pulmonale Entzündungszeichen nach intranasaler LPS-Applikation</i>	29
3.2.5.2	<i>Der Einfluss von H₂S auf den LPS-induzierten Lungenschaden</i>	29
3.3	Versuchsende und Probenentnahme	30
3.4	Auswertung von BAL, Lungengewebe und Histologie	30
3.4.1	Aufbereitung BAL.....	31
3.4.1.1	<i>Bestimmung der Gesamtzellzahl.....</i>	31
3.4.1.2	<i>Bestimmung des Anteils an neutrophilen Zellen</i>	31
3.4.1.3	<i>Proteinbestimmung nach Bradford.....</i>	32
3.4.1.4	<i>ELISA.....</i>	32
3.4.2	Western Blot	32
3.4.2.1	<i>Aufarbeitung des Gewebes.....</i>	33
3.4.2.2	<i>Polyacrylamid-Gele und Gelelektrophorese</i>	33
3.4.2.3	<i>Proteintransfer.....</i>	33
3.4.2.4	<i>Immundetektion der jeweiligen Proteine</i>	33
3.4.2.5	<i>Normalisierung, Wiederverwendung der Membranen, Stripping</i>	35
3.4.2.6	<i>Densitometrische Auswertung.....</i>	35
3.4.3	ROS-Nachweis	35
3.4.4	Histologie der Lunge	36
3.5	Statistische Auswertung	37
4	ERGEBNISSE	39
MODELL 1:	HYPEROXISCHER LUNGENSCHADEN	39

4.1 Etablierung eines in vivo Modells zur Behandlung des oxidativen Lungenschadens mit H₂S	39
4.1.1 Der Effekt von NaHS auf die Proteinkonzentration, Zell- und Neutrophilenanzahl in der BAL nach 72 Std Hyperoxie	39
4.1.2 Der Effekt von Hyperoxie auf die Proteinkonzentration, Zell- und Neutrophilenanzahl in der BAL im zeitlichen Verlauf	41
4.1.3 Der Effekt unterschiedlicher Konzentrationen an NaHS auf die Proteinkonzentration, Zell- und Neutrophilenanzahl in der BAL nach 60 Std Hyperoxie	42
4.2 In vivo Modell: Pulmonale Effekte von H₂S bei Hyperoxie	43
4.2.1 Der Einfluss einer NaHS-Applikation auf den hyperoxischen Lungenschaden	43
4.2.1.1 <i>Der Effekt von H₂S und Hyperoxie auf die Proteinkonzentration, Gesamtzellzahl und neutrophile Zellen in der BAL.....</i>	43
4.2.1.2 <i>Der Effekt von Hyperoxie und NaHS-Applikation auf die Lungenstruktur</i>	44
4.2.1.3 <i>Die Quantifizierung des Effekts von Hyperoxie und NaHS-Applikation auf die Lungenstruktur</i>	45
4.2.2 Untersuchung der Signaltransduktionswege.....	47
4.2.2.1 <i>Der Einfluss der Hyperoxie und NaHS-Applikation auf die endogene H₂S-Regulation</i>	47
4.2.2.2 <i>Der Einfluss der Hyperoxie und NaHS-Applikation auf die Hitzeschockproteine</i>	48
4.2.2.3 <i>Der Einfluss der Hyperoxie und NaHS-Applikation auf die mitogenaktivierten Protein (MAP)-Kinasen</i>	49
4.2.2.4 <i>Der Einfluss der Hyperoxie und NaHS-Applikation auf die Mangansuperoxiddismutase (SOD2)</i>	51
4.2.2.5 <i>Der Einfluss der Hyperoxie und NaHS-Applikation auf Angiopoietin-2 (Ang2)</i>	52
4.2.2.6 <i>Der Einfluss der Hyperoxie und NaHS-Applikation auf die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS).....</i>	53
MODELL 2: LIPOPOLYSACCHARID-INDUZIERTER LUNGENSCHADEN	55
4.3 Etablierung eines in vivo Modells zur Behandlung des inflammatorischen Lungenschadens mit H₂S	55

4.3.1 Pulmonale Entzündungszeichen nach intranasaler LPS-Applikation	55
4.4 In vivo Modell: Pulmonale Effekte von H₂S auf den LPS-induzierten	
Lungenschaden.....	57
4.4.1 Der Einfluss von H ₂ S auf den LPS-induzierten Lungenschaden.....	57
4.4.1.1 <i>Der Effekt der LPS-Applikation und H₂S-Gabe auf die neutrophilen</i>	
<i>Zellen, die Proteinkonzentration und die Gesamtzellzahl in der BAL</i>	57
4.4.1.2 <i>Der Effekt der LPS-Applikation und H₂S-Gabe auf das Interleukin-1β</i>	
<i>(IL-1β) und das Macrophage Inflammatory Protein 2 (MIP-2) in der</i>	
<i>BAL</i>	59
4.4.1.3 <i>Der Effekt der LPS-Applikation und H₂S-Gabe auf die</i>	
<i>Lungenstruktur</i>	60
4.4.1.4 <i>Die Quantifizierung des Effekts der LPS-Applikation und H₂S-Gabe</i>	
<i>auf die Lungenstruktur</i>	61
4.4.2 Untersuchung der Signaltransduktionswege.....	62
4.4.2.1 <i>Der Einfluss der LPS-Applikation und H₂S-Gabe auf die endogene</i>	
<i>H₂S-Regulation</i>	62
4.4.2.2 <i>Der Einfluss der LPS-Applikation und H₂S-Gabe auf die</i>	
<i>Hitzeschockproteine</i>	63
4.4.2.3 <i>Der Einfluss der LPS-Applikation und H₂S-Gabe auf die</i>	
<i>mitogenaktivierten Protein (MAP)-Kinasen.....</i>	64
5 DISKUSSION	67
5.1 Lungenprotektion durch H ₂ S bei oxidativem Stress.....	67
5.2 Potenzielle Wirkmechanismen der Lungenprotektion durch H ₂ S bei	
oxidativem Stress.....	68
5.3 Lungenprotektion durch H ₂ S bei Inflammation	72
5.4 Potenzielle Wirkmechanismen der Lungenprotektion durch H ₂ S bei	
Inflammation	73
5.5 Einfluss der exogenen Zufuhr von H ₂ S auf die endogene H ₂ S-Synthese	75
5.6 Klinische Relevanz von H ₂ S	76
5.7 Schlussfolgerung	77
6 LITERATURVERZEICHNIS	79
7 DANKSAGUNG	87
8 CURRICULUM VITAE.....	89

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen:

Abb. 1: Auslöser und Pathomechanismen des akuten Lungenschadens	14
Abb. 2: Angriffspunkte und Wirkmechanismen von H ₂ S	18
Abb. 3: Zeitkinetik der Hyperoxie	27
Abb. 4: Versuchsaufbau des in vivo Modells zum hyperoxischen Lungenschaden	28
Abb. 5: Versuchsaufbau des in vivo Modells zum Einfluss von H ₂ S auf den LPS-induzierten Lungenschaden	30
Abb. 6: Schematische Darstellung der Analyse von Lungengewebe und BAL (Details s. Text)	31
Abb. 7: Schematischer Ablauf der Proteindetektion	32
Abb. 8: Der Effekt von NaHS auf die Proteinkonzentration, Zell- und Neutrophilenanzahl in der BAL nach 72 Std Hyperoxie	40
Abb. 9: Der Effekt von Hyperoxie auf die Proteinkonzentration, Zell- und Neutrophilenanzahl in der BAL im zeitlichen Verlauf.....	41
Abb. 10: Der Effekt unterschiedlicher Konzentrationen an NaHS auf die Proteinkonzentration, Zell- und Neutrophilenanzahl in der BAL nach 60 Std Hyperoxie	42
Abb. 11: Der Effekt von H ₂ S und Hyperoxie auf die Proteinkonzentration, Zell- und Neutrophilenanzahl in der BAL.....	43
Abb. 12: Der Effekt von Hyperoxie und NaHS-Applikation auf die Lungenstruktur...	44
Abb. 13: Die Quantifizierung des Effekts von Hyperoxie und NaHS-Applikation auf die Lungenstruktur	46
Abb. 14: Der Einfluss der Hyperoxie und NaHS-Applikation auf die Cystathionin-γ-Lyase (CTH) und Cystathionin-β-Synthetase (CBS)	47
Abb. 15: Der Einfluss der Hyperoxie und NaHS-Applikation auf die Hämoxygenase-1 (HO-1) und das Hitzeschockprotein 70 (Hsp70).....	48
Abb. 16: Der Einfluss der Hyperoxie und NaHS-Applikation auf die Phospho-p38 MAP-Kinase (pp38), die Phospho-ERK (pERK) und die Phospho-JNK (pJNK)	50
Abb. 17: Der Einfluss der Hyperoxie und NaHS-Applikation auf die Mangansuperoxiddismutase (SOD2)	51

Abb. 18: Der Einfluss der Hyperoxie und NaHS-Applikation auf Angiopoietin-2 (Ang2)	52
Abb. 19: Exemplarischer Nachweis von Superoxid-Anionen	53
Abb. 20: Quantitativer Nachweis von Superoxid-Anionen	54
Abb. 21: Pulmonale Entzündungszeichen nach intranasaler LPS-Applikation	56
Abb. 22: Der Effekt der LPS-Applikation und H ₂ S-Gabe auf die neutrophilen Zellen, die Proteinkonzentration und die Gesamtzellzahl in der BAL.....	58
Abb. 23: Der Effekt der LPS-Applikation und H ₂ S-Gabe auf das Interleukin-1 β (IL-1 β) und das Macrophage Inflammatory Protein 2 (MIP-2) in der BAL ..	59
Abb. 24: Der Effekt der LPS-Applikation und H ₂ S-Gabe auf die Lungenstruktur	60
Abb. 25: Die Quantifizierung des Effekts der LPS-Applikation und H ₂ S-Gabe auf die Lungenstruktur	61
Abb. 26: Der Einfluss der LPS-Applikation und H ₂ S-Gabe auf die Cystathionin- γ - Lyase (CTH) und Cystathionin- β -Synthetase (CBS)	62
Abb. 27: Der Einfluss der LPS-Applikation und H ₂ S-Gabe auf die Hämoxygenase 1 (HO-1) und das Hitzeschockprotein70 (Hsp70).....	63
Abb. 28: Der Einfluss der LPS-Applikation und H ₂ S-Gabe auf die Phospho-p38 MAP-Kinase (pp38), die Phospho-ERK (pERK) und die Phospho-JNK (pJNK)	65
Abb. 29: Potenzielle Wirkmechanismen der Lungenprotektion durch H ₂ S bei oxidativem Stress.....	71
Abb. 30: Potenzielle Wirkmechanismen der Lungenprotektion durch H ₂ S bei Inflammation.....	75

Tabellen:

Tab. 1: Konzentrationen und Applikationsvolumina von NaHS.....	26
Tab. 2: Aufstellung der verwendeten Primär- und Sekundär-Antikörper.....	34
Tab. 3: Beurteilungskriterien des Acute Lung Injury Score	37

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ALI	Akuter Lungenschaden (<i>acute lung injury</i>)
Ang2	Angiopoietin 2
APS	Ammonium Persulfat
ARDS	Akutes progressives Lungenversagen (<i>acute respiratory distress syndrom</i>)
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BSA	Bovines Serumalbumin
CBS	Cystathionin-β-Synthetase
CTH	Cystathionin-γ-Lyase (<i>auch: CSE</i>)
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
ELISA	Enzyme linked immunosorbant assay
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase (<i>auch: ERK1/2</i>)
<i>g</i>	Beschleunigungskraft
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
HALI	Hyperoxie-induzierter akuter Lungenschaden
HE-Färbung	Hämalaun-Eosin-Färbung
HO-1	Hämoxygenase-1
HPF	Haupt Gesichtsfeld (<i>high power field</i>)
Hsp70	Hitzeschockprotein 70 (<i>heat shock protein 70</i>)
i.n.	Intranasal
i.p.	Intraperitoneal
IL	Interleukin
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kg	Kilogramm
LPS	Lipopolysaccharid
MAP	Mitogenaktiviertes Protein (<i>mitogen activated protein</i>)
Min	Minuten

MIP-2	Macrophage Inflammatory Protein-2
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
<i>n</i>	Gruppengröße
NaCl	Natriumchlorid
NaHS	Natriumhydrogensulfid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
O ₂	Sauerstoff
p	p-Wert, Signifikanzwert
p38	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
pERK	Phospho-Extracellular-signal Regulated Kinase (Phospho-ERK)
pJNK	Phospho-c-Jun N-terminale Kinase (Phospho-JNK)
pp38	Phospho-p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (Phospho-p38)
ppm	Teile von einer Million (<i>parts per million</i>)
RL	Raumluft
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SOD2	Mangansuperoxiddismutase (<i>auch: MnSOD</i>)
Std	Stunde/n
Tab.	Tabelle
TBS	Tris gepufferte Salzlösung (<i>Tris-buffered Saline</i>)
TBST	TBS mit Tween
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

1 Zusammenfassung

Der akute Lungenschaden (*acute lung injury*, ALI) stellt aufgrund der schlechten Behandlungsmöglichkeiten ein großes Problem in der Intensivmedizin dar. Die Auslöser des ALI sind vielfältig. Sowohl Entzündung als auch oxidativer Stress, welcher oftmals durch eine therapeutische Sauerstoffgabe verstärkt wird, spielen in der Pathogenese eine wichtige Rolle. Experimentelle Daten der letzten Jahre deuten zunehmend auf die antioxidativen und antiinflammatorischen Eigenschaften des Gasotransmitters Schwefelwasserstoff (H_2S) hin. Die Effekte von exogen zugeführtem H_2S auf den Lungenschaden oxidativer oder inflammatorischer Genese sind weitestgehend ungeklärt und wurden in dieser Arbeit anhand zweier Mausmodelle untersucht:

- 1) Bei einem Hyperoxie-induzierten ALI konnte gezeigt werden, dass die Verabreichung des H_2S -Donators Natriumshydrogensulfid den Lungenschaden reduzieren konnte. Diese Aussage stützt sich auf die beobachtete Verminderung des histologisch nachweisbaren ALIs und eine Reduktion der Gesamtproteinmenge und Zellzahl in der bronchoalveolären Lavage, die als Biomarker für den oxidativen Lungenschaden dienen. Der protektive Effekt wird vermutlich über eine Reduktion der reaktiven Sauerstoffspezies durch H_2S und eine Abnahme des Signalmoleküls Angiopoietin 2 vermittelt.
- 2) Ein durch Lipopolysaccharid induziertes inflammatorisches ALI wurde durch Inhalation des gasförmigen H_2S behandelt. Anhand der Verminderung des histologischen Gewebeschadens, der Transmigration neutrophiler Zellen und der Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 β und Macrophage Inflammatory Protein-2, zeigte H_2S auch in dieser Versuchsserie einen lungenprotektiven Effekt. Dieser könnte über die verminderte Expression der mitogen aktivierten Proteinkinase p38 vermittelt sein, die nachfolgend zu einer Reduktion der Rekrutierung neutrophiler Zellen in die Lunge führen und dadurch den inflammatorischen Prozess hemmen könnte.
- 3) Die Lipopolysaccharidinstillation führte zu einem Anstieg des H_2S -Syntheseeんzyms Cystathionin- β -Synthetase, das durch H_2S deutlich reduziert wurde. Dieser Befund lässt auf eine Substrathemmung von exogenem H_2S auf die endogene Synthese schließen.

2 Einleitung

2.1 Der akute Lungenschaden

Der akute Lungenschaden (*acute lung injury*, ALI) und die schwerere Form, das acute respiratory distress syndrome (ARDS), sind als klinische Syndrome mit einer erheblichen Letalität von 26 – 44 % behaftet [30; 84]. Zu den häufigsten Ursachen des ALI gehören Sepsis, Pneumonie, schwere Traumata mit Schock, Aspiration von Mageninhalt, Massentransfusion und Verbrennungen [20; 66].

Der akute Lungenschaden ist auf molekularer Ebene der Endpunkt multipler Signalwege, die durch verschiedene lokale oder systemische Einflüsse aktiviert werden und zu einer diffusen Schädigung des Lungenparenchyms führen. Insbesondere kommen bei der Entstehung und der Progression des ALI neben mechanischen Reizen dem oxidativen Stress sowie Entzündungsreaktionen erhebliche Bedeutung zu (Abb. 1).

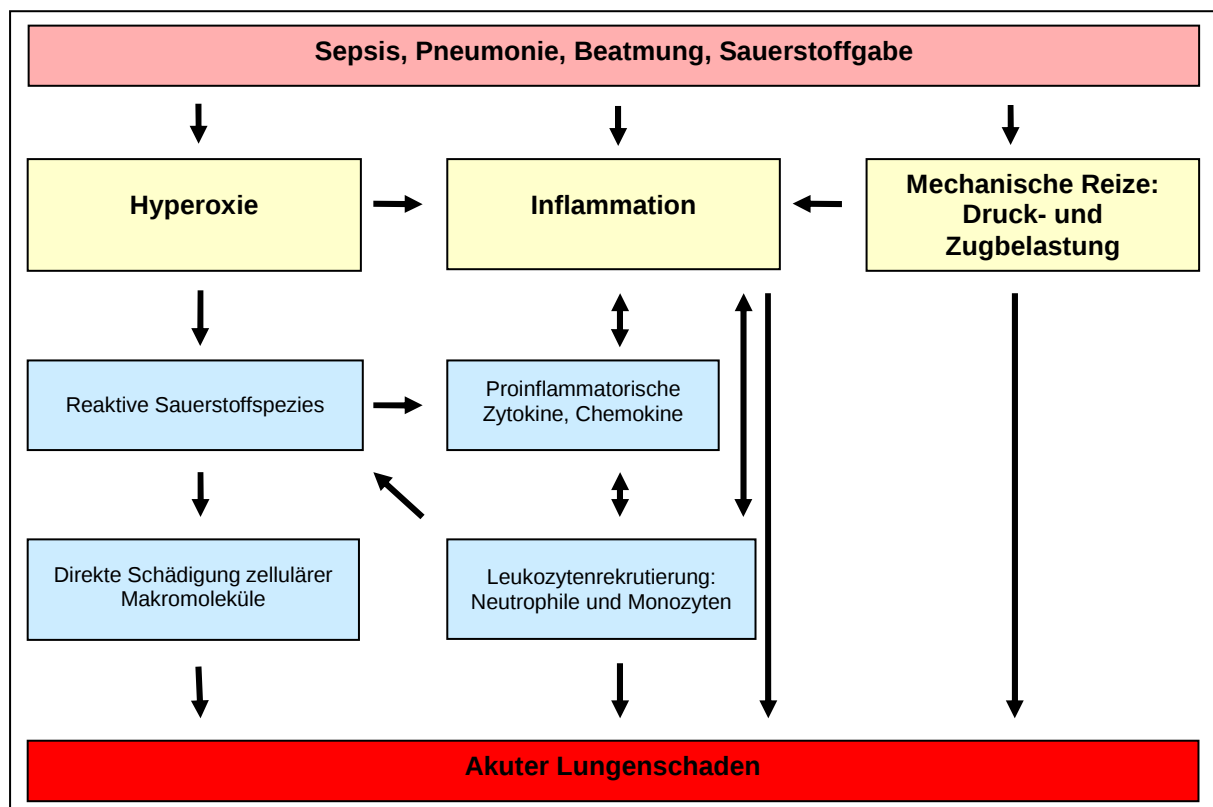


Abb. 1: Auslöser und Pathomechanismen des akuten Lungenschadens

2.1.1 Der oxidative Lungenschaden

Die therapeutische Gabe von Sauerstoff (O_2) spielt in der Notfall- und Intensivmedizin eine wichtige Rolle [18]. Obwohl hochkonzentrierter Sauerstoff eine bekannte Noxe der Lunge ist, gibt es oft keine therapeutischen Alternativen, um bei schlechter Lungenfunktion eine ausreichende O_2 -Sättigung des Gewebes zu erzielen [4; 51]. Unphysiologisch hohe O_2 -Konzentrationen führen, neben Schäden an der Leber [3], der Retina [49] und dem zentralnervösen System [19; 45; 69], auch zu akuten und chronischen Lungenschäden [68].

Die Entstehung eines durch Hyperoxie induzierten Lungenschadens (*hyperoxia-induced acute lung injury*, HALI) ist multifaktoriell und unzureichend verstanden [4; 18]. Die Pathogenese des oxidativen Lungenschadens ist auf den unmittelbaren Einfluss von Sauerstoff, die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) [21] und auf inflammatorische Prozesse zurückzuführen.

Zu den ROS gehören u.a. Wasserstoffperoxid, Superoxid-Anionen und Hydroxyl-Radikale. Bei einem Überangebot an Sauerstoff entstehen in den Mitochondrien nichtenzymatisch mehr Superoxid-Anionen als unter normoxischen Bedingungen, die nachfolgend zu Wasserstoffperoxid und anderen reaktiven Spezies reagieren [102]. ROS schädigen zelluläre Makromoleküle direkt durch Oxidation und verändern somit molekulare Signaltransduktionswege, die in der Folge extrinsisch (rezeptorvermittelt) und intrinsisch (mitochondrial) proinflammatorische Signalkaskaden aktivieren und den Zelltod induzieren können [4; 80; 119]. Des Weiteren können ROS durch die Regulation bestimmter Proteine indirekt zu einer Gewebeschädigung führen. In diesem Kontext spielt der Wachstumsfaktor Angiopoietin 2 (Ang2) eine wichtige Rolle. Ang2 wird durch eine O_2 -Exposition hochreguliert und stimuliert den programmierten Zelltod [10]. Ob direkt oder indirekt durch ROS verursacht, ruft der resultierende Zellschaden in den verbliebenen Zellen Entzündungsreaktionen hervor, die durch eine gesteigerte Sekretion proinflammatorischer Zytokine gekennzeichnet sind. Letztere führen zur Migration weiterer Entzündungszellen in das betroffene Gewebe, die wiederum ROS produzieren und somit den *circulus vitiosus* unterhalten [25].

Durch die oben genannten Veränderungen führt die Hyperoxie zu einem alveolären Schaden mit Verlust der alveolo-kapillären Barriere, einer nachfolgenden erhöhten Permeabilität und einer Ödembildung. Es kommt zu strukturellen Umwandlungen des Lungengewebes mit Pulmonalfibrose, Ausbildung hyaliner Membranen und Läsionen der Pulmonalgefäße [4; 25]. Klinisch ist der akute Lungenschaden durch einen gestörten Gasaustausch und ein Lungenversagen geprägt. Zumindest tierexperimentell führt die alleinige Einatmung hoher Sauerstoffkonzentrationen zum Tod [68; 101].

2.1.2 Der inflammatorische Lungenschaden

Wie eingangs erwähnt sind inflammatorische Prozesse für das ALI von erheblicher Bedeutung. Dies gilt sowohl für die Pathophysiologie als auch für die Pathogenese eines Lungenschadens. Histologisch zeigen sich die Folgen als zelluläre Schädigung des Lungengewebes mit entzündlichen Infiltraten durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen [32; 54; 68; 108].

Die Rekrutierung und Wirkung neutrophiler Zellen spielen eine entscheidende Rolle in der Entstehung des ALI. Sie setzen ebenso wie auch aktivierte Lungenzellen selbst Sauerstoffradikale und proinflammatorische Zytokine, u.a. das Interleukin-1-beta (IL-1 β), frei [2; 22; 68]. ROS induzieren, wie weiter oben erläutert, den Zelltod und triggern die Entzündungsreaktion. Das IL-1 β wird als maßgeblich beteiligtes Zytokin in der inflammatorischen Kaskade bei der Entstehung eines ALI angesehen [83] und ist beispielsweise bei ARDS-Patienten die überwiegend gefundene, proinflammatorisch aktive Substanz in der bronchoalveolären Lavage (BAL) [85].

Für die Adhäsion und Aktivierung von neutrophilen Zellen spielt die intrazelluläre mitogenaktivierte Proteinkinase (*mitogen activated protein kinase*, MAP-Kinase) p38 eine zentrale Rolle. Sie induziert beispielsweise die Synthese des proinflammatorischen Zytokins Tumornekrosefaktor- α und von Chemokinen, insbesondere von dem Macrophage Inflammatory Protein-2 (MIP-2) [2]. MIP-2 ist ein murines Protein, welches homolog zu dem humanen Interleukin-8 spezifische, chemotaktische Wirkungen auf neutrophile Zellen aufweist [74; 113].

Mechanischer, inflammatorischer und oxidativer Stress sind, unabhängig vom Auslöser, die zentralen Mechanismen des ALI und verstärken sich gegenseitig. Hinsichtlich der mechanischen Stimuli steht zum Schutz vor einem beatmungsassoziierten Lungenschaden die Veränderung der Beatmungsmodi durch eine Verminderung der Atemzugvolumina im Vordergrund [30; 104]. Für die oxidative und inflammatorische Komponente der Lungenschädigung hingegen fehlt derzeit eine effektive Therapie oder Prophylaxe [104; 108]. Eine idealtypische, therapeutische Intervention, die diesen Negativ-Zyklus durchbrechen könnte, müsste sowohl antiinflammatorisch als auch antioxidativ wirken. Der rezent gefundene Gasotransmitter Schwefelwasserstoff (H_2S) kann experimentell beide Eigenschaften vorweisen.

2.2 Schwefelwasserstoff

Schwefelwasserstoff war lange Zeit als reiner Giftstoff bekannt. Schon im millimolaren Bereich zeigt H_2S durch die Hemmung der Cytochrom-C-Oxidase zytotoxische Eigenschaften [64]. Klinisch imponieren in niederen Konzentrationen eine Reizung der Atemwege und Augen und in höheren Konzentrationen eine Atemdepression bis hin zum Atemstillstand [8; 87]. Obwohl ein Vorkommen von H_2S im Hirngewebe schon in den 1980ern beschrieben wurde [109], postulierten Abe und Kimura 1996 erstmals eine physiologische Funktion im Sinne einer Bedeutung als potenzieller endogener Neurotransmitter [1]. Die Enzyme Cystathionin- γ -Lyase (CTH, *auch* CSE), Cystathionin- β -Synthetase (CBS) und 3-Mercaptopyruvat Sulfurtransferase bilden H_2S aus L-Cystein in vielen Organen oder Zellen wie beispielsweise in der Leber, den Nieren, dem Gehirn, den glatten Muskelzellen und den Lymphozyten [62; 64; 96; 107].

H_2S hat neben Stickstoffmonoxid und Kohlenstoffmonoxid in den letzten Jahren als körpereigener Gasotransmitter, d.h. als gasförmiges Molekül mit Signalwirkung, an Bedeutung gewonnen [96; 107]. Bislang konnten multiple Effekte des Botenstoffes aufgezeigt werden, die insbesondere durch die bislang vier beschriebenen molekularen Mechanismen wirken (Abb. 2; [64; 96]): a) an Ionenkanälen, insbesondere durch die Aktivierung von Kalium-Adenosintriphosphat-Kanälen. Die H_2S -induzierte Öffnung dieser Kanäle beeinflusst Gefäßtonus, Darmbewegung,

Myokard-Kontraktilität, Neurotransmission und Insulinsekretion [64]. Endogenes H_2S nimmt so durch seine vasorelaxierende Wirkung Einfluss auf die Blutdruckregulation [106; 117] und wirkt damit kardioprotektiv [17; 52]; b) durch Proteinmodifikation mittels Sulfhydration, dessen physiologischer Effekt jedoch noch nicht geklärt ist; c) über die Hemmung der Cytochrom-C-Oxidase, durch die der Zellmetabolismus und die Adenosintriphosphat-Produktion limitiert wird und d) über die Modifikation an der Signaltransduktion beteiligter intrazellulärer Proteine und Transkriptionsfaktoren [24; 62].

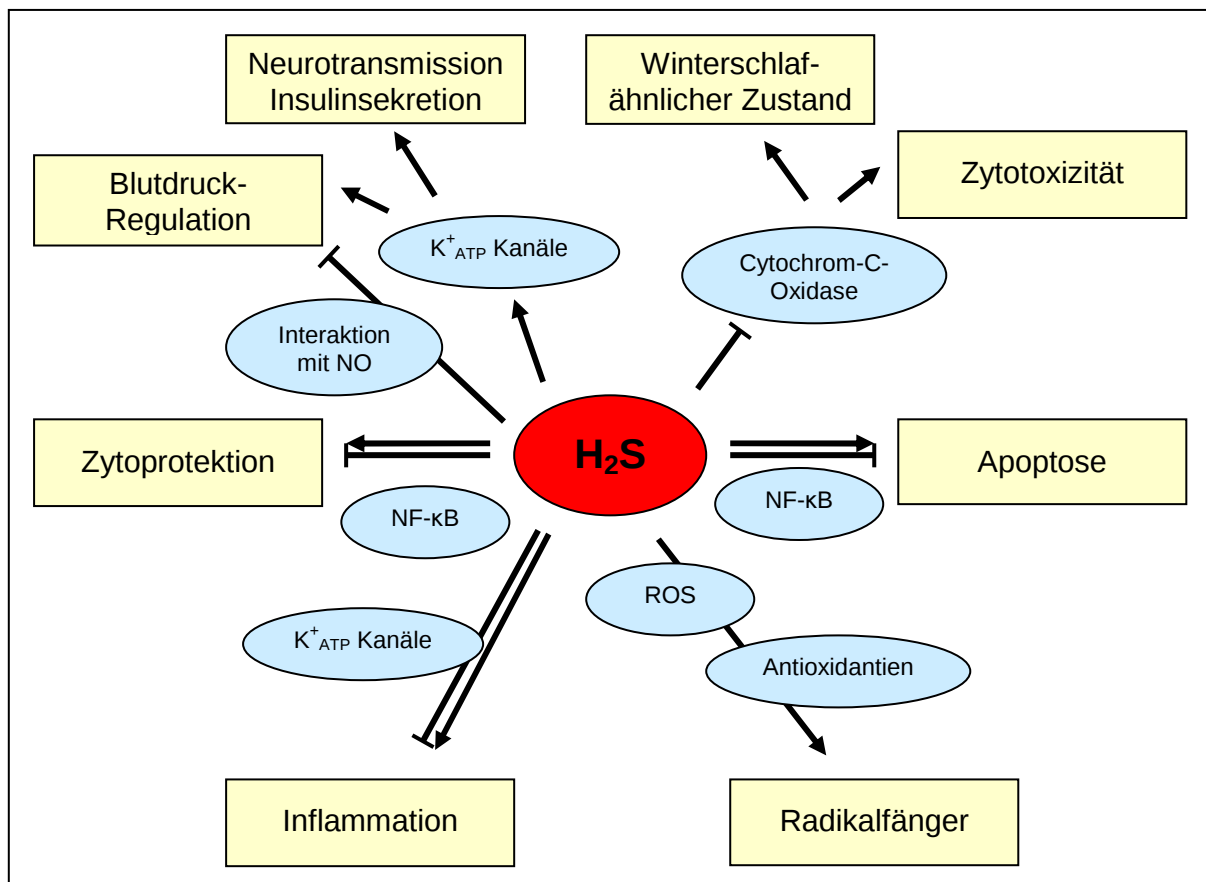


Abb. 2: Angriffspunkte und Wirkmechanismen von H_2S

H_2S : Schwefelwasserstoff, ROS: reaktive Sauerstoffspezies, NO: Stickstoffmonoxid, NF- κ B: Transkriptionsfaktor „ κ B“, K^+_{ATP} : Kalium-Adenosintriphosphat, $\rightarrow$ aktivierende Wirkung, $\dashv$ hemmende Wirkung. Abbildung modifiziert nach Baumgart, K et al., 2009 [7].

Ähnlich den anderen Gasotransmittern scheint die exogene Zufuhr von H_2S in geringen Konzentrationen zell- und organprotektive Eigenschaften aufweisen zu können [96]. Allerdings sind die bislang gezeigten Daten kontrovers. Abhängig von den verwendeten Konzentrationen, der Applikationsart und den Tiermodellen wurden

für die exogene Applikation des Gases zytotoxische oder -protektive, pro- oder antiapoptotische, antioxidative und pro- oder antiinflammatorische Effekte berichtet [33; 62; 64; 71; 96]. Der zugrunde liegende Mechanismus und die beteiligten Signaltransduktionswege, die H₂S beeinflussen kann, sind bislang ebenfalls nur unzureichend verstanden und erklärbar [62; 96; 107].

2.2.1 Die Wirkung von H₂S auf oxidative Prozesse

Der antioxidative Effekt von H₂S wurde in vielen *in vitro* Modellen gezeigt [37; 53; 65; 110; 116]. Schwefelwasserstoff kann reaktive Spezies wie ROS [37; 116], Peroxynitrit [110], Chlorsäure [111] und Homocystein [115] neutralisieren und somit als starker Reduktor agieren und vor einer Oxidation schützen [62]. Die antioxidative Wirkung des H₂S wird zudem durch seine Funktion als intrazellulärer Radikalfänger und die Stimulation endogener antioxidativer Enzymsysteme, wie z.B. der Hämoxigenase, getragen [79]. Ob und wie die potenziell antioxidativen Eigenschaften von H₂S in der Lunge wirken, ist derzeit unklar.

2.2.2 Die Wirkung von H₂S auf das Entzündungsgeschehen

Die Datenlage hinsichtlich H₂S-vermittelter Effekte bei Entzündungsgeschehen bleibt als kontrovers zu beurteilen. Verschiedene Tiermodelle zeigten eine proinflammatorische Wirkung einer gasförmigen H₂S-Applikation oder von H₂S-Donatoren [12; 13; 15; 61; 97; 98; 121; 123]. Eine Hemmung der endogenen H₂S-Synthese wurde in diesen Versuchen mit vermindertem Schaden in Verbindung gebracht.

Im Gegensatz zu den oben genannten Hinweisen zum proinflammatorischen Effekt von H₂S sprechen viele Studien für eine Entzündungshemmung durch H₂S. Die Applikation des Gases wurde mit vermindertem Pfotenödem und reduzierter Leukozyten-Infiltration [120], geringerer Schwere einer Pankreatitis und Pankreatitis-induzierten Lungenschäden [14; 92], protektiver Wirkung bei nichtsteroidaler Antirheumatika (NSAR)-induzierten Magenulzera [34] und einem verlängerten Überleben bei systemischer Entzündungsreaktion nach Endotoxingabe [99] in Verbindung gebracht. In verschiedenen Modellen konnten lungenprotektive Effekte von H₂S nachgewiesen werden. Diese zeigen sich für sowohl den rauchgas- [31] als

auch beatmungsinduzierten Lungenschaden [33]. Die Lungenprotektion wird vermutlich über die Aktivierung antiinflammatorischer und antioxidativer Signalwege durch H_2S vermittelt. Die antiinflammatorische Wirkung bei direkter, entzündlich bedingter Lungenschädigung wurde bislang nicht untersucht.

2.3 Fragestellung

Aufgrund fehlender effektiver antioxidativer und antiinflammatorischer Therapieansätze bei der Behandlung eines akuten Lungenschadens, des organprotektiven Potenzials von Schwefelwasserstoff und der unzureichenden Datenlage, wurden in der vorliegenden Arbeit die Wirkungen exogen zugeführten H_2S auf den akuten Lungenschaden untersucht. Hierfür galt es insbesondere folgende Fragen zu beantworten:

1. Schützt die Applikation von H_2S vor einem hyperoxiebedingten Lungenschaden?
2. Falls eine Organprotektion vorliegt, welche molekularbiologischen Mechanismen könnten den beobachteten organprotektiven Effekt von H_2S bei einer hyperoxisch bedingten Lungenschädigung erklären?
3. Schützt die Applikation von H_2S vor einem inflammatorischen Lungenschaden?
4. Falls eine Organprotektion vorliegt, welche molekularbiologischen Mechanismen könnten den beobachteten organprotektiven Effekt von H_2S bei einer inflammatorisch bedingten Lungenschädigung erklären?
5. Welchen Einfluss hat die Art der Lungenschädigung und des exogen zugeführten H_2S auf die endogene H_2S -Synthese?

3 Material und Methoden

3.1 *Materialien*

3.1.1 Geräte

Mikroskop	Axiovert25, Zeiss, D
Oxymeter	Oxygen Monitor Model 810, w+w electronic AG, Basel, CH
Zentrifuge	Biofuge 15R, Heraeus Sepatech, D
Tischzentrifuge	Biofuge fresco, Heraeus Instruments, D
Zytospinzentrifuge	Cytospin3, Shandon, Thermo Scientific, USA
Konfokales Laser-Scanning Mikroskop	510 META NLO, Carl ZEISS, Jena, D
Photometer	DU 640, Beckman, USA
Kryotom	CM 3050, Leica, Nussloch, D
TURRAX Homogenisator	Ultra-Turrax T25, Janke+Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen, D
IBRID Gasmessgerät	MX6, Industrial Scientific, USA
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, D

3.1.2 Software

AxioVision	AxioVs40 V 4.7.2.0, Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH, D
ImageJ	http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html , USA
Statistik	SigmaPlot 12.0, Systat Software, Inc., USA
ELISA Auswertung	SoftMax Pro 4.8, Molecular Devices, USA
Laser-Scanning Mikroskopie Software	Zen 2010, Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH, D
Textverarbeitung und Excel	Microsoft Office 2003, Microsoft Corporation, USA
Scannertreiber	Canon MP 550, Canon Inc., Japan

3.1.3 Gase

Sauerstoff	99,5 %	Universitätsklinikum Freiburg, D
H ₂ S	80 ppm	Air Liquide, Krefeld, D

3.1.4 Chemikalien, Reagenzien, Medikamente

Lipopolysaccharide	E.coli 0111:B4, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
PBS (endotoxinfrei)	P5368, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
ECL und ECL Plus Detektionsreagenz	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München, D
BSA	A7906-100, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Tissue Tek ®	O.C.T.™ Compound, Sakura Finetek GmbH, Staufen, D
Ketamin	Ketanest, 50 mg/ml, Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, D
Acepromazin	Vetranquil 1 %, Ceva Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf, D
Diff-Quick	Medion Diagnostics AG, Düdingen, CH
Dihydroethidium	5 mM/DMSO, D23107, Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D

3.1.5 Puffer, Lösungen und Gele

10x TBS	12,1 g 87,66 g mit Salzsäure auf pH 8 einstellen ad 1000 ml	TRIS NaCl (ddH ₂ O)
Waschpuffer 1x TBST 0,2 %	100 ml 2 ml ad 1000 ml	10x TBS Tween (ddH ₂ O)
Ladepuffer (5x SDS)	10 ml 5 ml 1,54 g 2 g 0,1g ad 20 ml	Glycerol 1 M TRIS pH 6,8 DTT SDS Bromphenolblau (ddH ₂ O)
5x SDS	15,1 g 94 g 50 ml ad 1000 ml	TRIS Glycin 10 % SDS Lösung (ddH ₂ O)
Laufpuffer (1x SDS)	200 ml 800 ml	5x SDS ddH ₂ O

Nassblot Puffer	3,03 g 14,41 g 200 ml ad 1000 ml	TRIS Glycin Methanol (ddH ₂ O)
5 % Milch	5 gr Magermilchpulver ad 100 ml (1x TBST 0,2 %)	
5 % BSA	5 gr Bovines Serum Albumin ad 100 ml (1x TBST 0,2 %)	
Sammelgel	6,8 ml 1,7 ml 1,25 ml 0,1 ml 0,1 ml 0,01 ml	ddH ₂ O Acrylamid 30 %ig 1 M TRIS (pH 6,8) 10 % SDS APS TEMED
Trenngel 10 %	7,9 ml 6,7 ml 5,0 ml 0,2 ml 0,2 ml 0,008 ml	ddH ₂ O Acrylamid 30 %ig 1 M TRIS (pH 6,8) 10 % SDS APS TEMED
Trenngel 13 %	6,0 ml 8,6 ml 5,0 ml 0,2 ml 0,2 ml 0,008 ml	ddH ₂ O Acrylamid 30 %ig 1 M TRIS (pH 6,8) 10 % SDS APS TEMED
APS 10 %	3 g 30 ml	APS (Ammonium Persulfat) ddH ₂ O
Phosphatase-Inhibitor-Puffer	50 ml 1 Tablette	Gewebepuffer "Complete" Phosphatase Inhibitor (REF 11836153001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D)
Gewebepuffer	3,78 g 500 ml	TRIS ddH ₂ O

Stripping Puffer A	3 g	50 mM Tris - pH 6,8
	10 g	2 % SDS
	3,9 ml	10 mM β -Mercaptoethanol
	ad 500 ml	(ddH ₂ O)
Stripping Puffer B	Restore Western Blot Stripping Buffer, #21063, Thermo Scientific, Bonn, D	

3.1.6 Kits und Assays

Mouse MIP-2 Immunoassay R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, D

Mouse IL-1 β Immunoassay R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, D

3.2 *In vivo* Tierversuche

Alle Tierversuche wurden gemäß den aktuellen Richtlinien der lokalen Ethikkommission zur Haltung und Verwendung von Labortieren und nach Genehmigung durch das Regierungspräsidium Freiburg durchgeführt (Ethikkommission Universität Freiburg, Freiburg, D, Genehmigungsnummer G-07/25).

3.2.1 Tiere

Für die Versuche wurden männliche C57BL/6N Mäuse (Charles River, Sulzfeld, D) mit einem Körpergewicht von 21 - 24 g verwendet. Die Versuche begannen nach einer Eingewöhnungszeit von mindestens 4 Tagen. Die Mäuse hatten vor und während der Versuche freien Zugang zu Trinkwasser und Nahrung und konnten sich zu jeder Zeit frei im Käfig bewegen. Der Tag-Nacht-Rhythmus wurde mit Hilfe von Zeitschaltuhren konstant bei 12 Std / 12 Std gehalten.

3.2.2 Modell 1: Hyperoxischer Lungenschaden

3.2.2.1 *Hyperoxie-Exposition*

Für alle Hyperoxie-Versuche wurden die Mäuse in ihren Käfigen in einer dichten Plexiglasbox platziert und Sauerstoff mit einer Konzentration von 99,5 % zugeführt. Zum Anfluten wurde für 10 Min ein Gasfluss von 8 Liter / Min verwendet. Die anschließende Reduktion des Gaszuflusses auf 0,5 bis 1 Liter / Min als Erhaltungsdosis ergab eine kontinuierliche Sauerstoffkonzentration von 88 %, welche mit einem Oxymeter stetig überwacht wurde. Zwei Ablassventile sorgten für die Vermeidung von Überdruck in der Box. Interventionen an den Versuchstieren fanden außerhalb der Plexiglasbox statt, sodass die Hyperoxie-Behandlung für ca. 5 Min / Tag unterbrochen werden musste. Die O₂-Konzentration sank durch das Öffnen der Box kurzzeitig auf ca. 60 %, stieg jedoch nach ca. 5 Min wieder auf über 85 % an. Die Versuche an Kontrolltieren wurden außerhalb der Plexiglasbox unter Raumluft mit 21 % O₂ durchgeführt.

3.2.2.2 NaHS-Applikation

Die Applikation von Natriumhydrogensulfid (NaHS) erfolgte intraperitoneal (i.p.). Unmittelbar vor jeder Injektion wurde NaHS in 0,9 %iger Natriumchlorid-Lösung (NaCl) gelöst und bei gleichen auf das Körpergewicht bezogenen Volumina auf die in Tab. 1 aufgeführten Konzentrationen verdünnt. Das Körpergewicht wurde vor jeder Injektion gemessen. Als Vehikel wurde Kontrolltieren 200 µl NaCl injiziert. Die Vehikel- und NaHS-Applikationen erfolgten zu Beginn des Versuches (72 Std Hyperoxie) bzw. eine Std vor Versuchsbeginn (60 Std Hyperoxie) und in der Folge repetitiv alle 24 Std mit jeweils auf das aktuelle Gewicht adaptierten Volumina.

Dosierung [mg NaHS / kg KG / Tag]	Konzentration Lösung [mg NaHS / ml]	Applikations-Volumen [ml / kg KG]
0,5	0,0625	8,0
1,0	0,125	8,0
5,0	0,625	8,0
10,0	1,25	8,0

Tab. 1: Konzentrationen und Applikationsvolumina von NaHS

NaHS: Natriumhydrogensulfid, KG: Körpergewicht.

3.2.3 Modell 1: Versuchsetablierung und -gruppen

3.2.3.1 Der Effekt von NaHS auf die Proteinkonzentration, Zell- und Neutrophilenanzahl in der BAL nach 72 Std Hyperoxie

In Anlehnung an frühere Untersuchungen wurde initial eine Hyperoxiezeit von 72 Std bestimmt [56; 72; 124]. Für diesen Versuchsabschnitt dienten 6 Gruppen mit $n = 6 - 11$ Tiere / Gruppe:

- Gruppe 1, RL (Kontrolle): Raumlufte (72 Std) + NaCl (0,9 %, 200 µl / Tag)
- Gruppe 2, Vehikel: Hyperoxie (72 Std) + NaCl (0,9 %, 200 µl / Tag)
- Gruppe 3, 0,5: Hyperoxie (72 Std) + 0,5 mg NaHS / kg / Tag
- Gruppe 4, 1: Hyperoxie (72 Std) + 1 mg NaHS / kg / Tag
- Gruppe 5, 5: Hyperoxie (72 Std) + 5 mg NaHS / kg / Tag
- Gruppe 6, 10: Hyperoxie (72 Std) + 10 mg NaHS / kg / Tag.

3.2.3.2 *Der Effekt von Hyperoxie auf die Proteinkonzentration, Zell- und Neutrophilenanzahl in der BAL im zeitlichen Verlauf*

Aufgrund der Resultate aus dem Versuchsabschnitt 3.2.3.1 wurde in der Folge eine Zeitkinetik hinsichtlich des hyperoxiebedingten Lungenschadens erstellt. Die Mäuse wurden in 6 Gruppen ($n = 2 - 11$ Tiere / Gruppe) für 12, 24, 48, 54, 60 bzw. 72 Std den oben genannten Hyperoxie-Bedingungen ausgesetzt (Abb. 3). Weitere Interventionen fanden nicht statt.

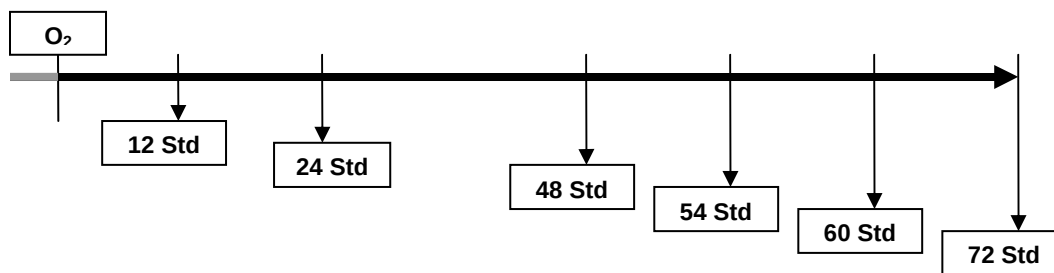


Abb. 3: Zeitkinetik der Hyperoxie

C57BL/6N Mäuse wurden für 12 - 72 Std Hyperoxie-Bedingungen mit 88 % O₂ ausgesetzt.

3.2.3.3 *Der Effekt unterschiedlicher Konzentrationen an NaHS auf die Proteinkonzentration, Zell- und Neutrophilenanzahl in der BAL nach 60 Std Hyperoxie*

Aufgrund der Ergebnisse aus Abschnitt 3.2.3.2 wurde für die folgenden Versuchsserien eine Hyperoxiezeit von 60 Std gewählt. Eine Stunde vor Beginn der Hyperoxie und dann alle 24 Std wurden Vehikel bzw. NaHS i.p. in unten stehenden Konzentrationen appliziert. Die verabreichten Volumina sind in Tab. 1 aufgeführt. Nach 60 Std endete der Versuch. Folgende Gruppen ($n = 8$ Tiere / Gruppe) wurden verglichen:

- | | |
|---------------------------------------|---|
| Gruppe 1, <i>Vehikel</i> (Kontrolle): | Hyperoxie (60 Std) + NaCl (0,9 %, 200 µl / Tag) |
| Gruppe 2, 0,5: | Hyperoxie (60 Std) + 0,5 mg NaHS / kg / Tag |
| Gruppe 3, 5: | Hyperoxie (60 Std) + 5,0 mg NaHS / kg / Tag |
| Gruppe 4, 10: | Hyperoxie (60 Std) + 10 mg NaHS / kg / Tag. |

3.2.3.4 Der Einfluss einer NaHS-Applikation auf den hyperoxischen Lungenschaden

Aufgrund der Ergebnisse aus Abschnitt 3.2.3.3 wurde für den folgenden Versuch eine NaHS Konzentration von 10 mg / kg / Tag gewählt. Die Versuchstiere wurden für 60 Stunden mit Raumluft oder Hyperoxie behandelt. Die Injektion von Vehikel oder NaHS erfolgte eine Stunde vor Beginn der Hyperoxie und dann alle 24 Std (Abb. 4). Verglichen wurden vier Gruppen mit jeweils $n = 8$ Tieren / Gruppe:

Gruppe 1, *RL* (Kontrolle): Raumluft (60 Std) + NaCl (0,9 %, 200 µl / Tag)

Gruppe 2, *RL* + NaHS: Raumluft (60 Std) + 10 mg NaHS / kg / Tag

Gruppe 3, O_2 : Hyperoxie (60 Std) + NaCl (0,9 %, 200 µl / Tag)

Gruppe 4, O_2 + NaHS: Hyperoxie (60 Std) + 10 mg NaHS / kg / Tag.

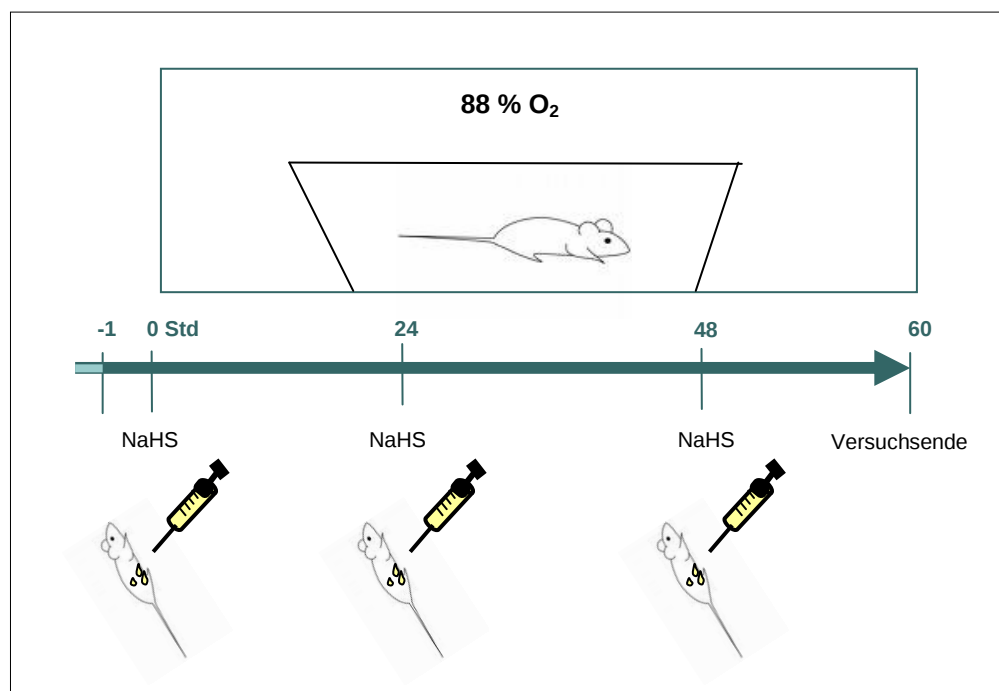


Abb. 4: Versuchsaufbau des in vivo Modells zum hyperoxischen Lungenschaden

C57BL/6N Mäusen wurde zu Beginn und repetitiv alle 24 Std NaHS oder Vehikel appliziert und einer Atmosphäre mit 88 % Sauerstoff oder Raumluft ausgesetzt.

3.2.4 Modell 2: Lipopolysaccharid (LPS)-induzierter Lungenschaden

3.2.4.1 H_2S -Exposition

Gasförmiger Schwefelwasserstoff (H_2S , 80 parts per million (ppm) in 21 % O_2) wurde über einen Flussmesser kontinuierlich in eine dichte Plexiglasbox geleitet und die

H₂S-Konzentration kontinuierlich mittels Gas-Messgerät kontrolliert. Die Gasapplikation begann 1 Std vor LPS-Gabe und wurde für diese für 5 Minuten unterbrochen. Kontrolltiere befanden sich während des Versuches unter Raumluft mit 21 % O₂.

3.2.4.2 LPS-Applikation

Zur Induktion einer pulmonalen Entzündungsreaktion wurde den Versuchstieren Endotoxin LPS intranasal (i.n.) verabreicht. Das gefriergetrocknet vorliegende LPS wurde in einer endotoxinfreien Phosphat-gepufferten Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) gelöst und auf die unten genannten Konzentrationen in einem zu applizierenden Volumen von 70 µl verdünnt. Alle Aliquots der LPS-Lösung lagerten bis zu den Versuchen bei -20 °C. Während einer inhalativen Kurznarkose mit Isofluran wurde die LPS-Lösung den Mäusen auf die Nase geträufelt und von ihnen daraufhin aspiriert. Kontrolltiere bekamen entsprechend 70 µl endotoxinfreies PBS als Vehikel. Die Versuchszeit ab diesem Zeitpunkt betrug 6 Std.

3.2.5 Modell 2: Versuchsetablierung und -gruppen

3.2.5.1 Pulmonale Entzündungszeichen nach intranasaler LPS-Applikation

Den Versuchstieren wurde LPS in Konzentrationen von 0,025 - 250 ng / 70 µl PBS i.n. appliziert. [68]. Die Versuche erfolgten für 6 Stunden in Raumluft.

3.2.5.2 Der Einfluss von H₂S auf den LPS-induzierten Lungenschaden

Aufgrund der Ergebnisse aus dem vorherigen Abschnitt wurde den Versuchstieren LPS 0,25 ng in 70 µl PBS oder 70 µl Vehikel i.n. appliziert und Raumluft mit oder ohne Supplementierung von 80 ppm H₂S zugeführt (Abb. 5). Die Versuchsdauer betrug nach einstündiger Vorbehandlung und ab dem Zeitpunkt der LPS- oder Vehikel-Applikation 6 Std.

Vier Versuchsgruppen mit jeweils $n = 8$ Tieren / Gruppe wurden verglichen:

Gruppe 1, <i>Vehikel</i> (Kontrolle):	70 µl PBS (Raumluft)
Gruppe 2, <i>Vehikel</i> + H ₂ S:	70 µl PBS (H ₂ S, 80 ppm)
Gruppe 3, <i>LPS</i> :	0,25 ng LPS in 70 µl PBS (Raumluft)
Gruppe 4, <i>LPS</i> + H ₂ S:	0,25 ng LPS in 70 µl PBS (H ₂ S, 80 ppm).

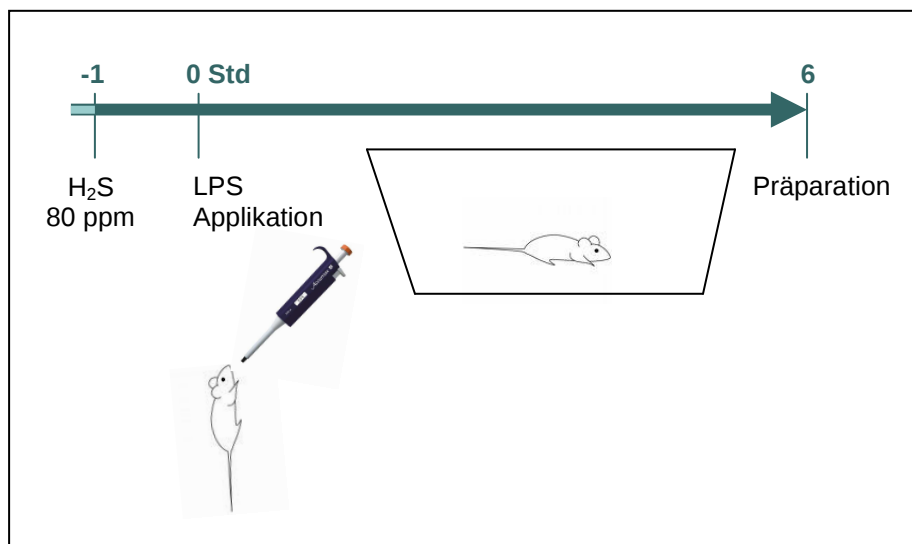


Abb. 5: Versuchsaufbau des in vivo Modells zum Einfluss von H₂S auf den LPS-induzierten Lungenschaden

C57BL/6N Mäusen wurde i.n. 0,25 ng LPS in 70 µl PBS oder 70 µl PBS allein (Vehikel) appliziert. Es erfolgte Zuführung von Raumluft mit oder ohne Supplementierung von 80 ppm H₂S. Die Versuchsdauer ab LPS- / Vehikel-Gabe betrug 6 Std.

3.3 Versuchsende und Probenentnahme

Am Ende der Tierversuche wurden die Mäuse mit 300 µl eines Gemisches aus Ketamin (10 mg / ml) und Acepromazin (1 mg / ml) über die Induktion eines Atemstillstandes getötet. Die Trachea wurde freipräpariert und in ihr eine verkürzte 20G Kanüle (Abbocath®-T, Hospin Venisystems) fixiert. Nach der Eröffnung des Bauchraumes und des Thorax erfolgte eine intrakardiale Blutabnahme. Zur Serumgewinnung wurde das Blut auf Eis gekühlt (mindestens 10 Min), zentrifugiert (25 Min, 10.000 rpm / 5.264 g) und der Serumüberstand abpipetiert. Die linke Lungenhälfte wurde abgeklemmt, während bei der rechten eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) durch zweimaliges Spülen mit 800 µl kaltem PBS durchgeführt wurde. Die rechten Lungenlappen wurden anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Es folgte die Präparation der linken Lungenhälfte für die Histologie, wie unter 3.4.4 beschrieben. Die Lagerung von Gewebe, Serum und BAL fand bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C statt.

3.4 Auswertung von BAL, Lungengewebe und Histologie

Die Untersuchung der in den Tierversuchen gewonnenen BAL und des Lungengewebes fand wie in Abb. 6 dargestellt statt.

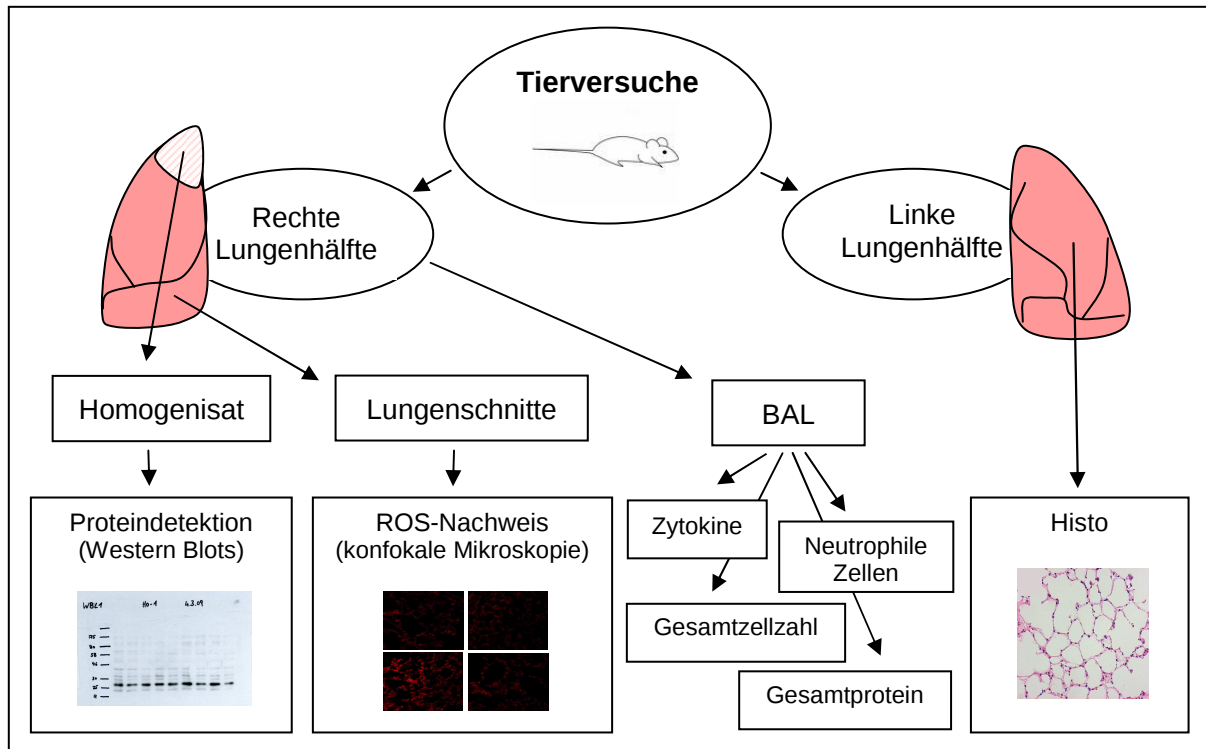


Abb. 6: Schematische Darstellung der Analyse von Lungengewebe und BAL (Details s. Text)

O₂: Sauerstoff, H₂S: Schwefelwasserstoff, LPS: Lipopolysaccharid, NaHS: Natriumhydrogensulfid, BAL: bronchoalveoläre Lavage, ROS: reaktive Sauerstoffspezies.

3.4.1 Aufbereitung BAL

Die auf Eis gekühlte BAL wurde direkt nach der Tierpräparation zentrifugiert (10 Min, 2.000 rpm / 210 g) und der Überstand aliquotiert. Ein Aliquot diente der direkten Proteinbestimmung. Die restlichen Aliquots wurden zur weiteren Analyse in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das verbleibende Pellet wurde in 500 µl kaltem PBS resuspendiert, um die Zellzahl zu bestimmen.

3.4.1.1 Bestimmung der Gesamtzellzahl

Für die zytologische Auswertung wurden Zellen lichtmikroskopisch in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Gezählt wurden alle intakten Zellen mit Zellkern, die zu den Immunzellen gezählt werden (Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Lymphozyten).

3.4.1.2 Bestimmung des Anteils an neutrophilen Zellen

Es wurden 120 – 200 µl der in PBS aufgenommenen BAL-Zellen für die Zytozentrifugation eingesetzt und für 10 Min bei 800 rpm / 280 g zentrifugiert. Die Färbung der Präparate erfolgte nach mindestens einem Tag Trockenzeit mit Diff-

Quick. Ausgezählt wurde die Anzahl neutrophiler Granulozyten pro 200 intakte Zellen in 5 zufällig gewählten Gesichtsfeldern.

3.4.1.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung der BAL Proben erfolgte in Doppelbestimmung nach Bradford. Jeweils 10 µl BAL, vorgelegt in 1 ml verdünnter Bradford Lösung, wurden gegen eine Kontrolle (10 µl PBS) bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Das mathematische Mittel der Doppelprobenbestimmung wurde ermittelt. Die Messung des Proteingehaltes bei Lungenhomogenisaten (Verweis 3.4.2.1) erfolgte nach der gleichen Methode aus 2 µl Gewebe-Überstand. Als Kontrolllösung diente hierbei Gewebepuffer.

3.4.1.4 ELISA

Zur Zytokinbestimmung aus der BAL wurden Interleukin-1-beta (IL-1 β) und Macrophage Inflammatory Protein-2 (MIP-2) enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) genutzt und nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.4.2 Western Blot

Die Proteindetektion mittels Western Blot Analyse erfolgte wie folgt (Abb. 7):

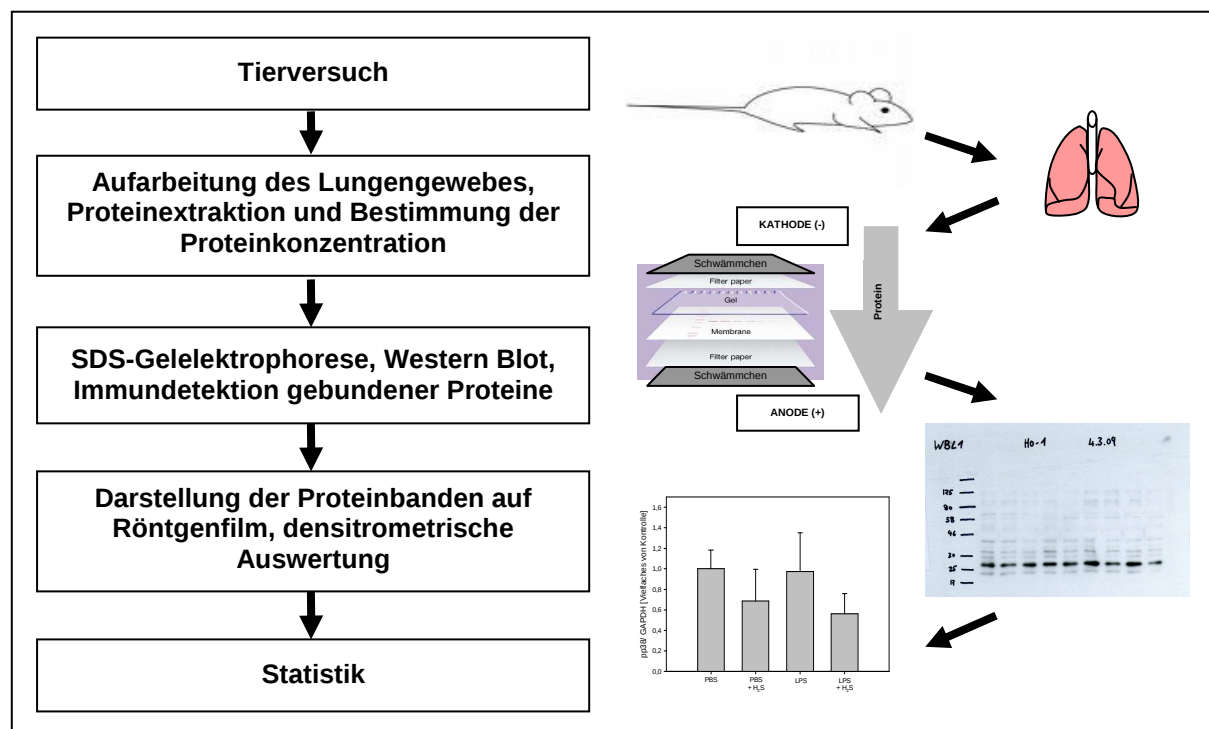


Abb. 7: Schematischer Ablauf der Proteindetektion

3.4.2.1 Aufarbeitung des Gewebes

Aus dem jeweils oberen rechten Lungenlappen wurde ein Homogenisat hergestellt. Nach dem Wiegen der Lungenlappen wurde das Zehnfache ihres Gewichts an Phosphatase-Inhibitor-Puffer in 2 ml Reaktionsgefäßen eisgekühlt vorgelegt. Es folgte die Zugabe des gefrorenen Gewebestücks. Mit einem TURRAX-Stampfer wurde das Gewebe homogenisiert und anschließend zentrifugiert (5 Min, 13.000 rpm / 16.060 g, 4 °C). Der Überstand wurde aliquotiert und eingefroren. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford wie unter 3.4.1.3 beschrieben.

3.4.2.2 Polyacrylamid-Gele und Gelelektrophorese

Die nachfolgende Gelelektrophorese erfolgte mit einem frisch hergestelltem 10 bzw. 13 %igem Polyacrylamid-Trenngel mit einer Sammelgel-Überschichtung. Die Proben tauten auf Eis auf. Die entsprechende Probenmenge mit einem Proteingehalt von 30 µg wurde mit Ladepuffer (5 x SDS) im Überschuss für 5 Min bei 95°C denaturiert. Nach dem Zentrifugieren (2 Min, 13.000 rpm / 16.060 g) der abgekühlten Proben wurden sie in die entsprechenden Geltaschen pipettiert. Ein zuvor hergestellter Probenstandard, ein Homogenisat aus gepoolten Lungenlappen der Kontrolltiere, diente bei allen Gelen als Vergleichswert. So konnten die Proteinbanden unterschiedlicher Gele nach der Auswertung miteinander verglichen werden. Als Größenreferenz für die Proteine dienten 10 µl Molekulargewichtsmarker (Prestained Protein Marker, Broad Range, New England BioLabs, # P7708, USA) pro Gel. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 120 Volt und 150 Milliampere in Laufpuffer.

3.4.2.3 Proteintransfer

Für den Transfer der Proteine vom Gel auf eine PVDF-Membran (# IPV00010, Millipore GmbH, Schwalbach / Ts., D) diente das Nassblot-Verfahren. Unmittelbar vor ihrem Gebrauch erfolgte die Aktivierung der Membran für 10 Sekunden mit Methanol. Die Kammer wurde mit kaltem Nassblot Puffer, sowie einem Eiskühlelement gefüllt. Die für 2 Std angelegte Spannung für den Transfer betrug bei 350 Milliampere 100 Volt.

3.4.2.4 Immundetektion der jeweiligen Proteine

Nach dem Blotten erfolgte die Inkubation der Membranen mit 10 ml 5 % Magermilchlösung in TBST für eine Stunde, um alle unspezifischen Bindungsstellen

der Membranen zu blockieren. Über Nacht inkubierten die Membranen mit den spezifischen Antikörpern, gelöst in 5 %iger Magermilch- bzw. BSA-Lösung, unter ständiger Durchmischung bei 4 °C. Die verwendeten Antikörper können Tab. 2 entnommen werden. Nach fünfmal fünfminütigem Waschen der Membranen mit Waschpuffer erfolgte die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper für mindestens eine Stunde bei Raumluft. Jede Membran wurde erneut mit Waschpuffer gewaschen (fünfmal 5 Min) und anschließend mit ECL oder ECL Plus Detektionsreagenz für eine Minute benetzt. Die Belichtung (1 Sekunde bis 25 Min) der Röntgenfilme und die Entwicklung fanden daraufhin in einer Dunkelkammer statt.

Primäre Antikörper					
Antikörper	Firma	Bestell-Nr.	Verdünnung Primär-AK	Verdünnung mit	Sekundär-AK
α -Ang2	Abcam	ab8452	1 : 500	5 % Milch	Ratte
α -CBS	Santa Cruz	sc-46830	1 : 500	5 % Milch	Ziege
α -CTH	Abnova	H00001491-M01	1 : 1000	5 % Milch	Maus
α -GAPDH	assay designs	CSA-335	1 : 2500	5 % Milch	Maus
α -HO-1	assay designs, Stressgen	SPA-895	1 : 250 - 1 : 2000	5 % Milch	Ratte
α -Hsp70	Abcam	ab31010	1 : 3000	5 % Milch	Ratte
α -pERK	Cell Signaling	9101	1 : 2000	5 % Milch	Ratte
α -pJNK	Cell Signaling	9251	1 : 1000	5 % BSA	Ratte
α -pp38	Cell Signaling	9211	1 : 2000	5 % BSA	Ratte
α -SOD2	Abcam	ab13533	1 : 20.000	5 % Milch	Ratte
Sekundäre Antikörper (Peroxidase gekoppelt)					
Donkey α -rabbit (Ratte)	GE Healthcare	NA 9340	1 : 2000	5 % Milch	
Sheep α -mouse (Maus)	GE Healthcare	NA 931	1 : 3000	5 % Milch	
Donkey α -goat (Ziege)	Santa Cruz	sc-2020	1 : 2000	5 % Milch	

Tab. 2: Aufstellung der verwendeten Primär- und Sekundär-Antikörper

AK: Antikörper, BSA: Bovines Serumalbumin, Ang2: Angiopoietin 2, CBS: Cystathionin- β -Synthetase, CTH: Cystathionin- γ -Lyase, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, HO-1: Hämooxygenase-1, Hsp70: Hitzeschockprotein 70, pERK: Phospho-Extracellular-signal Regulated Kinase, pJNK: Phospho-c-Jun N-terminale Kinase, pp38: Phospho-p38-mitogenaktivierte Proteinkinase, SOD2: Mangansuperoxiddismutase.

3.4.2.5 Normalisierung, Wiederverwendung der Membranen, Stripping

Um weitere Proteine nachzuweisen, fand ein „Stripping“ der Membranen statt. Zwei Methoden erwiesen sich hierbei als gleichermaßen gut. Entweder inkubierten die Membranen für 30 Min bei 50 °C mit Stripping Puffer A oder für 10 Min bei Raumtemperatur mit Stripping Puffer B. Hiernach erfolgte ein weiterer Waschgang von fünfmal 5 Min mit Waschpuffer, anschließend konnten die Membranen nach dem oben genannten Schema erneut blockiert und mit Antikörpern inkubiert werden. Die Normalisierung zum Nachweis gleichmäßiger Proteinladung und -transfer erfolgte mittels Antikörper gegen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

3.4.2.6 Densitometrische Auswertung

Der Scan der Filme für die densitometrische Auswertung erfolgte auf weißem Hintergrund. Mit dem Programm ImageJ wurde die Grauintensität der einzelnen Banden gemessen und, zur Vergleichbarkeit der Blots, mit dem oben genannten Lungenhomogenisat-Standard verrechnet. Daraufhin wurde bei allen Proben das Verhältnis der Intensität des Primärantikörpers zur Intensität von GAPDH mathematisch ermittelt. Die Graphen zeigen von diesem Verhältnis Primärantikörper zu GAPDH das Gruppenmittel der Verumgruppen als Vielfaches von der Kontrollgruppe des Tierversuchs.

3.4.3 ROS-Nachweis

Für den Nachweis von Superoxid-Anionen wurden gefrorene, rechte untere Lungenlappen in Tissue-Tek® eingebettet, aus diesen mit einem Kryotom 6 µm dicke Schnitte angefertigt, auf Glasobjektträger aufgenommen und getrocknet. Am folgenden Tag wurden die Proben für 20 min in PBS rehydriert und anschließend mit 2 Mikromolar Dihydroethidium pro Gewebestück benetzt. Die Schnitte inkubierten lichtgeschützt in einer Feuchtkammer bei 37 °C für 30 Min bevor sie in *Fluorescent Mounting Medium* (Dako, USA) eingebettet und mit einem Deckglas geschützt wurden. Die rot fluoreszierenden Labels wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop mit einer Wellenlängen von 543 nm für die Laser Line und 560 nm *long-pass* Filter detektiert. Die Vergrößerung erfolgte mit dem Objektiv Plan-Apochromat 20 x / 0,75 (Zeiss, D). Die verwendete ZEN 2011 Software (Carl Zeiss) ersetzt für die Darstellung die gemessenen Graustufen je nach Intensität mit den

Farben Rot, Grün und Blau. Zusätzlich fand eine densitometrische Auswertung der Grauaufnahmen mit ImageJ 1,44p statt. Pro Versuchsgruppe wurden die Lungen von 4 Tieren untersucht und pro Lunge jeweils 3 Fotos ausgewertet. Die densitometrische Messung erfolgte bei 100 willkürlich auf dem Foto gesetzten Zellkernen.

3.4.4 Histologie der Lunge

Für die histologische Auswertung wurden die linken Lungenhälften bei der Präparation über die Trachealkanüle mit einer Tissue-Tek® - PBS Lösung (Mischungsverhältnis 1 / 3) mit einem definierten Druck von 20 Zentimeter Wassersäule gefüllt, in unverdünntes Tissue-Tek® eingebettet und langsam auf flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung bei -80 °C. Mit einem Kryotom wurden bei -30 °C und einer Tischneigung von 1° Kryoschnitte mit einer Dicke von 12 µm angefertigt, auf Objektträger aufgenommen und bis zur Färbung bei -80 °C gelagert. Vor dem Färben tauten die Lungenschnitte 10 Min auf, fixierten mit 100 % Aceton bei 4 °C für 10 Min und trockneten anschließend unter Raumluft. Die Färbung erfolgte mit Hämalaun (2 Min, mit Leitungswasser Bläuen für 10 Min) und Eosin (2 Min) (HE-Färbung). Die Schnitte wurden anschließend durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert und mit Entellan gedeckelt. Bei 200-facher Vergrößerung wurden pro Lunge 4 Fotos mit jeweils 5 Hauptgesichtsfeldern (*high power fields*, HPFs) ausgewertet. Die Wahl der Ausschnitte erfolgte dabei ungesetztlich. Eine dritte Person wertete sie mit verblindeter Nummerierung aus.

Für die Beurteilung wurde:

- a) die Wanddicke (in µm) aller Wände pro HPF mit der skalierten Linealfunktion der Mikroskopie-Software gemessen und der Mittelwert pro Tier erstellt.
- b) für die Bestimmung der zellulären Infiltrate alle eingewanderten Zellen pro HPF gezählt und der Mittelwert pro Tier erstellt.
- c) das Ausmaß der Hämorrhagie bestimmt (bewertet von „keine“ bis „sehr schwer“).

Aus den drei Parametern berechnet sich der nach Nishina et al. [75] modifizierte Acute Lung Injury Score (ALI-Score), der in der Summe 0 bis 12 Punkte je nach Schwere des Lungenschadens vergibt. Tabelle 3 zeigt die Beurteilungskriterien.

	0	1	2	3	4
Alveoläre Wanddicke [µm]	0 - 4,0	4,1 - 7,0	7,1 - 9,0	9,1 - 12	ab 12
Infiltrate [Infiltrate / HPF]	0 - 4,5	4,6 - 9	9,1 - 15	15,1 - 22	ab 22,1
Hämorrhagie	keine	minimal	moderat	schwer	sehr schwer

Tab. 3: Beurteilungskriterien des Acute Lung Injury Score

3.5 Statistische Auswertung

Alle Graphen zeigen die Mittelwerte der beschriebenen Gruppen mit der Standardabweichung. Die Datenanalyse erfolgte anschließend mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von einem Student-Newman-Keuls Posthoc Test oder einem Dunn's Posthoc Test. Ein p-Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

4 Ergebnisse

Modell 1: Hyperoxischer Lungenschaden

4.1 Etablierung eines in vivo Modells zur Behandlung des oxidativen Lungenschadens mit H₂S

Zur Untersuchung eines potenziell protektiven Effektes von H₂S bei oxidativer Lungenschädigung, wurde ein neues Mausmodell etabliert. Hierzu wurden Vorversuche zur Expositionsdauer der Hyperoxie sowie zur Dosisbestimmung des H₂S-Donators NaHS durchgeführt.

4.1.1 Der Effekt von NaHS auf die Proteinkonzentration, Zell- und Neutrophilenanzahl in der BAL nach 72 Std Hyperoxie

In einem ersten Versuchsansatz wurden Mäuse für 72 Std einer Hyperoxie ausgesetzt und mit NaHS behandelt. Als ein wichtiger Schadensparameter wurde nach Versuchsende der Proteingehalt in der BAL untersucht. Dabei zeigte sich, dass im Gegensatz zu in Raumluft (RL) gehaltenen Tieren die Hyperoxietiere einen etwa 10-fach höheren Gesamtproteingehalt aufwiesen. Die Gabe von NaHS in unterschiedlichen Konzentrationen hatte keinen Einfluss auf die Proteinfreisetzung (Abb. 8 A). Weder bei der Zellzahl noch beim Anteil der Neutrophilen wurden zwischen den Gruppen signifikante Veränderungen beobachtet (Abb. 8 B+C).

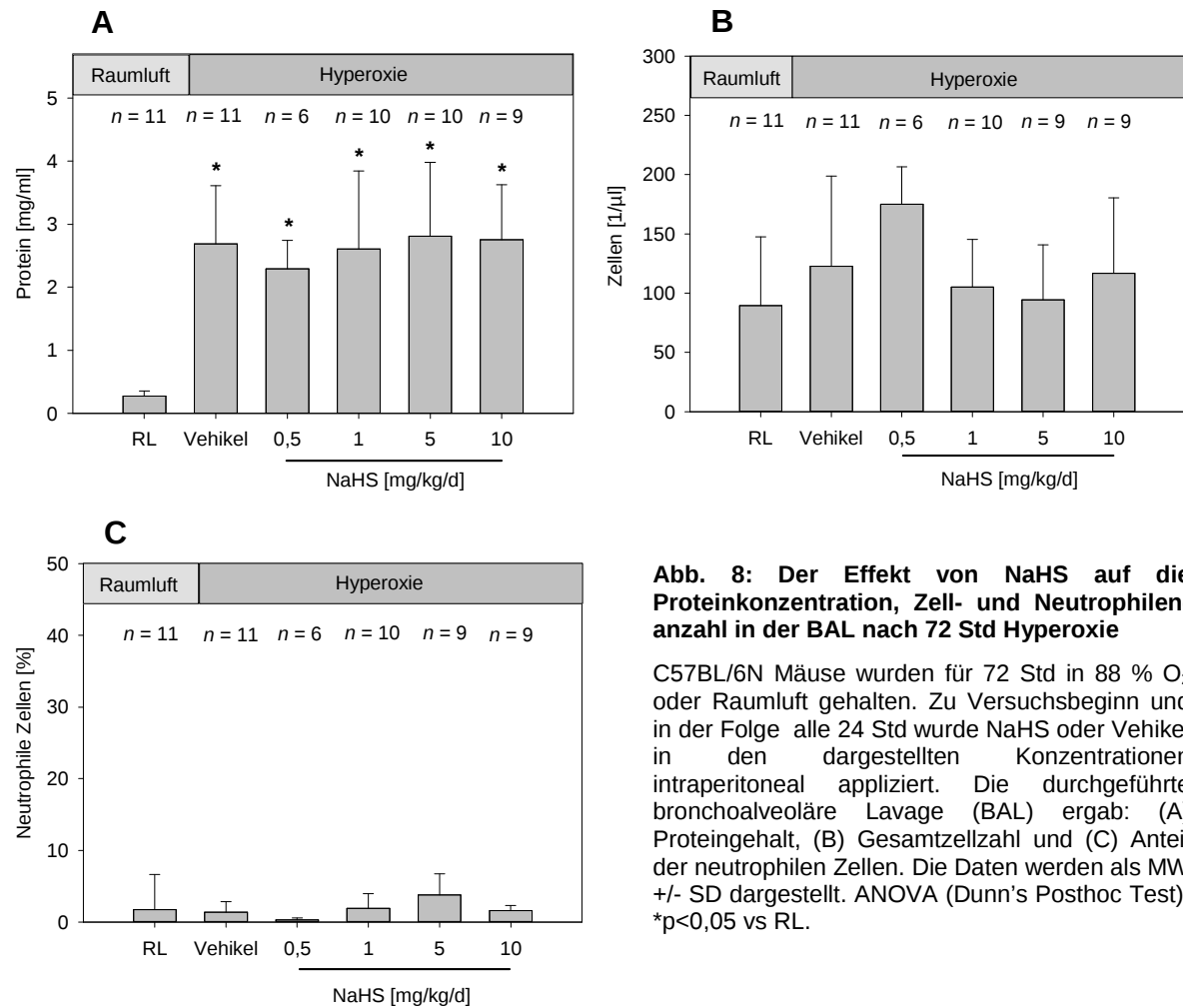


Abb. 8: Der Effekt von NaHS auf die Proteinkonzentration, Zell- und Neutrophilenanzahl in der BAL nach 72 Std Hyperoxie

C57BL/6N Mäuse wurden für 72 Std in 88 % O₂ oder Raumluf gehalten. Zu Versuchsbeginn und in der Folge alle 24 Std wurde NaHS oder Vehikel in den dargestellten Konzentrationen intraperitoneal appliziert. Die durchgeführte bronchoalveoläre Lavage (BAL) ergab: (A) Proteingehalt, (B) Gesamtzellzahl und (C) Anteil der neutrophilen Zellen. Die Daten werden als MW $\pm$ SD dargestellt. ANOVA (Dunn's Posthoc Test), *p<0,05 vs RL.

4.1.2 Der Effekt von Hyperoxie auf die Proteinkonzentration, Zell- und Neutrophilenanzahl in der BAL im zeitlichen Verlauf

Die Ergebnisse aus 4.1.1 legten den Verdacht nahe, dass der resultierende Lungenschaden nach 72 Std Hyperoxie ein Ausmaß erreichte, der für eine Modulation durch H_2S zu hoch war. Deshalb wurde in diesem Abschnitt eine Zeitkinetik des Lungenschadens durch Hyperoxie erstellt. In den ersten 24 Stunden unter Hyperoxie-Bedingungen war kein Anstieg des Gesamtproteingehalts in der BAL zu beobachten (Abb. 9 A). Nach 48 und 54 Std war ein leichter Anstieg zu vermerken. Nach 60 Std wurde die ca. 8-fache Proteinkonzentration des Ausgangswertes gemessen und nach 72 Std enthielt die BAL einen 10-fach höheren Proteinanteil als zu Beginn. Die Tendenz zu mehr intakten Zellen in der BAL bei längerer O_2 -Exposition erwies sich als statistisch nicht signifikant. Der Anteil der neutrophilen Zellen blieb mit maximal 5 % gering (Abb. 9 B+C). Der Gesamtproteingehalt in der BAL wurde als primärer Schadensparameter für den oxidativen Lungenschaden gewählt. Der deutliche Anstieg des Proteingehalts zwischen 54 und 60 Std ließ für diesen Zeitpunkt eine Überschreitung des Schaden-Schwellenwertes durch Hyperoxie vermuten.

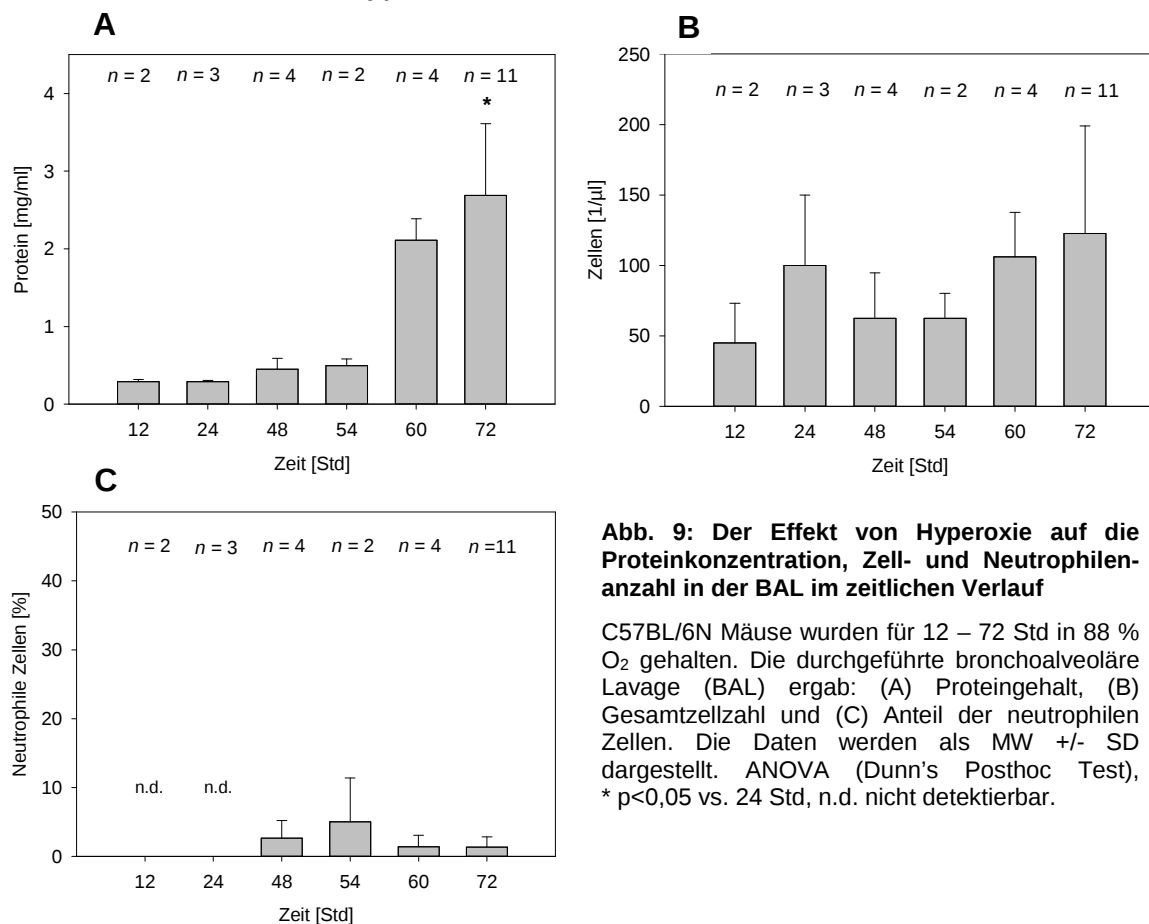


Abb. 9: Der Effekt von Hyperoxie auf die Proteinkonzentration, Zell- und Neutrophilenanzahl in der BAL im zeitlichen Verlauf

C57BL/6N Mäuse wurden für 12 – 72 Std in 88 % O_2 gehalten. Die durchgeführte bronchoalveoläre Lavage (BAL) ergab: (A) Proteingehalt, (B) Gesamtzellzahl und (C) Anteil der neutrophilen Zellen. Die Daten werden als MW $\pm$ SD dargestellt. ANOVA (Dunn's Posthoc Test), * $p < 0,05$ vs. 24 Std, n.d. nicht detektierbar.

4.1.3 Der Effekt unterschiedlicher Konzentrationen an NaHS auf die Proteinkonzentration, Zell- und Neutrophilenanzahl in der BAL nach 60 Std Hyperoxie

Aufgrund der Ergebnisse aus Abschnitt 4.1.2 wurde für alle weiteren Hyperoxie-Versuche eine Expositionszeit von 60 Std verwendet. Da bislang kaum Daten zur repetitiven Gabe des H_2S -Donators NaHS erhältlich sind, wurde in diesem Versuchsabschnitt eine Dosiskinetik erstellt. Bei ansteigender NaHS-Konzentration sank sowohl der Gehalt an Gesamtprotein als auch die Gesamtzellzahl in der BAL kontinuierlich ab (Abb. 10 A+B). Hinsichtlich des Proteingehalts führte eine tägliche NaHS-Dosis von 5 bzw. 10 mg / kg und bezüglich der Gesamtzellzahl eine Tagesdosis von 10 mg / kg zur signifikanten Reduktion. Wie in den vorangegangenen Versuchen zeigte sich in allen Gruppen ein sehr niedriger Anteil neutrophiler Zellen in der BAL (Abb. 10 C). Für alle weiteren Versuche wurde aufgrund dieser Ergebnisse eine NaHS-Konzentration von 10 mg / kg / Tag gewählt.

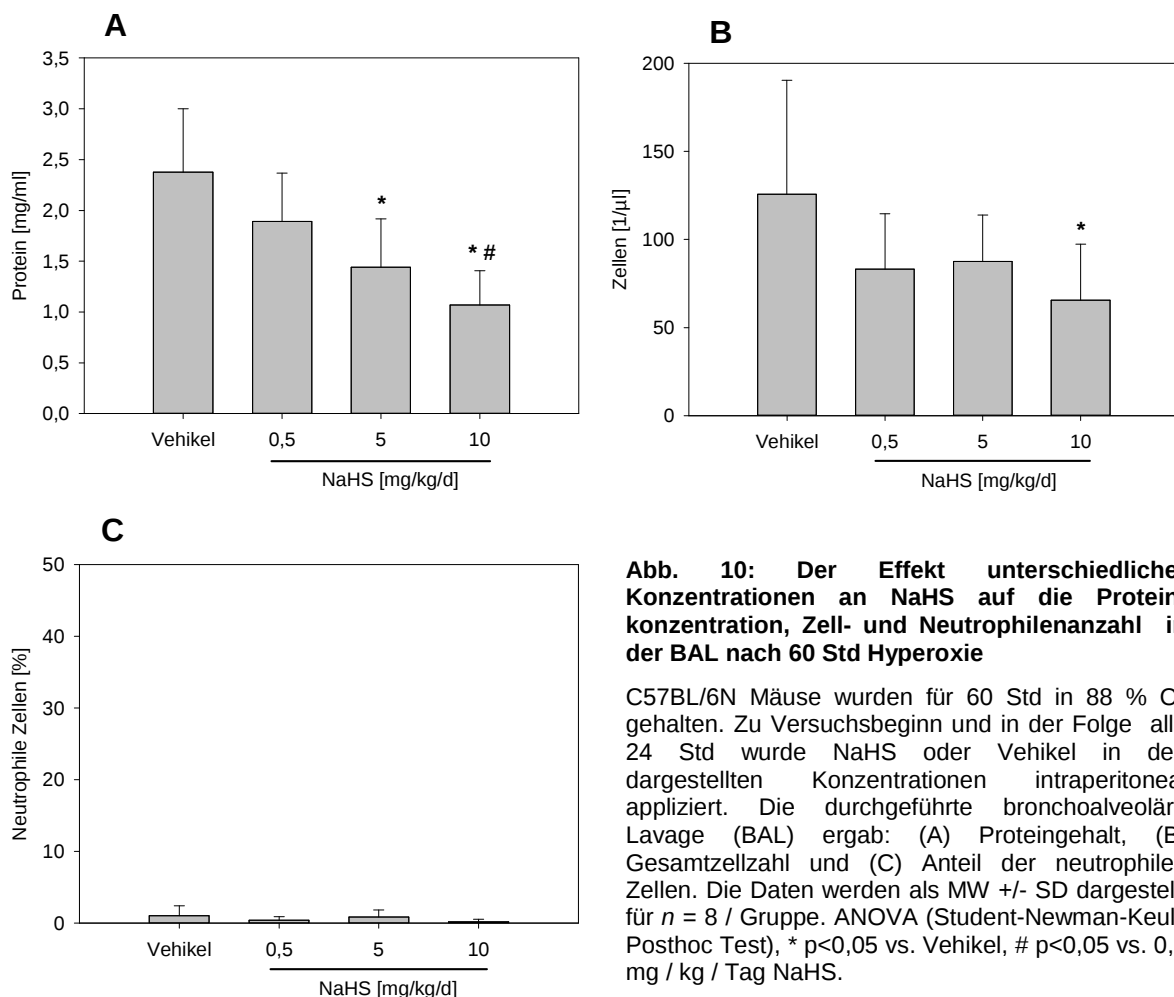


Abb. 10: Der Effekt unterschiedlicher Konzentrationen an NaHS auf die Proteinkonzentration, Zell- und Neutrophilenanzahl in der BAL nach 60 Std Hyperoxie

C57BL/6N Mäuse wurden für 60 Std in 88 % O_2 gehalten. Zu Versuchsbeginn und in der Folge alle 24 Std wurde NaHS oder Vehikel in den dargestellten Konzentrationen intraperitoneal appliziert. Die durchgeführte bronchoalveoläre Lavage (BAL) ergab: (A) Proteingehalt, (B) Gesamtzellzahl und (C) Anteil der neutrophilen Zellen. Die Daten werden als MW $\pm$ SD dargestellt für $n = 8$ / Gruppe. ANOVA (Student-Newman-Keuls Posthoc Test), * $p < 0,05$ vs. Vehikel, # $p < 0,05$ vs. 0,5 mg / kg / Tag NaHS.

4.2 In vivo Modell: Pulmonale Effekte von H₂S bei Hyperoxie

Bisher sind keine Studien zum Effekt von H₂S auf den hyperoxiebedingten Lungenschaden bekannt. Mittels des oben neu etablierten und definierten Maus-Modells sollte dieser potenzielle Effekt untersucht werden.

4.2.1 Der Einfluss einer NaHS-Applikation auf den hyperoxischen Lungenschaden

4.2.1.1 Der Effekt von H₂S und Hyperoxie auf die Proteinkonzentration, Gesamtzellzahl und neutrophile Zellen in der BAL

Die 60-stündige Hyperoxie-Exposition bewirkte einen deutlichen Anstieg des Gesamtproteingehalts und der Gesamtzellzahl in der BAL. Die Behandlung mit 10 mg / kg / Tag NaHS senkte die Proteinfreisetzung um 64 % und verhinderte die Zunahme der Gesamtzellzahl (Abb. 11 A+B). Der Anteil neutrophiler Zellen zeigte keine Veränderung in der BAL (Abb. 11 C).

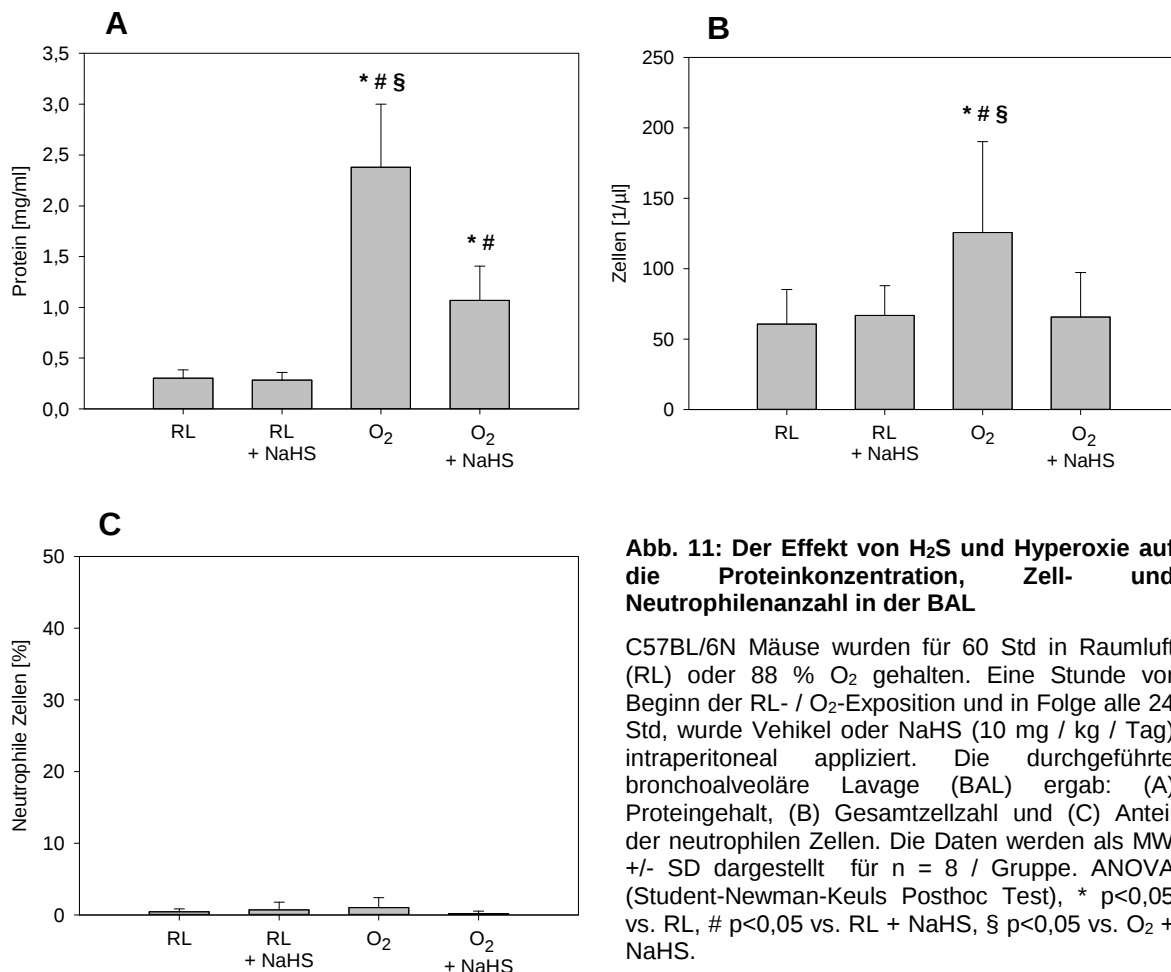


Abb. 11: Der Effekt von H₂S und Hyperoxie auf die Proteinkonzentration, Zell- und Neutrophilenanzahl in der BAL

C57BL/6N Mäuse wurden für 60 Std in Raumluft (RL) oder 88 % O₂ gehalten. Eine Stunde vor Beginn der RL- / O₂-Exposition und in Folge alle 24 Std, wurde Vehikel oder NaHS (10 mg / kg / Tag) intraperitoneal appliziert. Die durchgeführte bronchoalveoläre Lavage (BAL) ergab: (A) Proteingehalt, (B) Gesamtzellzahl und (C) Anteil der neutrophilen Zellen. Die Daten werden als MW +/- SD dargestellt für n = 8 / Gruppe. ANOVA (Student-Newman-Keuls Posthoc Test), * p<0,05 vs. RL, # p<0,05 vs. RL + NaHS, § p<0,05 vs. O₂ + NaHS.

4.2.1.2 Der Effekt von Hyperoxie und NaHS-Applikation auf die Lungenstruktur

Der oben beschriebene Rückgang der BAL-Proteinfreisetzung und -Gesamtzellzahl durch NaHS ließ die Frage zu, ob die Behandlung mit H_2S zu einem histologisch nachweisbaren Schutz der Lunge führt. Abbildung 12 zeigt repräsentative, HE-gefärbte Lungenschnitte. Eine normale Lungenstruktur mit dünnen Alveolarsepten, gleichmäßiger Architektur der Alveolen und wenigen zellulären Infiltraten war bei Raumluft-Kontrolltieren sichtbar (Abb. 12 A). Die NaHS-Behandlung bei Raumluft-Exposition führte zu diskret vermehrten Infiltraten, wies jedoch keine Veränderung der Alveolarwanddicke auf (Abb. 12 B). Im Gegensatz zur Raumluftexposition, wies die Lunge nach O_2 -Exposition dicke Alveolarwände, kleine und unregelmäßige Alveolen, sowie erhebliche Infiltrate auf (Abb. 12 C). Diese Veränderungen zeigten sich bei gleichzeitiger NaHS-Applikation deutlich vermindert (Abb. 12 D).

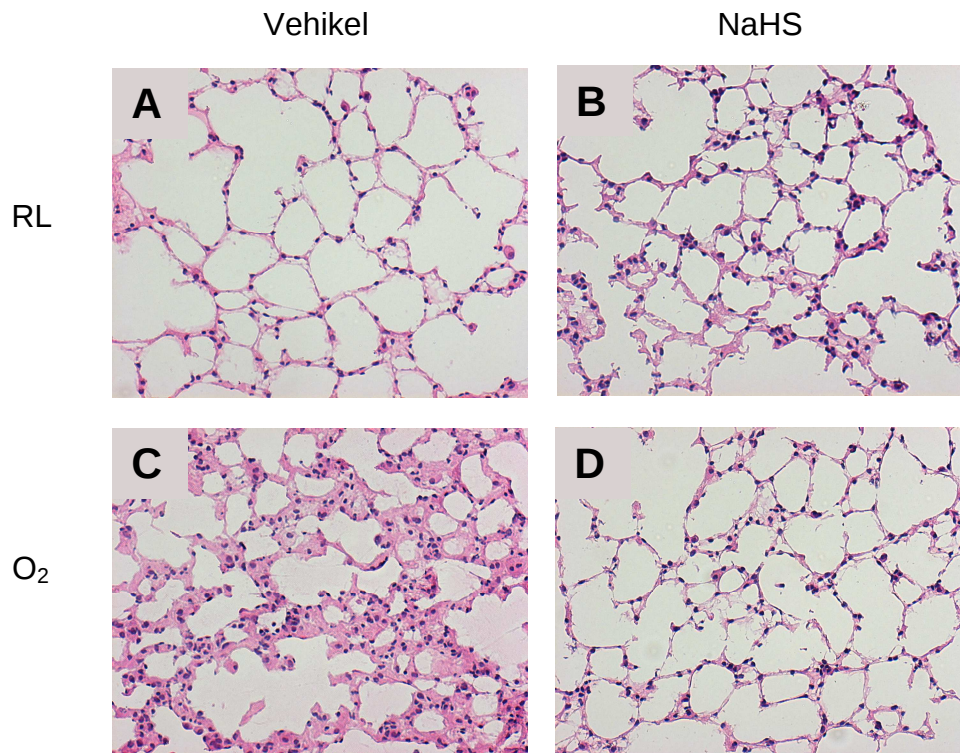


Abb. 12: Der Effekt von Hyperoxie und NaHS-Applikation auf die Lungenstruktur

C57BL/6N Mäuse wurden für 60 Std in Raumluft (RL) oder 88 % O_2 gehalten. Eine Stunde vor Beginn der RL- / O_2 -Exposition und in Folge alle 24 Std, wurde Vehikel oder NaHS (10 mg / kg / Tag) intraperitoneal appliziert. Die repräsentativen, lichtmikroskopischen Bilder der Lungenschnitte in HE-Färbung (12 μ m, Vergrößerung 200-fach) zeigen: (A) RL-Kontrolle, (B) RL + NaHS, (C) Hyperoxie-Kontrolle, (D) Hyperoxie + NaHS.

4.2.1.3 Die Quantifizierung des Effekts von Hyperoxie und NaHS-Applikation auf die Lungenstruktur

Die quantitative Analyse der histologischen Ergebnisse ergab eine deutliche Zunahme der alveolären Wanddicken bei O₂-Exposition, die sich durch eine NaHS-Behandlung vollständig verhindern ließ und trotz Hyperoxie mit den Kontrolltieren vergleichbar war (Abb. 13 A). Eine Zunahme der zellulären Infiltrate konnte sowohl bei den mit NaHS behandelten Raumluf-Tieren als auch bei alleiniger Hyperoxie-Exposition beobachtet werden (Abb. 13 B). Die Infiltrate zeigten sich unter der Hyperoxie und paralleler NaHS-Applikation in einem Maß gemindert, der dem Kontrollniveau entsprach (Abb. 13 B). Unter der Hyperoxie nahm die Hämorrhagie im Lungengewebe signifikant zu. Die Gabe von NaHS während der Hyperoxie verringerte die Hämorrhagie, sodass die Lungen dieser Tiere mit Kontrolltieren unter Raumluf vergleichbar waren (Abb. 13 C). Diesen Ergebnissen folgend stieg der Acute Lung Injury Score (ALI-Score), der die Wanddicke, Infiltrate und Hämorrhagie zusammenfassend bewertet, in der Hyperoxie auf das etwa 2,5-fache des Kontrollwertes an und sank mit der Gabe von NaHS um 44 % ab (Abb. 13 D).

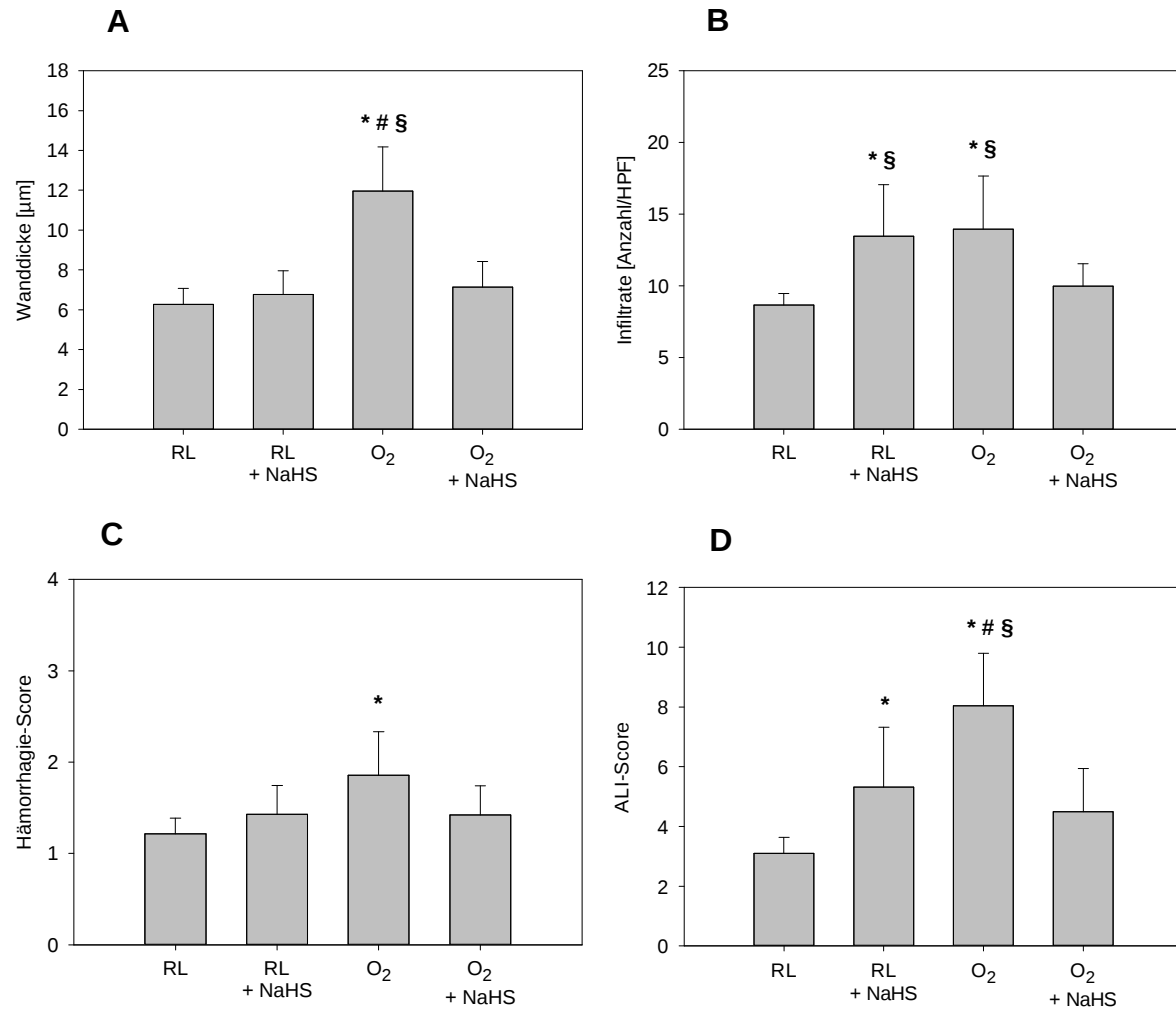


Abb. 13: Die Quantifizierung des Effekts von Hyperoxie und NaHS-Applikation auf die Lungenstruktur

C57BL/6N Mäuse wurden für 60 Std in Raumluft (RL) oder 88 % O₂ gehalten. Eine Stunde vor Beginn der RL- / O₂-Exposition und in Folge alle 24 Std, wurde Vehikel oder NaHS (10 mg / kg / Tag) intraperitoneal appliziert. Die quantitative Auswertung der Lungenschnitte in HE-Färbung ergab: (A) Dicke der Alveolarwände, (B) zelluläre Infiltrate in den Alveolarwänden, (C) Hämorrhagie, (D) Acute Lung Injury – Score (ALI-Score). Die Daten werden als MW +/- SD dargestellt für $n = 7$ / Gruppe. ANOVA (Student-Newman-Keuls Posthoc Test), * $p < 0,05$ vs. RL, # $p < 0,05$ vs. RL + NaHS, § $p < 0,05$ vs. O₂ + NaHS.

4.2.2 Untersuchung der Signaltransduktionswege

Die unter 4.2.1 beschriebene Reduktion des hyperoxischen Lungenschadens durch exogen zugeführten Schwefelwasserstoff warf die Frage nach dem Wirkmechanismus auf. Deshalb wurde in diesem Abschnitt die Feedbackregulation der endogenen H_2S -Regulation als auch Signaltransduktion redoxsensitiver Proteine in Lungenhomogenisaten untersucht.

4.2.2.1 Der Einfluss der Hyperoxie und NaHS-Applikation auf die endogene H_2S -Regulation

Potenzielle Effekte einer Hyperoxie auf die endogene H_2S -Produktion sind bislang nicht bekannt. Die Abbildungen 14 A+C zeigen repräsentative Western Blots aus Lungengewebe für die Cystathionin- γ -Lyase (CTH) und Cystathionin- β -Synthetase (CBS) und Abb. 14 B+D die Quantifizierung der densitometrischen Auswertung aller Tiere. Weder die Expression von CTH noch die von CBS erschienen durch eine Hyperoxie mit oder ohne Applikation von NaHS wesentlich beeinflusst.

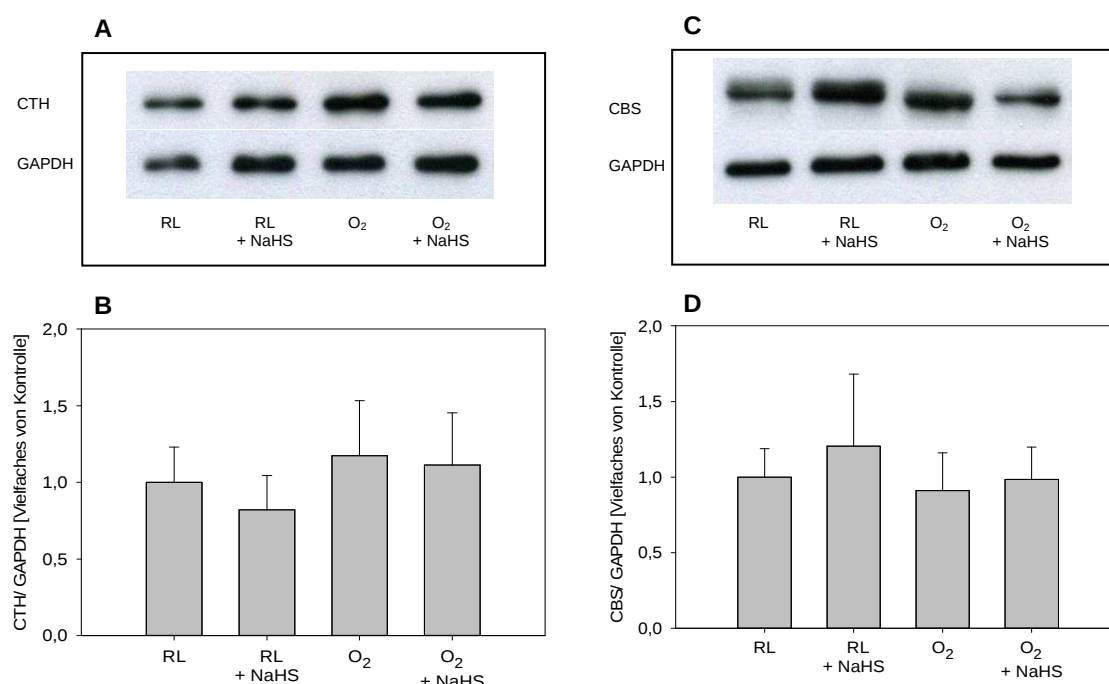


Abb. 14: Der Einfluss der Hyperoxie und NaHS-Applikation auf die Cystathionin- γ -Lyase (CTH) und Cystathionin- β -Synthetase (CBS)

C57BL/6N Mäuse wurden für 60 Std in Raumluft (RL) oder 88 % O₂ gehalten. Eine Stunde vor Beginn der RL- / O₂-Exposition und in Folge alle 24 Std, wurde Vehikel oder NaHS (10 mg / kg / Tag) intraperitoneal appliziert. Der Proteinnachweis mittels Western Blot aus den Lungenhomogenisaten ergab: (A) Repräsentativer Western Blot mit α -CTH Antikörper und Normalisierung mit GAPDH. (B) Quantifizierung der densitometrischen Analyse von CTH (Verhältnis CTH / GAPDH). (C) Repräsentativer Western Blot mit α -CBS Antikörper und Normalisierung mit GAPDH. (D) Quantifizierung der densitometrischen Analyse von CBS (Verhältnis CBS / GAPDH). Die Daten werden als MW $\pm$ SD dargestellt für $n = 8$ / Gruppe. ANOVA. Keine signifikanten Unterschiede.

4.2.2.2 Der Einfluss der Hyperoxie und NaHS-Applikation auf die Hitzeschockproteine

Frühere Studien zeigten, dass die Hämoxigenase-1 (HO-1) und das Hitzeschockprotein 70 (Hsp70) als Zellschutzmechanismen durch eine Hyperoxie induziert und durch eine exogene H₂S-Zufuhr reguliert werden können [33; 67; 96]. In unserem Modell zeigten sich im repräsentativen Western Blot unter der Hyperoxie eine Induktion der HO-1 und eine Repression der HSP70 (Abb. 15 A+C). Die gleichzeitige Gabe von NaHS führte zu keiner weiteren Modulation. Die densitometrische Auswertung aller Versuchstiere bestätigte diese Ergebnisse (Abb 15 B+D).

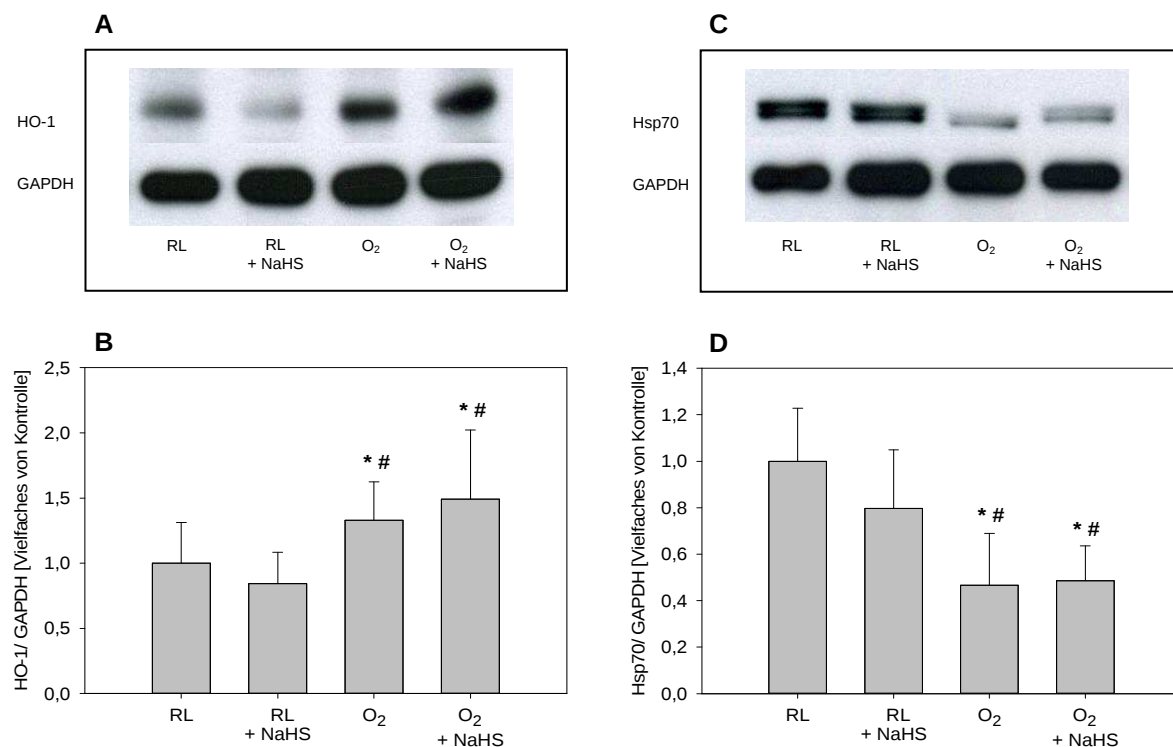


Abb. 15: Der Einfluss der Hyperoxie und NaHS-Applikation auf die Hämoxigenase-1 (HO-1) und das Hitzeschockprotein 70 (Hsp70)

C57BL/6N Mäuse wurden für 60 Std in Raumluft (RL) oder 88 % O₂ gehalten. Eine Stunde vor Beginn der RL- / O₂-Exposition und in Folge alle 24 Std, wurde Vehikel oder NaHS (10 mg / kg / Tag) intraperitoneal appliziert. Der Proteinnachweis mittels Western Blot aus den Lungenhomogenisaten ergab: (A) Repräsentativer Western Blot mit α -HO-1 Antikörper und Normalisierung mit GAPDH. (B) Quantifizierung der densitometrischen Analyse von HO-1 (Verhältnis HO-1 / GAPDH). (C) Repräsentativer Western Blot mit α -Hsp70 Antikörper und Normalisierung mit GAPDH. (D) Quantifizierung der densitometrischen Analyse von Hsp70 (Verhältnis Hsp70 / GAPDH). Die Daten werden als MW $\pm$ SD dargestellt für $n = 8$ / Gruppe. ANOVA (Student-Newman-Keuls Posthoc Test), * $p < 0,05$ vs. RL, # $p < 0,05$ vs. RL + NaHS.

4.2.2.3 Der Einfluss der Hyperoxie und NaHS-Applikation auf die mitogenaktivierten Protein (MAP)-Kinasen

Die MAP-Kinasen sind wesentlich an hyperoxisch regulierten, intrazellulären Signaltransduktionskaskaden beteiligt. H₂S kann auf die Signalwege der MAP-Kinasen regulatorisch wirken [62]. Als potenzielle Modulatoren des oxidativen Schadens wurde die Expression von aktivierten (phosphorylierten) p38-MAPK (pp38), Extracellular-signal Regulated Kinasen (pERK) und c-Jun N-terminale Kinasen (pJNK) untersucht. Die Expression von pp38 nahm in der Hyperoxie deutlich ab. Dies zeigte sich sowohl im repräsentativen Western Blot als auch in der densitometrischen Auswertung aller Proben (Abb. 16 A+B). Diese Reduktion wurde durch die gleichzeitige Behandlung mit NaHS partiell verhindert. Bezüglich pERK und pJNK führte die Hyperoxie zu einer diskreten Induktion der Proteinexpression (Abb. 16 C-F). Eine weitere Modulation durch H₂S konnte nicht beobachtet werden.

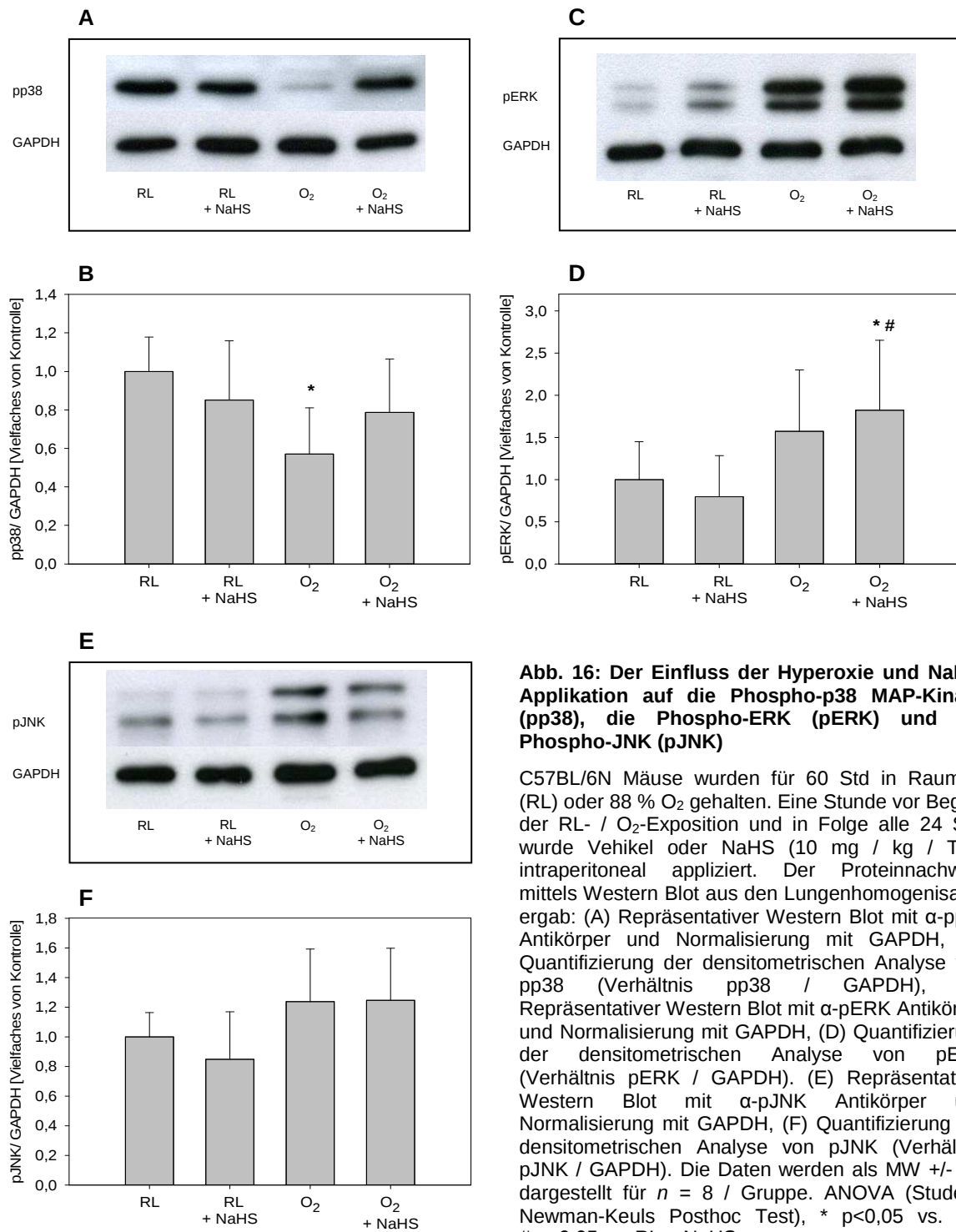


Abb. 16: Der Einfluss der Hyperoxie und NaHS-Applikation auf die Phospho-p38 MAP-Kinase (pp38), die Phospho-ERK (pERK) und die Phospho-JNK (pJNK)

C57BL/6N Mäuse wurden für 60 Std in Raumluft (RL) oder 88 % O₂ gehalten. Eine Stunde vor Beginn der RL- / O₂-Exposition und in Folge alle 24 Std, wurde Vehikel oder NaHS (10 mg / kg / Tag) intraperitoneal appliziert. Der Proteinnachweis mittels Western Blot aus den Lungenhomogenisaten ergab: (A) Repräsentativer Western Blot mit α -pp38 Antikörper und Normalisierung mit GAPDH, (B) Quantifizierung der densitometrischen Analyse von pp38 (Verhältnis pp38 / GAPDH), (C) Repräsentativer Western Blot mit α -pERK Antikörper und Normalisierung mit GAPDH, (D) Quantifizierung der densitometrischen Analyse von pERK (Verhältnis pERK / GAPDH). (E) Repräsentativer Western Blot mit α -pJNK Antikörper und Normalisierung mit GAPDH, (F) Quantifizierung der densitometrischen Analyse von pJNK (Verhältnis pJNK / GAPDH). Die Daten werden als MW $\pm$ SD dargestellt für $n = 8$ / Gruppe. ANOVA (Student-Newman-Keuls Posthoc Test), * $p < 0,05$ vs. RL, # $p < 0,05$ vs. RL + NaHS.

4.2.2.4 Der Einfluss der Hyperoxie und NaHS-Applikation auf die Mangansuperoxiddismutase (SOD2)

Die SOD2 ist ein antioxidatives Enzym, deren vermehrte Expression vor hyperoxiebedingten Lungenschäden potenziell schützen kann [73; 112]. In dem von uns angewendeten Modell wies die SOD2-Expression im Vergleich zu den Kontrolltieren weder eine Veränderungen unter Hyperoxie noch durch eine NaHS-Gabe auf (Abb. 17).

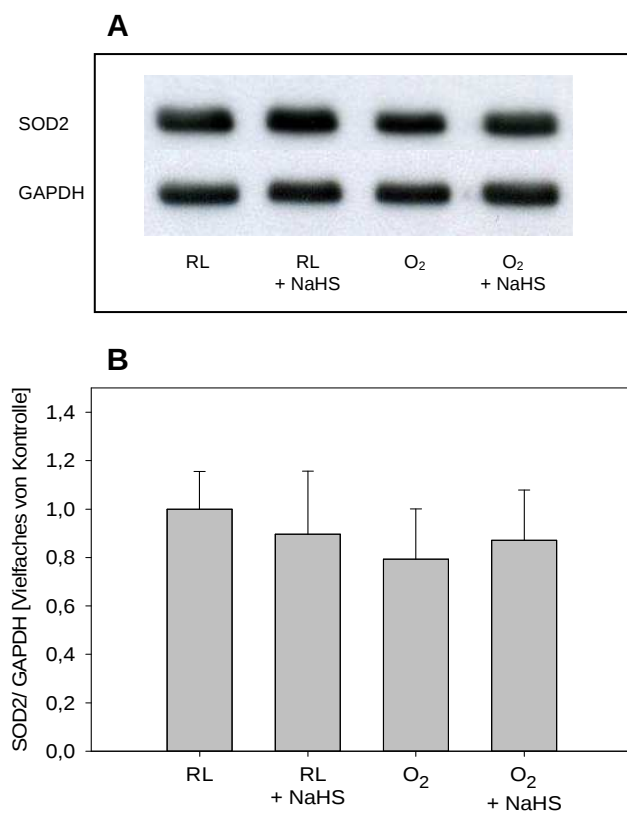


Abb. 17: Der Einfluss der Hyperoxie und NaHS-Applikation auf die Mangansuperoxiddismutase (SOD2)

C57BL/6N Mäuse wurden für 60 Std in Raumluft (RL) oder 88 % O₂ gehalten. Eine Stunde vor Beginn der RL- / O₂-Exposition und in Folge alle 24 Std, wurde Vehikel oder NaHS (10 mg / kg / Tag) intraperitoneal appliziert. Der Proteinnachweis mittels Western Blot aus den Lungenhomogenisaten ergab: (A) Repräsentativer Western Blot mit α -SOD2 Antikörper und Normalisierung mit GAPDH, (B) Quantifizierung der densitometrischen Analyse von SOD2 (Verhältnis SOD2 / GAPDH). Die Daten werden als MW $\pm$ SD dargestellt für $n = 8$ / Gruppe. ANOVA. Keine Signifikanz.

4.2.2.5 Der Einfluss der Hyperoxie und NaHS-Applikation auf Angiopoietin-2 (Ang2)

Angiopoietin 2 nimmt als Signalmolekül bei hyperoxischem Zellschaden eine wichtige Stellung ein [10] und wurde deshalb in diesem Versuchsabschnitt untersucht. In unserem Modell war eine deutliche Hochregulierung der Expression von Ang2 unter hyperoxischen Bedingungen zu beobachten. Dies stellte sich sowohl im repräsentativen Western Blot als auch in der densitometrischen Auswertung aller Versuchstiere dar (Abb 18 A+B). Die gleichzeitige Applikation von NaHS unter der Hyperoxie-Exposition senkte die vermehrte Produktion des Proteins um 42 %.

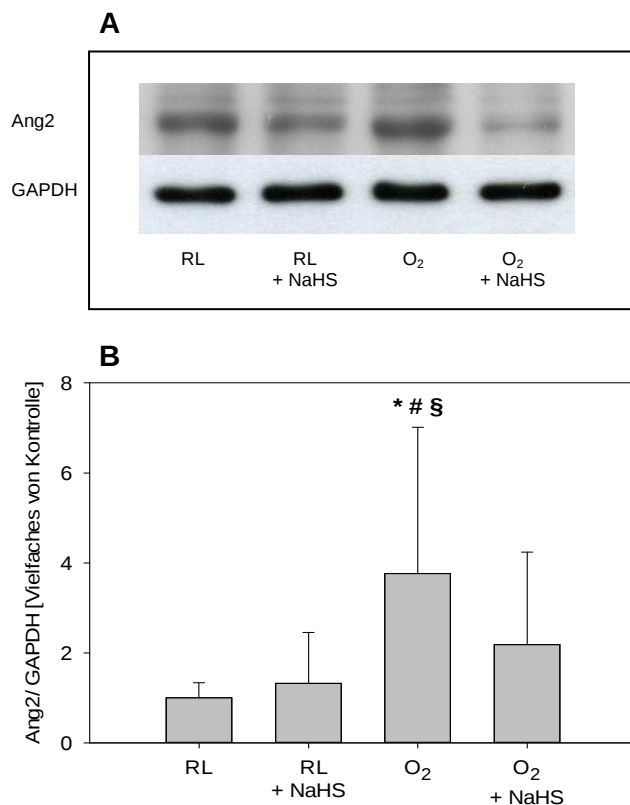


Abb. 18: Der Einfluss der Hyperoxie und NaHS-Applikation auf Angiopoietin-2 (Ang2)

C57BL/6N Mäuse wurden für 60 Std in Raumluft (RL) oder 88 % O₂ gehalten. Eine Stunde vor Beginn der RL- / O₂-Exposition und in Folge alle 24 Std, wurde Vehikel oder NaHS (10 mg / kg / Tag) intraperitoneal appliziert. Der Proteinnachweis mittels Western Blot aus den Lungenhomogenisaten ergab: (A) Repräsentativer Western Blot mit α -Ang2 Antikörper und Normalisierung mit GAPDH, (B) Quantifizierung der densitometrischen Analyse von Ang2 (Verhältnis Ang2 / GAPDH). Die Daten werden als MW $\pm$ SD dargestellt für $n = 8$ / Gruppe. ANOVA (Student-Newman-Keuls Posthoc Test), * $p < 0,05$ vs. RL, # $p < 0,05$ vs. RL + NaHS, § $p < 0,05$ vs. O₂ + NaHS.

4.2.2.6 Der Einfluss der Hyperoxie und NaHS-Applikation auf die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Die Ergebnisse aus Abschnitt 4.2.2.5 legten den Verdacht nahe, dass die Bildung reaktiver Sauerstoffmoleküle durch NaHS beeinflussbar sein könnte. Mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie wurden Dihydroethidium-gefärbte Lungenschnitte auf ihre Superoxid-Anionen-Produktion hin untersucht. Hierbei zeigte sich in den exemplarisch dargestellten Lungenschnitten und im Vergleich zu den Kontrolltieren eine deutlich höhere Fluoreszenzreaktion bei den Tieren nach Hyperoxiebehandlung (Abb 19 A-C). Eine NaHS-Applikation senkte die Detektionsreaktion auf Kontrollniveau (Abb. 19 D). Die quantitative Intensitätsmessung aller Versuchstiere bestätigte diese Ergebnisse. NaHS verhinderte die ROS-Produktion in der Hyperoxie (Abb 20).

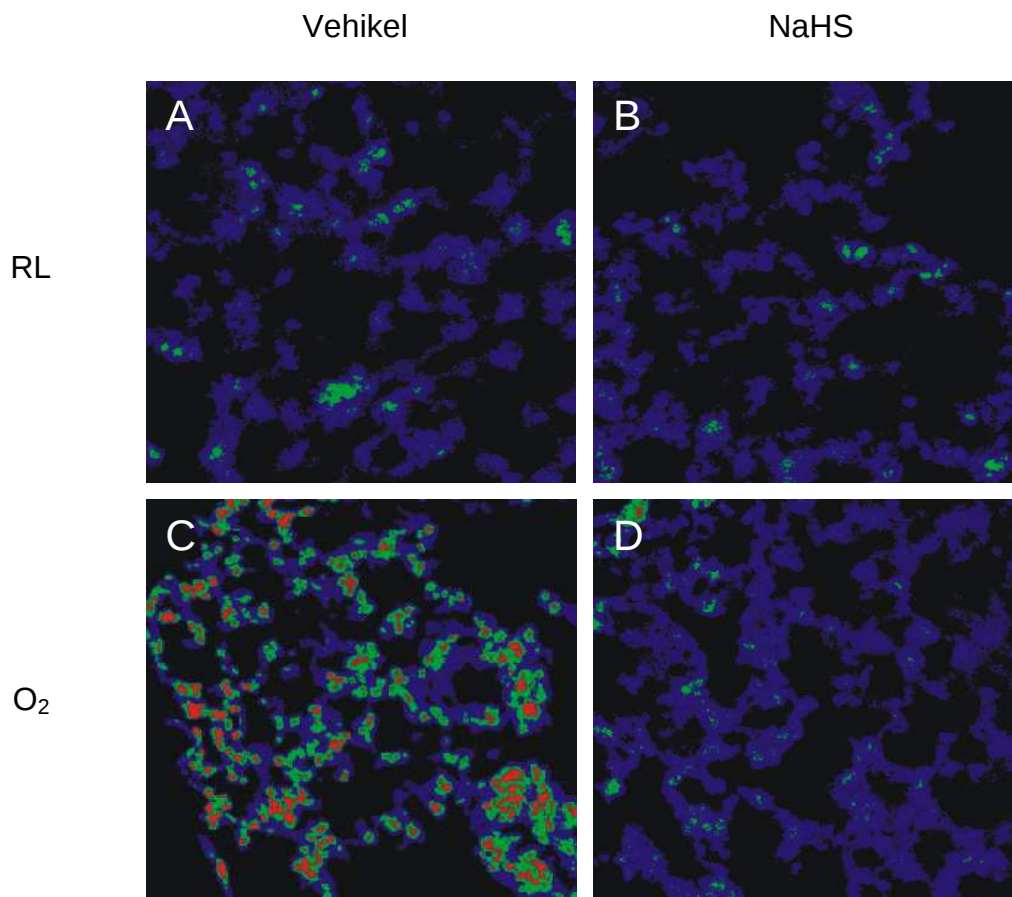


Abb. 19: Exemplarischer Nachweis von Superoxid-Anionen

C57BL/6N Mäuse wurden für 60 Std in Raumluft (RL) oder 88 % O₂ gehalten. Eine Stunde vor Beginn der RL- / O₂-Exposition und in Folge alle 24 Std, wurde Vehikel oder NaHS (10 mg / kg / Tag) intraperitoneal appliziert. Die Fluoreszenzreaktion von Superoxid-Anionen wurde auf Dihydroethidium-gefärbten Lungenschnitten mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop bei einer Laser Line von 543 nm und mit einem long-pass Filter von 560 nm gemessen. Die Abbildung zeigt repräsentative Bilder von (A) RL-Kontrolle, (B) RL + NaHS, (C) Hyperoxie-Kontrolle, (D) Hyperoxie + NaHS.

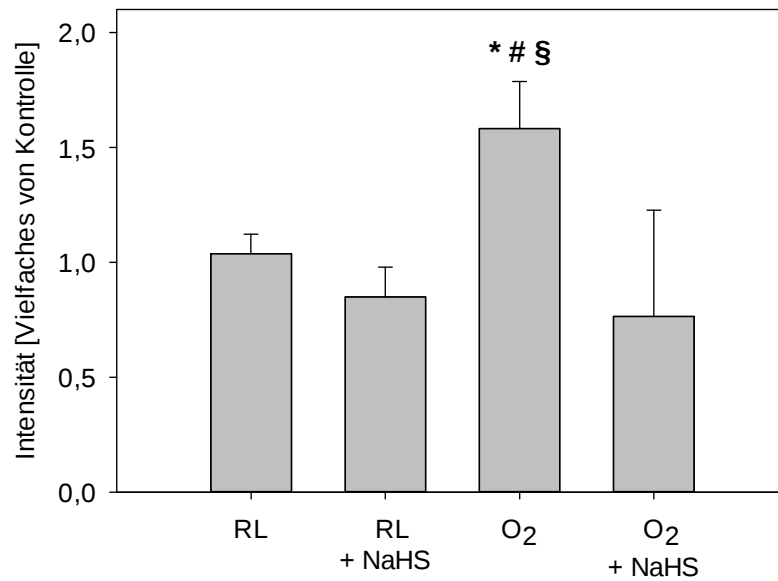


Abb. 20: Quantitativer Nachweis von Superoxid-Anionen

C57BL/6N Mäuse wurden für 60 Std in Raumluft (RL) oder 88 % O₂ gehalten. Eine Stunde vor Beginn der RL- / O₂-Exposition und in Folge alle 24 Std, wurde Vehikel oder NaHS (10 mg / kg / Tag) intraperitoneal appliziert. Die Fluoreszenzreaktion der Superoxid-Anionen wurde auf Dihydroethidium-gefärbten Lungenschnitten mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop bei einer Laser Line von 543 nm und mit einem long-pass Filter von 560 nm gemessen. Die Daten werden als MW +/- SD dargestellt für $n = 4$ / Gruppe. ANOVA (Student-Newman-Keuls Posthoc Test), * $p < 0,05$ vs. RL, # $p < 0,05$ vs. RL + NaHS, § $p < 0,05$ vs. O₂ + NaHS.

Modell 2: Lipopolysaccharid-induzierter Lungenschaden

4.3 Etablierung eines in vivo Modells zur Behandlung des inflammatorischen Lungenschadens mit H₂S

4.3.1 Pulmonale Entzündungszeichen nach intranasaler LPS-Applikation

Unter der Zielvorstellung einen moderaten inflammatorischen Lungenschaden zu provozieren, wurde in diesem Versuchsabschnitt eine Dosiskinetik erstellt. Hier wurde, in Anlehnung an frühere Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe, ein resultierender Anteil neutrophiler Zellen in der BAL von 20 - 30 % angestrebt.

Nach einer Gabe von 250 ng LPS pro Versuchstier enthielt die BAL 84 +/- 3 % neutrophile Zellen (Abb. 21 A). Mit geringeren LPS-Konzentrationen sank die Anzahl der neutrophilen Granulozyten. Bei einer LPS-Dosis von 0,25 ng lag ihr Anteil mit 25 +/- 6 % im beabsichtigten Zielbereich und wurde deshalb für die weiteren Versuche gewählt. Der Gesamtproteingehalt der BAL sank mit abnehmender LPS-Menge ebenfalls und lag bei 0,25 ng LPS bei 0,18 mg / ml (Abb. 21 B). Bei diesem Pilotversuch, der eine kleine Anzahl an Versuchstieren pro Gruppe aufwies, konnten keine eindeutigen Veränderungen der Gesamtzellzahl festgestellt werden (Abb. 21 C).

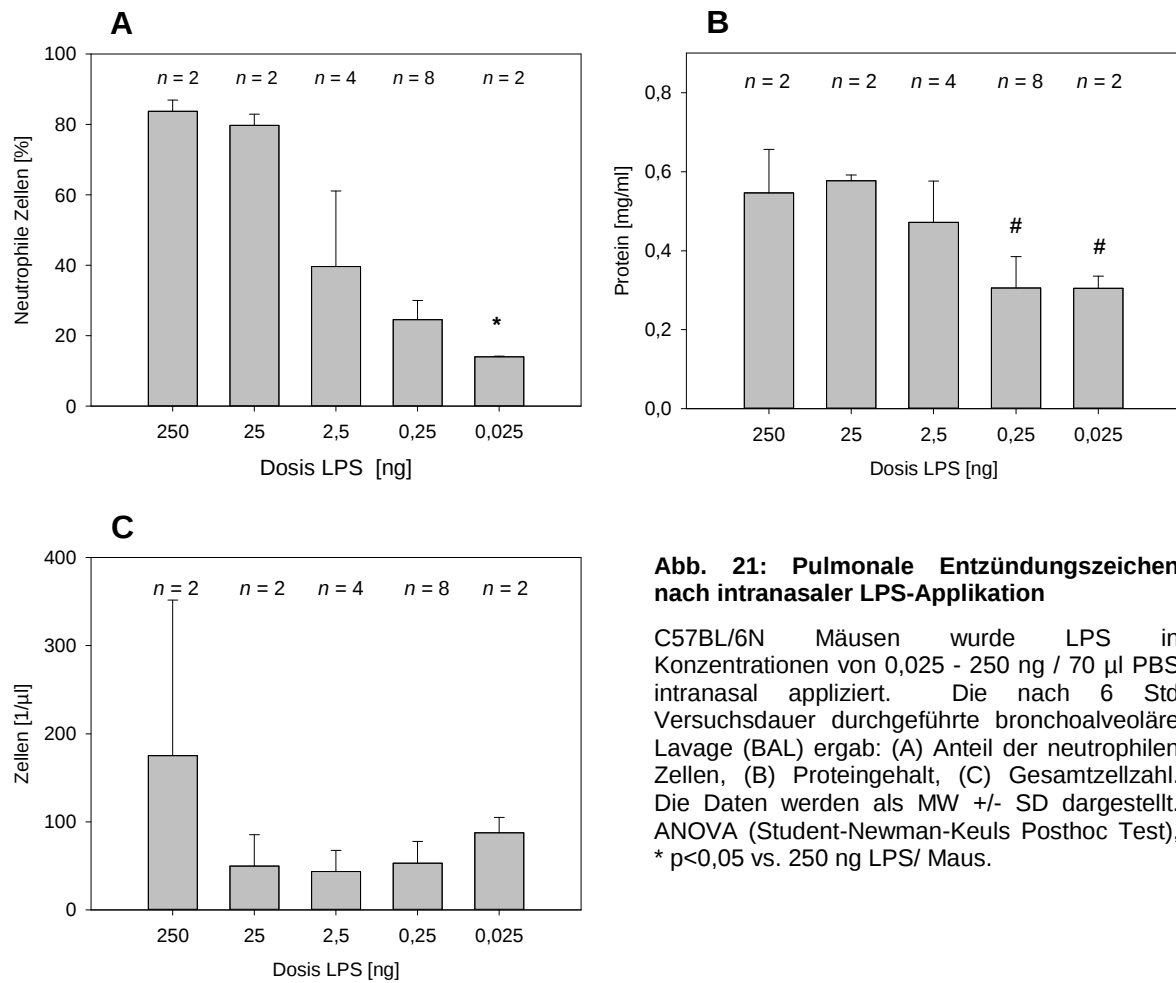


Abb. 21: Pulmonale Entzündungszeichen nach intranasaler LPS-Applikation

C57BL/6N Mäusen wurde LPS in Konzentrationen von 0,025 - 250 ng / 70 μ l PBS intranasal appliziert. Die nach 6 Std Versuchsdauer durchgeführte bronchoalveoläre Lavage (BAL) ergab: (A) Anteil der neutrophilen Zellen, (B) Proteingehalt, (C) Gesamtzellzahl. Die Daten werden als MW $\pm$ SD dargestellt. ANOVA (Student-Newman-Keuls Posthoc Test), * $p < 0,05$ vs. 250 ng LPS/ Maus.

4.4 In vivo Modell: Pulmonale Effekte von H₂S auf den LPS-induzierten Lungenschaden

Die weiteren Versuche zum Effekt von Schwefelwasserstoff auf inflammatorischen Lungenschaden wurden mit der aus der Dosiskinetik ermittelten Konzentration von 0,25 ng LPS pro Versuchstier, unter der Annahme eine moderate pulmonale Entzündungsreaktion hervorzurufen, durchgeführt.

4.4.1 Der Einfluss von H₂S auf den LPS-induzierten Lungenschaden

4.4.1.1 Der Effekt der LPS-Applikation und H₂S-Gabe auf die neutrophilen Zellen, die Proteinkonzentration und die Gesamtzellzahl in der BAL

Nach der Instillation von 0,25 ng LPS stieg der Anteil an neutrophilen Zellen in der BAL von 4,6 +/- 4,1 % nach Vehikelgabe auf 24,5 +/- 5,5 % nach LPS-Applikation an (Abb. 22 A). Die Behandlung mit H₂S verhinderte trotz LPS-Gabe einen Anstieg der neutrophilen Granulozyten. Durch die LPS-Applikation zeigte sich der in der BAL gemessene Gesamtproteingehalt vermindert (Abb 22 B). Im Gegensatz hierzu konnte unter kontinuierlicher H₂S-Inhalation eine Erhöhung der BAL-Proteinkonzentration festgestellt werden, die sowohl unter Kontrollbedingungen (Vehikel-Gabe) als auch nach LPS-Gabe zu verzeichnen war. Die Gesamtzellzahl wurde weder durch die LPS-Gabe noch durch die H₂S-Behandlung moduliert (Abb. 22 C).

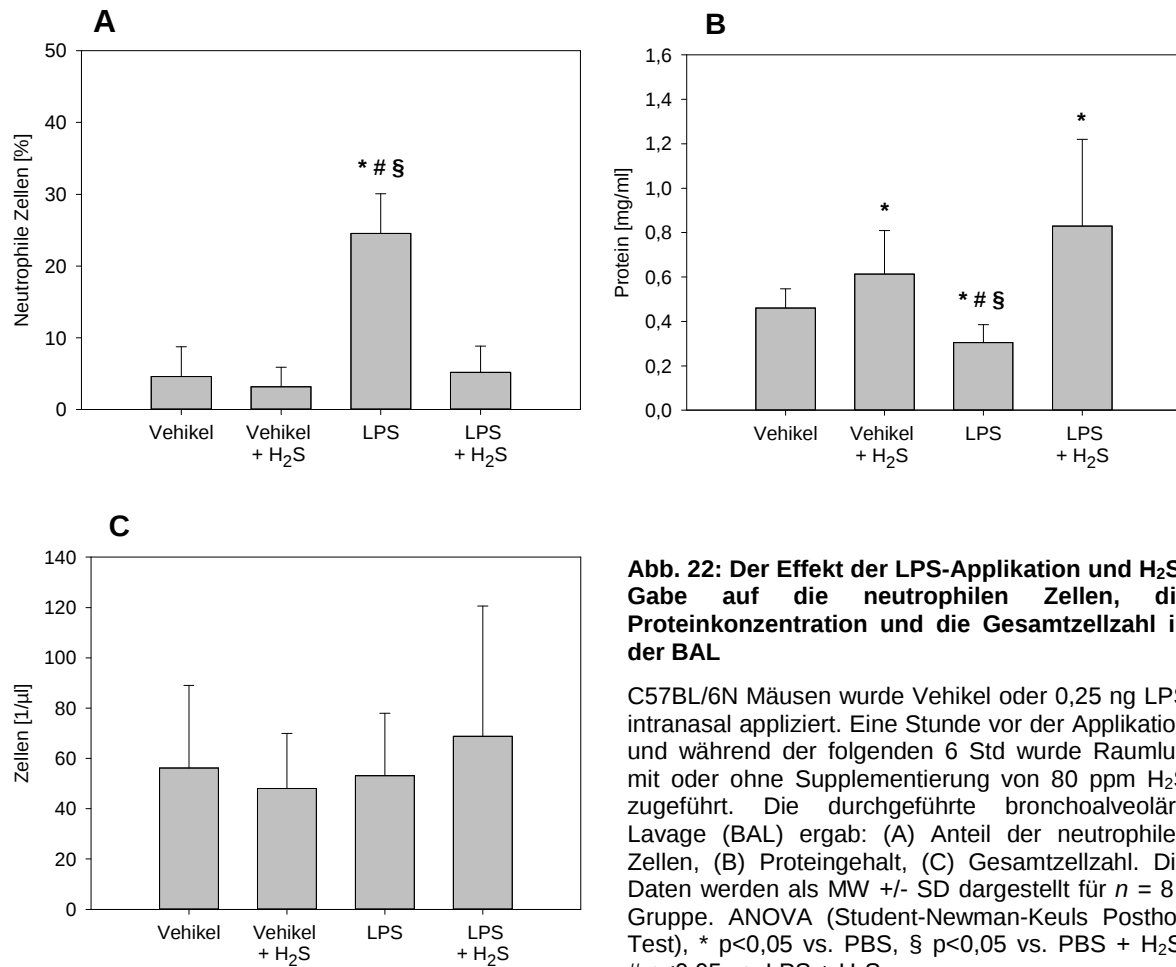


Abb. 22: Der Effekt der LPS-Applikation und H₂S-Gabe auf die neutrophilen Zellen, die Proteinkonzentration und die Gesamtzellzahl in der BAL

C57BL/6N Mäusen wurde Vehikel oder 0,25 ng LPS intranasal appliziert. Eine Stunde vor der Applikation und während der folgenden 6 Std wurde Raumluft mit oder ohne Supplementierung von 80 ppm H₂S zugeführt. Die durchgeführte bronchoalveoläre Lavage (BAL) ergab: (A) Anteil der neutrophilen Zellen, (B) Proteingehalt, (C) Gesamtzellzahl. Die Daten werden als MW +/- SD dargestellt für $n = 8$ / Gruppe. ANOVA (Student-Newman-Keuls Posthoc Test), * $p < 0,05$ vs. PBS, § $p < 0,05$ vs. PBS + H₂S, # $p < 0,05$ vs. LPS + H₂S.

4.4.1.2 Der Effekt der LPS-Applikation und H₂S-Gabe auf das Interleukin-1 β (IL-1 β) und das Macrophage Inflammatory Protein 2 (MIP-2) in der BAL

Die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und MIP-2 wurden als weitere Parameter für eine potenziell entzündungshemmende Wirkung von H₂S herangezogen. IL-1 β war in den Kontrollgruppen nicht detektierbar (Abb. 23 A). Durch die LPS-Instillation zeichnete sich in der BAL eine deutliche Erhöhung des IL-1 β ab, die durch die gleichzeitige H₂S-Exposition vor und nach der LPS-Gabe verhindert wurde. Die BAL-Konzentration von MIP-2 zeigte ebenfalls nach LPS-Gabe eine markante Zunahme, die unter der H₂S-Inhalation signifikant abnahm (Abb. 23 B).

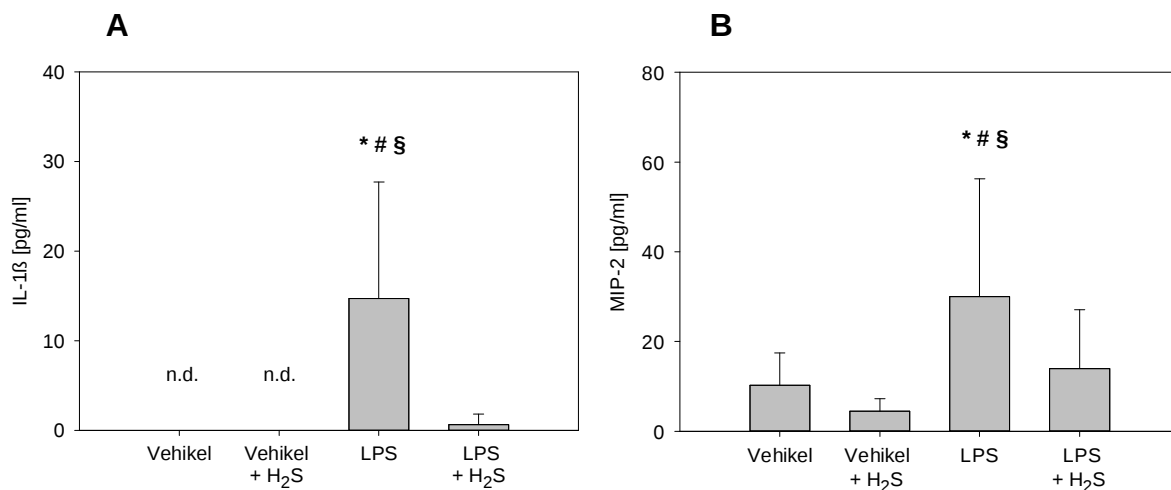


Abb. 23: Der Effekt der LPS-Applikation und H₂S-Gabe auf das Interleukin-1 β (IL-1 β) und das Macrophage Inflammatory Protein 2 (MIP-2) in der BAL

C57BL/6N Mäusen wurde intranasal Vehikel oder 0,25 ng LPS / 70 μ l PBS appliziert. Eine Stunde vor der Applikation und während der folgenden 6 Std wurde Raumluft mit oder ohne Supplementierung von 80 ppm H₂S zugeführt. In der durchgeführten bronchoalveolären Lavage (BAL) wurde der Gehalt von (A) IL-1 β und (B) MIP-2 mittels ELISA bestimmt. Die Daten werden als MW $\pm$ SD dargestellt für $n = 7$ / Gruppe. n.d. nicht detektierbar. ANOVA (Student-Newman-Keuls Posthoc Test), * $p < 0,05$ vs. Vehikel, # $p < 0,05$ vs. Vehikel + H₂S, § $p < 0,05$ vs. LPS + H₂S.

4.4.1.3 Der Effekt der LPS-Applikation und H₂S-Gabe auf die Lungenstruktur

Die oben beschriebene H₂S-vermittelte Reduktion neutrophiler Zellen und proinflammatorischer Zytokine in der BAL ließ die Frage zu, ob die Schwefelwasserstoff-Gabe auch zu einem histologisch sichtbaren Schutzeffekt im Lungengewebe führt. Die Abbildung 24 zeigt repräsentative, HE-gefärbte Lungenschnitte. Bei Kontrolltieren mit Raumluft- oder H₂S-Behandlung war die Lungenstruktur mit dünnen alveolären Septen und wenigen zellulären Infiltraten unauffällig (Abb. 24 A+B). Die LPS-Applikation führte zu verdickten Alveolarwänden, kleinen und unregelmäßigen Alveolen, sowie zu hämorrhagischen und zellulären Infiltraten (Abb. 24 C). Im Gegensatz dazu zeigten sich diese Veränderungen bei LPS-Instillation und kontinuierlicher H₂S-Behandlung nicht, sondern eine mit den Kontrolltierlungen vergleichbare Lungenstruktur (Abb. 24 D).

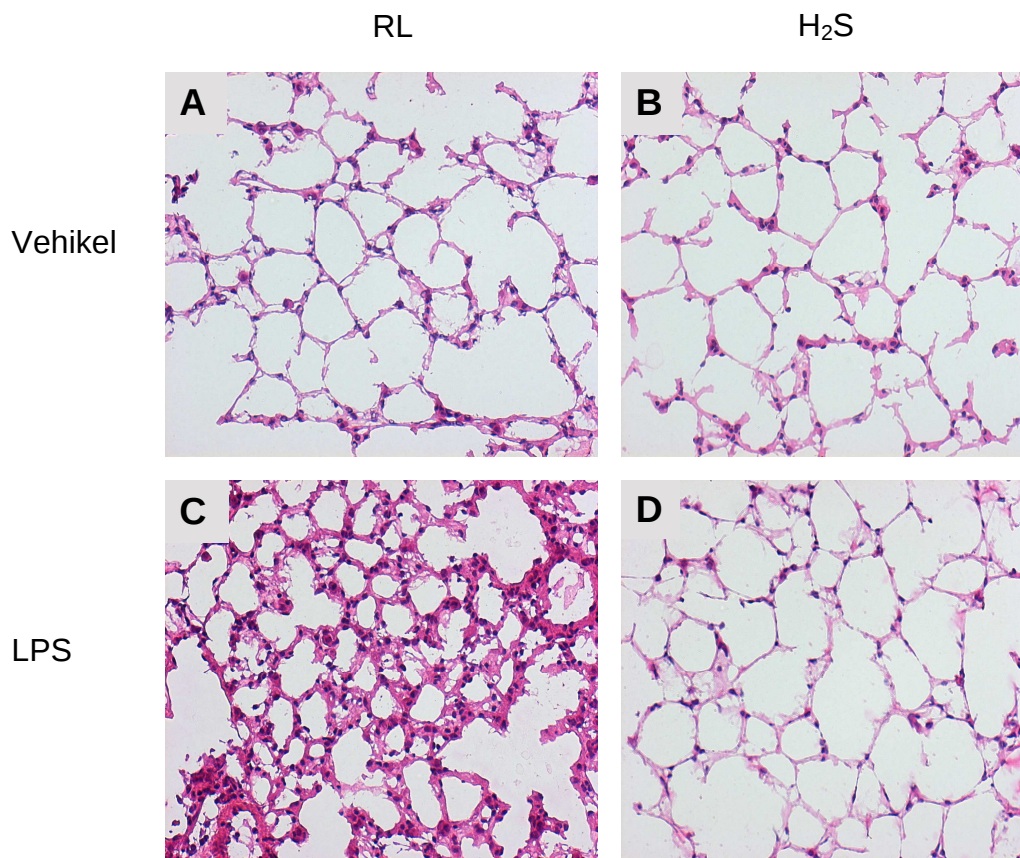


Abb. 24: Der Effekt der LPS-Applikation und H₂S-Gabe auf die Lungenstruktur

C57BL/6N Mäusen wurde intranasal Vehikel oder 0,25 ng LPS / 70 µl PBS appliziert. Eine Stunde vor der Applikation und während der folgenden 6 Std wurde Raumluft mit oder ohne Supplementierung von 80 ppm H₂S zugeführt. Gezeigt werden repräsentative, lichtmikroskopische Bilder der HE-gefärbten Lungenschnitten in 200-facher Vergrößerung von (A) Vehikel + Raumluft, (B) Vehikel + 80 ppm H₂S, (C) LPS + Raumluft, (D) LPS + 80 ppm H₂S.

4.4.1.4 Die Quantifizierung des Effekts der LPS-Applikation und H₂S-Gabe auf die Lungenstruktur

Die quantitative Analyse der histologischen Ergebnisse ergab eine signifikante Verbreiterung der alveolären Wanddicke nach LPS-Instillation, welche sich durch die Inhalation von H₂S gänzlich verhindern ließ (Abb. 25 A). Die LPS-Gabe bewirkte zudem einen deutlichen Anstieg der zellulären und hämorrhagischen Infiltrate, welche durch die H₂S-Applikation und trotz einer LPS-Instillation auf Kontrollniveau gesenkt wurde (Abb. 25 B+C). Diesen Ergebnissen folgend stieg der Acute Lung Injury Score (ALI-Score) nach der Gabe von LPS auf das 3-fache des Kontrollwertes und verblieb unter gleichzeitiger H₂S-Behandlung auf dem Kontrollniveau (Abb. 25 D).

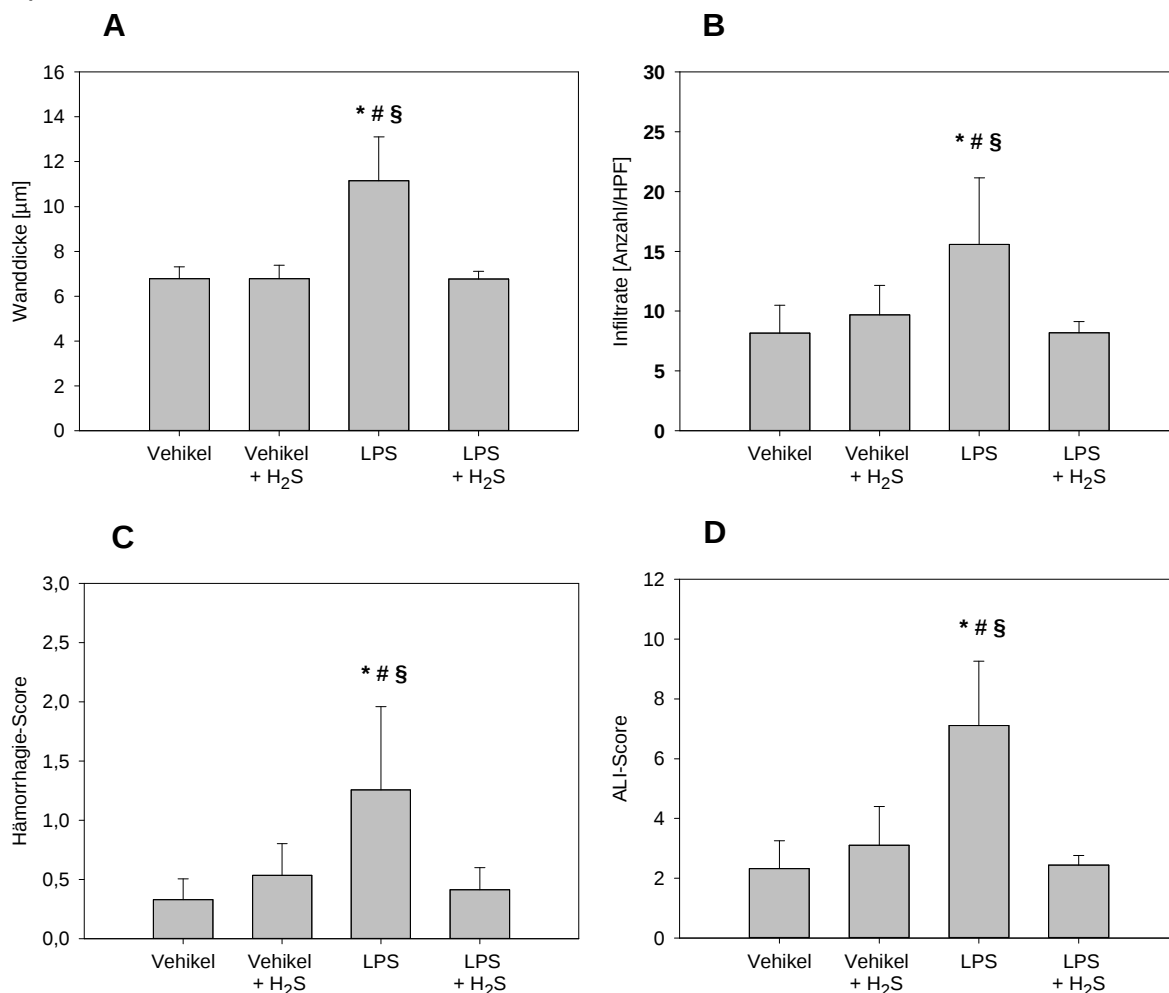


Abb. 25: Die Quantifizierung des Effekts der LPS-Applikation und H₂S-Gabe auf die Lungenstruktur

C57BL/6N Mäusen wurde intranasal Vehikel oder 0,25 ng LPS / 70 µl PBS appliziert. Eine Stunde vor der Applikation und während der folgenden 6 Std wurde Raumluft mit oder ohne Supplementierung von 80 ppm H₂S zugeführt. Die quantitative Auswertung der Lungenschnitte ergab: (A) Dicke der Alveolarwände, (B) zelluläre Infiltrate in den Alveolarwänden, (C) Hämorrhagie, (D) Acute Lung Injury - Score (ALI-Score). Die Daten werden als MW +/- SD dargestellt für $n = 7$ / Gruppe. ANOVA (Student-Newman-Keuls Posthoc Test), * $p < 0,05$ vs. Vehikel, # $p < 0,05$ vs. Vehikel + H₂S, § $p < 0,05$ vs. LPS + H₂S.

4.4.2 Untersuchung der Signaltransduktionswege

Als ein weiteres Ziel dieser Arbeit sollten einige Signaltransduktionswege untersucht werden, die mit H_2S potenziell interagieren und eine Rolle bei der antiinflammatorischen Wirkung des Gases spielen könnten.

4.4.2.1 Der Einfluss der LPS-Applikation und H_2S -Gabe auf die endogene H_2S -Regulation

Die Enzyme der endogenen H_2S -Produktion CTH und CBS regulieren den H_2S -Spiegel im Körper und können durch entzündlichen Prozesse moduliert werden [46; 61]. Nach unseren Ergebnissen zeigte weder die Instillation von LPS noch die Behandlung mit H_2S eine Modifikation der Expression von CTH im Lungengewebe (Abb. 26 A+B). Hinsichtlich der Expression von CBS, konnte eine diskrete Induktion durch eine LPS-Gabe beobachtet werden. Die zusätzliche Inhalation von H_2S hingegen senkte die CBS-Expression deutlich (Abb. 26 C+D).

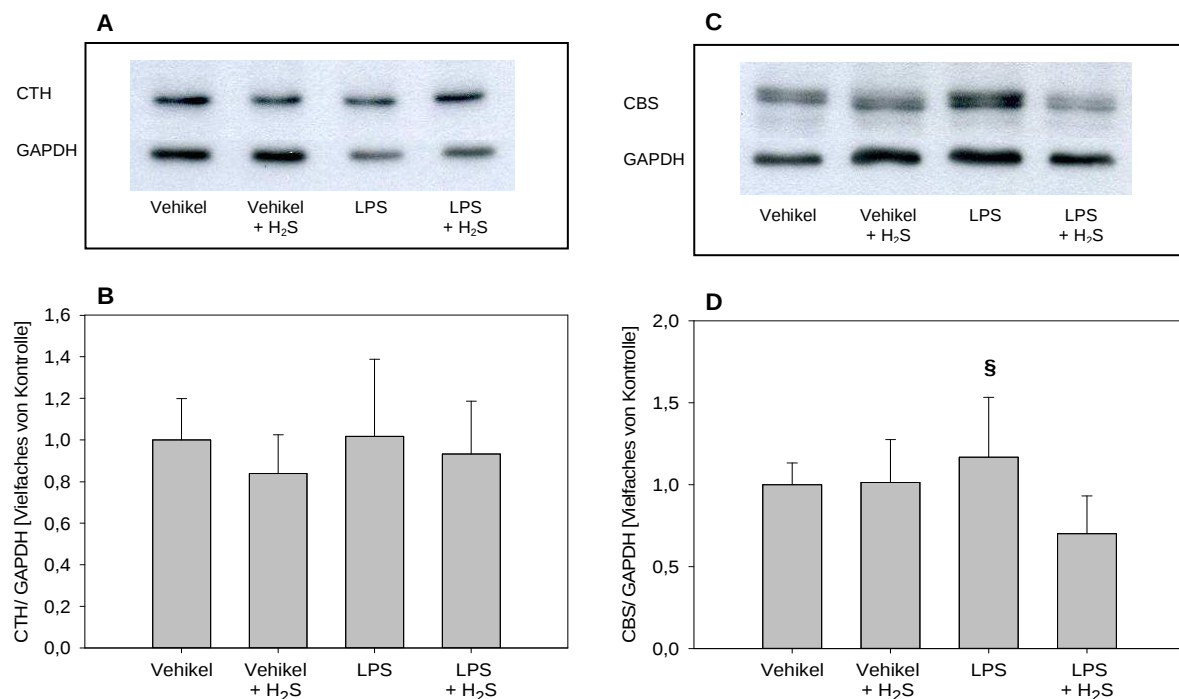


Abb. 26: Der Einfluss der LPS-Applikation und H_2S -Gabe auf die Cystathionin- γ -Lyase (CTH) und Cystathionin- β -Synthetase (CBS)

C57BL/6N Mäusen wurde intranasal Vehikel oder 0,25 ng LPS / 70 μ l PBS appliziert. Eine Stunde vor der Applikation und während der folgenden 6 Std wurde Raumluft mit oder ohne Supplementierung von 80 ppm H_2S zugeführt. Der Proteinnachweis mittels Western Blot aus den Lungenhomogenisaten ergab: (A) Repräsentativer Western Blot mit α -CTH Antikörper und Normalisierung mit GAPDH. (B) Quantifizierung der densitometrischen Analyse von CTH (Verhältnis CTH / GAPDH). (C) Repräsentativer Western Blot mit α -CBS Antikörper und Normalisierung mit GAPDH. (D) Quantifizierung der densitometrischen Analyse von CBS (Verhältnis CBS / GAPDH). Die Daten werden als MW $\pm$ SD dargestellt für $n = 6$ / Gruppe. ANOVA (Student-Newman-Keuls Posthoc Test), § $p < 0,05$ vs. LPS + H_2S .

4.4.2.2 Der Einfluss der LPS-Applikation und H₂S-Gabe auf die Hitzeschockproteine

Die Induktion der Hitzeschockproteine HO-1 und Hsp70 stellen einen gewissen Schutz vor der Entwicklung eines LPS-induzierten Lungenschadens dar [41; 118]. Frühere Studien deuten zudem darauf hin, dass H₂S induzierte antiinflammatorische Effekte über den HO-1 Signalweg vermittelt sein könnten [76; 86]. In unserem Modell waren keine wesentlichen Änderungen der HO-1-Expression nach LPS-Gabe zu detektieren, unabhängig ob H₂S inhaliert wurde oder nicht (Abb. 27 A+B). Die Expression des Hsp70-Proteins zeigte sich gegenüber der alleinigen LPS-Gabe durch die H₂S-Inhalation um ein Drittel reduziert (Abb. 27 C+D).

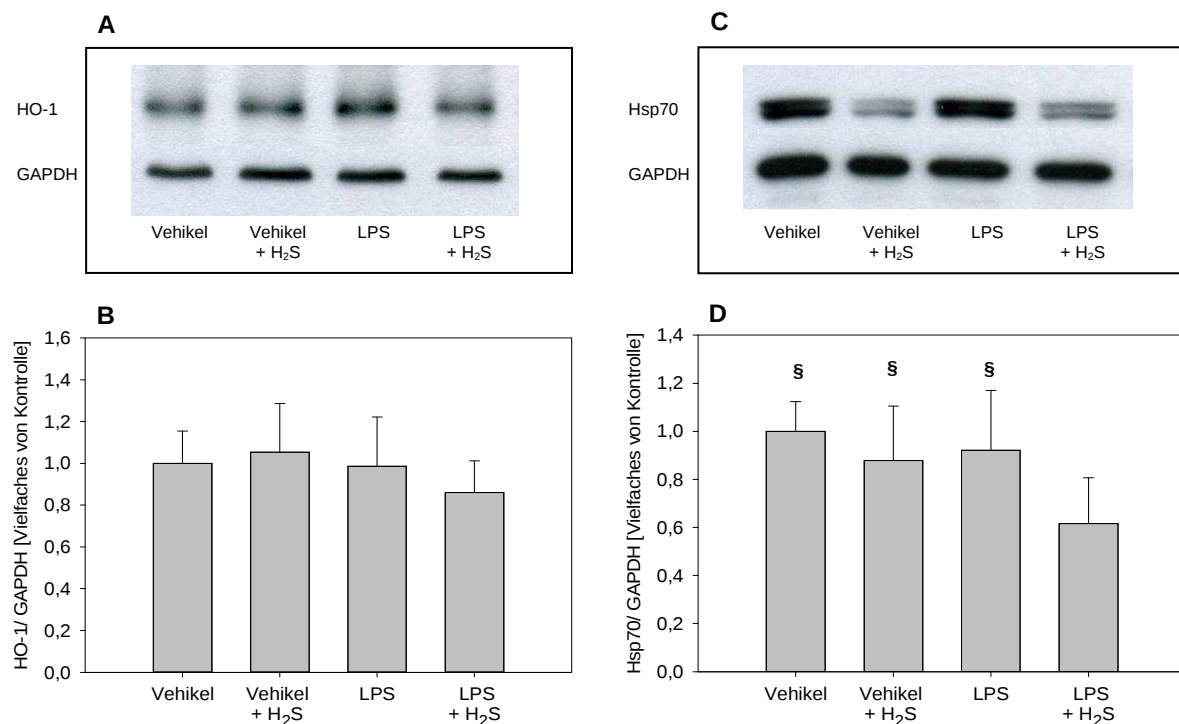


Abb. 27: Der Einfluss der LPS-Applikation und H₂S-Gabe auf die Hämoxygenase 1 (HO-1) und das Hitzeschockprotein70 (Hsp70)

C57BL/6N Mäusen wurde intranasal Vehikel oder 0,25 ng LPS / 70 µl PBS appliziert. Eine Stunde vor der Applikation und während der folgenden 6 Std wurde Raumluft mit oder ohne Supplementierung von 80 ppm H₂S zugeführt. Der Proteinnachweis mittels Western Blot aus den Lungenhomogenisaten ergab: (A) Repräsentativer Western Blot mit α-HO-1 Antikörper und Normalisierung mit GAPDH. (B) Quantifizierung der densitometrischen Analyse von HO-1 (Verhältnis HO-1 / GAPDH). (C) Repräsentativer Western Blot mit α-Hsp70 Antikörper und Normalisierung mit GAPDH. (D) Quantifizierung der densitometrischen Analyse von Hsp70 (Verhältnis Hsp70 / GAPDH). Die Daten werden als MW ± SD dargestellt für $n = 6$ / Gruppe. ANOVA (Student-Newman-Keuls Posthoc Test), § $p < 0,05$ vs. LPS + H₂S.

4.4.2.3 Der Einfluss der LPS-Applikation und H₂S-Gabe auf die mitogenaktivierten Protein (MAP)-Kinasen

MAP-Kinasen stellen relevante Signalmoleküle im Entzündungsgeschehen dar und können durch LPS aktiviert werden [40; 50; 89]. Eine Modellierung der Transduktionswege durch H₂S ist anzunehmen [62]. Deshalb wurde in diesem Abschnitt der Einfluss von exogenem H₂S auf die Expression der aktivierten (phosphorylierten) Formen pp38, pERK und pJNK untersucht. Während die alleinige LPS-Instillation im Vergleich zur Kontrolle keine Unterschiede hervorrief, konnte durch die H₂S-Exposition eine Abnahme der pp38 sowohl unter Kontrollbedingungen als auch nach LPS-Gabe beobachtet werden (Abb. 28 A+B). Hinsichtlich der pERK-Expression zeigte sich lediglich ein Trend zu einer vermehrten Proteinsynthese nach LPS-Gabe, jedoch ohne eine weitere Veränderung durch die H₂S-Exposition (Abb. 28 C+D). Weder die LPS-Gabe noch die H₂S-Inhalation modifizierten nach unseren Ergebnissen das Expressionsmuster der pJNK-MAP-Kinasen (Abb. 28 E+F).

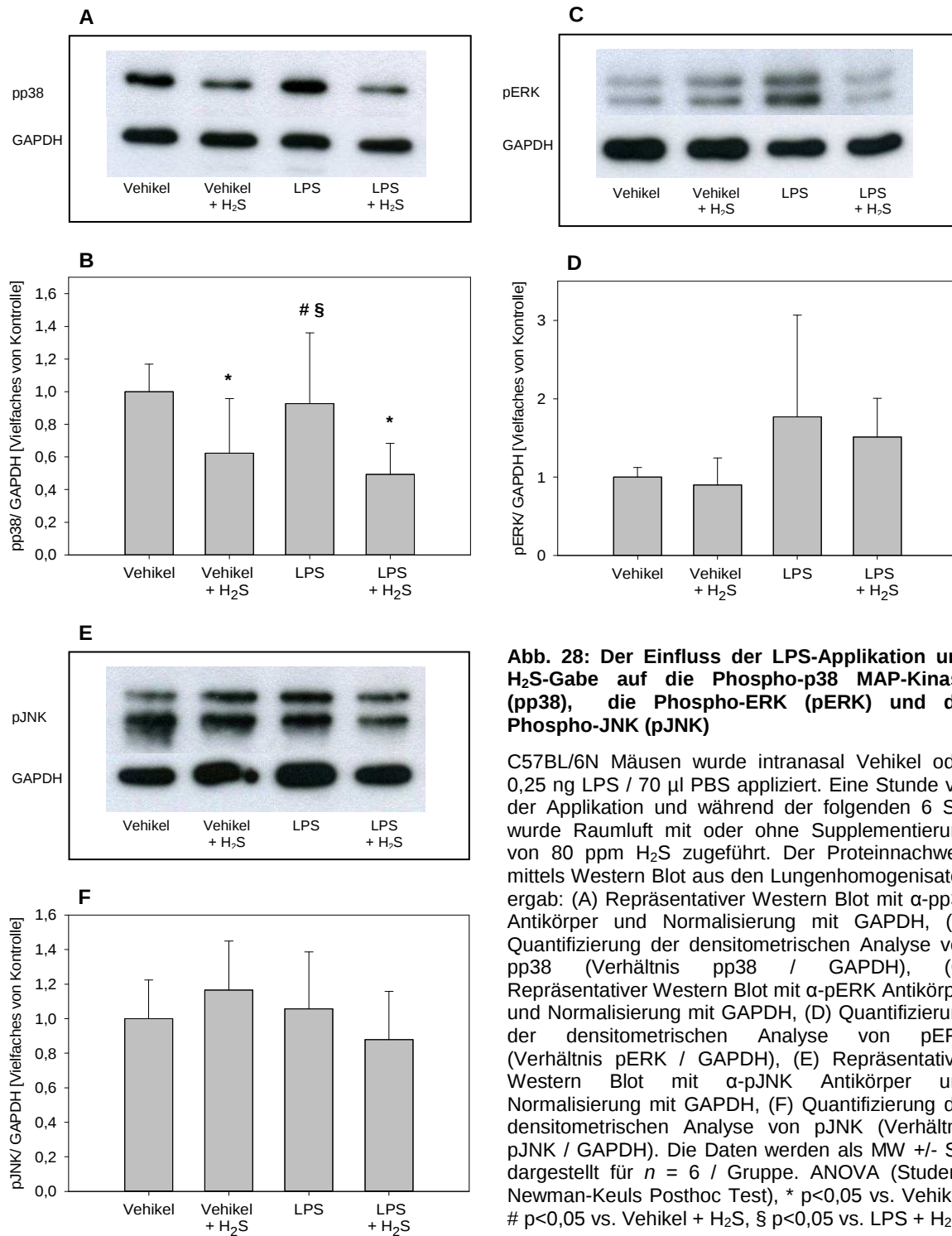


Abb. 28: Der Einfluss der LPS-Applikation und H₂S-Gabe auf die Phospho-p38 MAP-Kinase (pp38), die Phospho-ERK (pERK) und die Phospho-JNK (pJNK)

C57BL/6N Mäusen wurde intranasal Vehikel oder 0,25 ng LPS / 70 µl PBS appliziert. Eine Stunde vor der Applikation und während der folgenden 6 Std wurde Raumluft mit oder ohne Supplementierung von 80 ppm H₂S zugeführt. Der Proteinnachweis mittels Western Blot aus den Lungenhomogenisaten ergab: (A) Repräsentativer Western Blot mit α-pp38 Antikörper und Normalisierung mit GAPDH, (B) Quantifizierung der densitometrischen Analyse von pp38 (Verhältnis pp38 / GAPDH), (C) Repräsentativer Western Blot mit α-pERK Antikörper und Normalisierung mit GAPDH, (D) Quantifizierung der densitometrischen Analyse von pERK (Verhältnis pERK / GAPDH), (E) Repräsentativer Western Blot mit α-pJNK Antikörper und Normalisierung mit GAPDH, (F) Quantifizierung der densitometrischen Analyse von pJNK (Verhältnis pJNK / GAPDH). Die Daten werden als MW ± SD dargestellt für *n* = 6 / Gruppe. ANOVA (Student-Newman-Keuls Posthoc Test), * *p* < 0,05 vs. Vehikel, # *p* < 0,05 vs. Vehikel + H₂S, § *p* < 0,05 vs. LPS + H₂S.

5 Diskussion

Oxidative und inflammatorische Prozesse nehmen in der Pathogenese des akuten Lungenschadens eine wichtige Stellung ein. Deren klinische Behandlungsoptionen müssen bislang als unzureichend eingestuft werden. Bezüglich dieser zwei Pathomechanismen sollte als Ziel dieser Arbeit ein potenziell lungenprotektiver Effekt der exogenen Zufuhr des Gases H_2S untersucht werden. Wie im Folgenden diskutiert, zeigen unsere Ergebnisse klare Evidenz, dass die Applikation von H_2S mit einer antioxidativen und antiinflammatorischen Wirkung verbunden ist und unter experimentellen Bedingungen vor der Ausbildung eines akuten Lungenschadens schützen kann.

5.1 Lungenprotektion durch H_2S bei oxidativem Stress

Wie in der Einleitung erläutert, ist das hyperoxiebedingte ALI durch eine Bildung reaktiver Sauerstoffmoleküle mit nachfolgender Entzündungsreaktion, den Verlust der alveolo-kapillären Barriere und die Ausbildung eines Lungenödems gekennzeichnet [18; 39; 51; 68]. Um dieses klinisch relevante Problem experimentell im Modell darzustellen, wurden nach einer Pilot- und Zeitkinetikuntersuchung Versuchstiere einer 60-stündigen Hyperoxie ausgesetzt. Die Ergebnisse zeigen einen moderaten Lungenschaden, der durch einen deutlichen Anstieg des Gesamtproteins und der Gesamtzellzahl in der BAL sowie durch die Zunahme der alveolären Wanddicke, der zellulären Infiltrate und der Hämorrhagie in den Lungenschnitten imponierte.

Zu beachten gilt in diesem Zusammenhang die fast gänzlich fehlende Rekrutierung neutrophiler Zellen unter hyperoxischen Bedingungen. Diese war weder zu dem o.g., noch zu früheren oder späteren Beobachtungszeitpunkten zu erkennen. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass die ROS-bedingte Entzündungsreaktion oftmals ohne eine Infiltration neutrophiler Zellen und ohne Migration dieser Zellen in den alveolären Raum einhergeht und die Rekrutierung neutrophiler Zellen für die Entwicklung des HALI von untergeordneter Bedeutung zu sein scheint [6; 25; 80; 94].

Im Gegensatz zu den genannten pathologischen Veränderungen durch Hyperoxie belegen unsere Ergebnisse, dass die Applikation des H₂S-Donators NaHS die Ausbildung eines HALI verhindern kann. Hier zeigen sich unter NaHS-Gabe ein vermindertes Gesamtprotein und eine reduzierte Zellzahl in der BAL. Des Weiteren war eine deutliche Reduktion des Lungenschadens im Sinne einer mit Kontrollniveau vergleichbaren alveolären Wanddicke und ALI-Scores zu verzeichnen. Diese Ergebnisse deuten auf eine H₂S-vermittelte Lungenprotektion in der Hyperoxie hin.

Versuchstechnisch bedingt war es nicht möglich, den durch Hyperoxie verursachten Lungenschaden mit gasförmigem H₂S zu behandeln, da H₂S in Sauerstoffkonzentrationen über 21 % chemisch instabil ist. Deshalb wurde alternativ die intraperitoneale Gabe des H₂S-Donators NaHS eingesetzt. Da nach intraperitonealer Injektion NaHS seine maximale Plasmakonzentration nach einer Stunde erreicht [16], wurde die erste NaHS-Injektion eine Stunde vor Beginn der Hyperoxie-Behandlung verabreicht. Ein Wirkspiegel bestand demnach schon zu Beginn der hyperoxischen Lungenschädigung.

Lungenprotektive Effekte von H₂S sind für Lungenschädigungen anderer Genese beschrieben [31; 33]. Sowohl bei Beatmungs- als auch Rauchgas-induziertem Lungenschaden konnte eine Behandlung mit H₂S proinflammatorische Zytokine in der BAL bzw. im Lungengewebe vermindern und den histologisch detektierbaren Schaden verringern [31; 33]. In wie weit ein antioxidativer Effekt von H₂S bei diesen Studien zur Lungenprotektion beitrug, bleibt Spekulation. Unsere Ergebnisse zeigen diesbezüglich erstmalig die antioxidative Wirkung von H₂S beim HALI auf.

5.2 *Potenzielle Wirkmechanismen der Lungenprotektion durch H₂S bei oxidativem Stress*

Mögliche molekulare Mechanismen, die durch H₂S beeinflussbar sind und zudem in der Hyperoxie organprotektive Eigenschaften vermitteln könnten, stellen zum Beispiel Hitzeschockproteine, mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen), Superoxiddismutase (SOD2) und Angiopoietin 2 (Ang2) dar.

a) Die Hitzeschockproteine HO-1 und Hsp70 können bei zellulärer Schädigung aktiviert und in der Folge Schutz vor oxidativem und inflammatorischem Stress vermitteln [43; 44; 93]. Im vorliegenden Versuch führte die Hyperoxie zu einer Induktion des HO-1-Proteins. Diese Ergebnisse werden durch frühere Studien untermauert, in denen eine Hochregulation des Enzyms unter Hyperoxie *in vivo* und *in vitro* gezeigt wurde [58]. Wäre die beobachtete H₂S bedingte Lungenprotektion durch eine Regulation der HO-1 vermittelt, hätte eine weitere Hochregulation stattfinden müssen. Diese zeigte sich nach unseren Ergebnissen nicht. Folglich scheint die Regulation der HO-1 in der Lungenprotektion durch H₂S und bei Hyperoxie eine untergeordnete Stellung einzunehmen. Nicht auszuschließen ist allerdings eine zellspezifische, differenzierte Regulation der HO-1. Denkbar wäre, dass nur in bestimmten Lungenzellen die HO-1 induziert wird [76]. Eine solche differenzielle Regulation wäre in unserem Modell durch die Analyse von Lungenhomogenisaten und damit aller Lungenzelltypen nicht detektierbar gewesen.

Hinsichtlich des Hsp70-Expressionsmusters führte die Hyperoxie eher zu einer Repression. Zum einen ist dieses Ergebnis unerwartet, da eine Überexpression von Hsp70 bei rekombinanten A549 Zellen ein längeres Überleben in der Hyperoxie bewirken kann [114]. Zum anderen wird unser Ergebnis durch eine frühere Studie unterstützt in der bei Rattenlungen eine Veränderung der Hsp70 mRNA nach drei Tagen Hyperoxieexposition ausblieb [47]. Eine mögliche Erklärung wäre ein ungeeigneter Zeitpunkt der Messung für sichtbare Modulationen der Hsp70-Regulation. Zusammengefasst zeigte die Applikation von NaHS keinen Einfluss auf die Hsp70-Expression und spricht deshalb für eine geringe Bedeutung der Hsp70 im H₂S-vermittelten Organschutz.

b) MAPK stellen zentrale Schaltstellen multipler Signaltransduktionswege dar. Eine Hochregulation der MAP-Kinasen unter Hyperoxie wurde vielfach beschrieben [100; 119]. Es scheint von den Versuchsbedingungen abhängig, ob eine hyperoxiebedingte Aktivierung von ERK und JNK den Zellschaden im Lungengewebe vermindert oder verstärkt [72; 88; 100; 125]. In unserem Modell konnte gezeigt werden, dass die Expression von pERK und pJNK in der Hyperoxie zwar leicht zunimmt, eine Behandlung mit H₂S jedoch keinen Einfluss auf ihre

Regulation nimmt. Ihre Vermittlung des lungenprotektiven Effekts von H₂S ist deshalb als unwahrscheinlich zu beurteilen.

Nach unseren Ergebnissen zeigte die pp38 durch die Hyperoxie-Exposition im Lungengewebe eine Herunterregulierung, welche durch die NaHS-Applikation aufgehoben wurde. Auf den ersten Blick verwundert dieses Ergebnis, da in der Lunge bisher nur eine hyperoxiebedingte Hochregulierung der p38 beschrieben wurde [55; 60]. Zudem deuten einige Untersuchungen auf einen positiven Einfluss der pp38 auf die Wundheilung [82] und bezüglich der Isoform p38 α auf die geregelte Differenzierung von Lungenepithelzellen [26; 48] hin. Auf den zweiten Blick werden unsere Beobachtungen durch Daten unterstützt, die der p38 eine Beteiligung an der Signaltransduktion des hyperoxiebedingten Zelltods [67] und Epithelschädigung in der Lunge zuweisen [119]. Da in Endothelzellen eine Inhibition der Phosphorylierung von p38 durch ROS gezeigt werden konnte [42], wäre eine ROS-getriggerte Reduktion der pp38 und deren Limitierung durch H₂S denkbar. Eine schlüssige Erklärung für die Beobachtungen lässt sich dennoch weder aus den eigenen Daten noch aus der Literatur finden und die Bedeutung der pp38 MAPK in der H₂S-vermittelten Protektion bleibt unklar.

c) Die SOD2 nimmt als antioxidatives Enzym einen großen Stellenwert in der Schadensregulierung bei hyperoxiebedingtem Lungenschaden ein [73; 101; 112]. In unseren Versuchen konnte keine Änderung der SOD2-Proteinakkumulation nach 60-stündiger Hyperoxie mit oder ohne H₂S-Behandlung festgestellt werden. Deshalb lässt sich die lungenprotektive Wirkung von H₂S nicht auf eine gesteigerte Expression der SOD2 zurückführen. Ob eine Änderung der antioxidativen Aktivität bei gleich bleibender Enzymmenge eine Rolle spielt, wäre denkbar, wurde allerdings in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht und bleibt Spekulation.

d) Ang2 ist ein Wachstumsfaktor, durch den extrinsische und intrinsische Zelltodfaktoren, wie beispielsweise die Proteine der Bcl-2 Familie und Kaspasen, aktiviert werden können. Eine Hyperoxie scheint Ang2 in Epithelzellen des Luftweges und der Alveolen zu induzieren [10; 11]. Dies soll laut früherer Untersuchungen im Lungengewebe zur Ödembildung, zu Entzündungsreaktionen und in der Folge zu einem vermehrten Gewebeschaden führen (Abb. 29). Der Mechanismus, der zu

einer Hochregulation des Ang2 in der Hyperoxie führt, ist in großen Teilen unklar. Wahrscheinlich triggert die ROS-Bildung eine Ang2-Induktion [57; 59; 77].

In unserem Versuch konnte eine deutliche Akkumulation des Ang2-Proteins unter hyperoxischen Bedingungen nachgewiesen werden. Durch die Behandlung mit H₂S wurde eine signifikante Reduktion der Hyperoxie-induzierten Hochregulierung von Ang2 beobachtet. Es zeigte sich in Analogie eine gesteigerte ROS-Bildung in der Lunge unter hyperoxischen Bedingungen, die durch H₂S weitgehend verhindert wurde. Dieses Ergebnis deckt sich mit der kürzlich gezeigten Abnahme der ROS-Bildung durch H₂S in zwei weiteren Arbeiten [81; 116] und legt die Vermutung nahe, dass bei HALI ein Anstieg der ROS-Produktion die Synthese von Ang2 induziert. Die H₂S bedingte Abnahme der Ang2-Expression könnte entweder indirekt durch eine Hemmung der ROS-Bildung oder durch eine direkte Interaktion mit der Ang2 Synthese erklärt werden (Abb. 29).

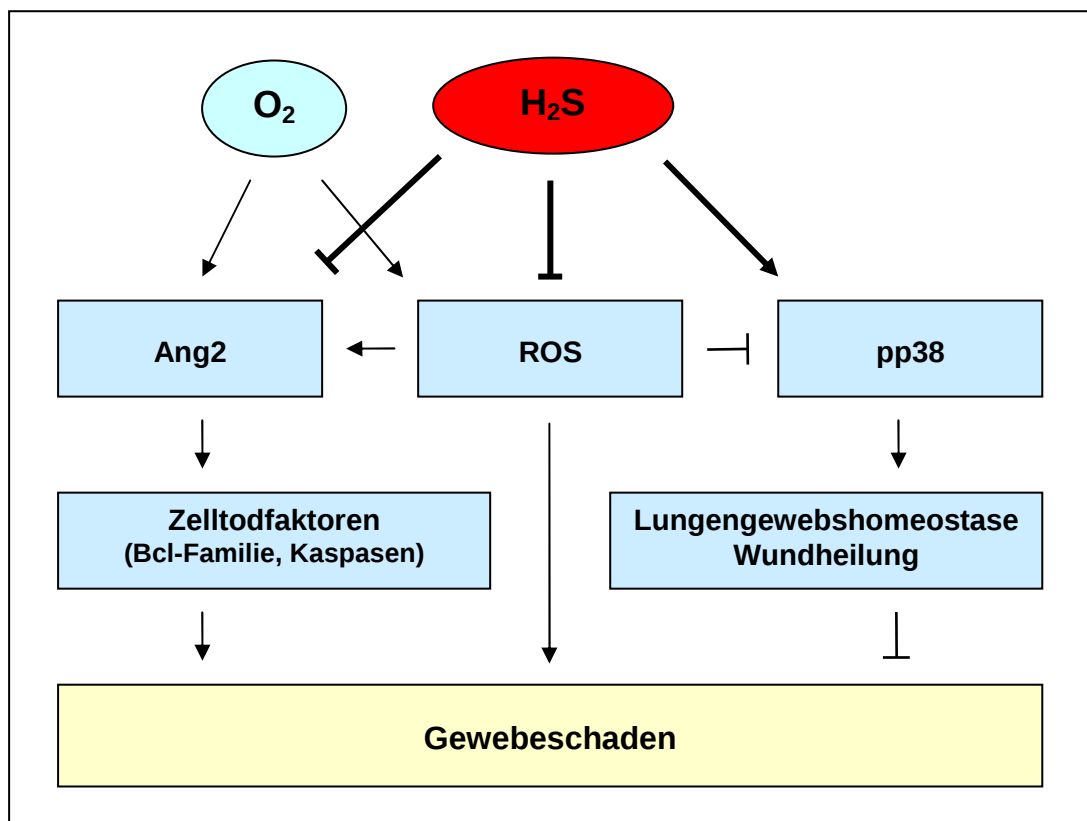


Abb. 29: Potenzielle Wirkmechanismen der Lungenprotektion durch H₂S bei oxidativem Stress

H₂S: Schwefelwasserstoff, ROS: reaktive Sauerstoffspezies, Ang2: Angiopoietin2, pp38: Proteinkinase p38, → aktivierende Wirkung, —| hemmende Wirkung. [10; 26; 59; 82].

5.3 Lungenprotektion durch H₂S bei Inflammation

In dem zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Effekt von H₂S auf den LPS-induzierten Lungenschaden untersucht. Charakteristischerweise war nach der LPS-Inhalation ein deutlicher Anstieg neutrophiler Zellen und der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und MIP-2 in der BAL zu verzeichnen sowie ein histologisch markanter Lungenschaden mit Zunahme der alveolären Wanddicke, der zellulären Infiltrate und der Hämorrhagie nachzuweisen. Unsere Ergebnisse sind somit mit früheren Untersuchungen intratrachealer LPS-Applikation vergleichbar [28; 68; 83; 103].

Unsere Ergebnisse belegen erstmals, dass die Inhalation von H₂S die Ausprägung einer Entzündungsreaktion nach intranasaler LPS-Gabe weitgehend verhindern kann. Diese Aussage stützt sich auf der verminderten Rekrutierung neutrophiler Zellen, Hemmung proinflammatorischer Zytokine und trotz LPS-Gabe eine histologisch nicht mehr nachweisbare Lungenschädigung. Ein vergleichbarer antiinflammatorischer Effekt des Gases konnte in früheren Studien bei beatmungs- bzw. rauchgasassoziiertem oder durch eine systemische Entzündungsreaktion nach Endotoxingabe verursachtem Lungenschaden beobachtet werden [29; 31; 33; 99].

Im Widerspruch zu unseren Ergebnissen stehen die Beobachtungen von Bathia et al.. In diesen Studien führte die Applikation des H₂S-Donators NaHS zu einer inflammatorischen Schädigung der Lunge [16] bzw. aggravierte diese in einem Sepsismodell [123]. Im Gegensatz hierzu zeigte eine andere Arbeitsgruppe eine Abnahme der Bakteriämie und der folgenden Lungenschädigung nach Vorbehandlung mit NaHS [95]. Über die Hintergründe der bestehenden Diskrepanz zwischen den Studien, die unsere eigenen Daten unterstützen, und der vorerwähnten Untersuchung bleibt nur zu spekulieren. Möglicherweise sind hierfür Unterschiede im Modell, der Applikationsform und der verabreichten Konzentration des Gases ausschlaggebend ob ein Schutz oder eine Schädigung der Zelle / des Organs durch die Gasapplikation entsteht.

Eine interessante und schließlich nicht zu klärende Beobachtung zeigte die Proteinmessung in der BAL. Der Proteingehalt in der BAL stellt meist einen Marker für den alveolären Schaden oder Störung der alveolo-kapillären Barriere dar [108]. Unter den präsentierten Bedingungen führte die LPS-Gabe jedoch zu einer

Erniedrigung des Gesamtproteingehaltes, der durch die parallele H₂S-Inhalation deutlich erhöht war. Ob diese Zunahme der Proteinkonzentration möglicherweise eine durch H₂S induzierte Freisetzung antiinflammatorischer Proteine widerspiegelt, ist derzeit noch unklar.

5.4 Potenzielle Wirkmechanismen der Lungenprotektion durch H₂S bei Inflammation

Die intrazellulären Signalwege, anhand derer die antiinflammatorische Wirkung von H₂S erläutert werden könnte, sind bisher nur ansatzweise verstanden. In dieser Arbeit wurden die Hitzeschockproteine und MAP-Kinasen als mögliche Mediatoren des Effekts von H₂S auf den inflammatorischen Lungenschaden untersucht.

a) Eine Induktion der Hitzeschockproteine HO-1 und Hsp70 kann neben den oben erwähnten antioxidativen Effekten auch einen Schutz vor LPS-induzierten Entzündungsreaktionen und inflammatorischem Lungenschaden vermitteln [36; 41; 91; 105; 118]. Zudem wurde in früheren Studien gezeigt, dass die Zufuhr von H₂S die Expression der HO-1 induzieren kann [76; 86]. Folglich wäre es denkbar, dass in dem vorliegenden Modell eine H₂S-induzierte Hochregulation der HO-1 und / oder der Hsp70 den durch LPS verursachten Lungenschaden begrenzen und so die lungenprotektive Wirkung des Gases erklären könnte. Die Auswertung der Lungenhomogenisate in unserem Modell zeigte jedoch keine Änderung der Hsp70- oder HO-1-Expression nach LPS-Gabe. Zudem war unter der zusätzlichen H₂S-Inhalation eher eine verminderte Expression beider Proteine zu verzeichnen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine H₂S-vermittelte Hochregulation von Hitzeschockproteinen als Mechanismus des Organschutzes unwahrscheinlich erscheint.

b) MAP-Kinasen weisen nicht nur eine wesentliche Signalwirkung bei entzündlichen Prozessen auf, sondern können durch H₂S reguliert werden [62]. Der Einfluss von H₂S auf die Aktivierung von ERK und JNK und den nachfolgenden Effekten auf ein Entzündungsgeschehen wird kontrovers diskutiert [38; 78; 127]. In Abhängigkeit der beschriebenen Versuchsmodelle scheint Schwefelwasserstoff ERK und JNK eher zu aktivieren. In unserem Modell zeigen sich weder durch die Instillation von LPS noch

durch die Behandlung mit H₂S Veränderungen der Expression von pERK oder pJNK. Für diese zwei MAP-Kinasen kann demnach kein Zusammenhang mit dem H₂S-vermittelten Schutzeffekt hergestellt werden.

Hinsichtlich der p38 MAPK führt nach LPS-Gabe die Hemmung der p38 *in vitro* zu einer Abnahme der Aktivität neutrophiler Zellen und *in vivo* zu einer verminderten Rekrutierung dieser Zellen in die Lunge [74]. Die phosphorylierte p38 ist zudem an der Freisetzung von MIP-2 beteiligt und ihre Hemmung vermindert die MIP-2 vermittelte Chemotaxis [74]. Die eigenen Resultate zeigen, dass die pp38 zwar durch LPS-Instillation nicht wesentlich beeinflusst wird, unter H₂S-Inhalation jedoch signifikant abnimmt. Es wäre denkbar, dass der protektive Effekt von H₂S auf den inflammatorischen Lungenschaden mit der verminderten Expression von pp38 im Zusammenhang steht, denn eine H₂S-bedingte Verminderung der pp38-Expression war sowohl mit einem Rückgang der MIP-2 auf Kontrollniveau als auch mit einer deutlich geringeren Anzahl neutrophiler Zellen in der BAL assoziiert. Da die neutrophilen Granulozyten proinflammatorische Zytokine ausschütten und ROS bilden, könnte auf diesem Weg der gesamte Entzündungsprozess durch H₂S gehemmt worden sein (Abb. 30) [15; 21; 61]. Des Weiteren wäre eine direkte Hemmung der Expression von MIP-2 durch H₂S möglich. Einerseits konnte gezeigt werden, dass sowohl exogen zugeführtes H₂S als auch eine gesteigerte H₂S-Synthese die Expression von MIP-2 reduzieren kann [90]. Andererseits scheint eine Behandlung mit NaHS zu einer vermehrten MIP-2-induzierten Chemotaxis von inflammatorischen Zellen führen zu können [27; 122]. Zusammengefasst liegt nach unseren Beobachtungen zwar eine Assoziation der Abnahme der p38-MAP-Kinase und der antiinflammatorischen Wirkung durch H₂S vor, eine Kausalität kann jedoch nicht bewiesen werden.

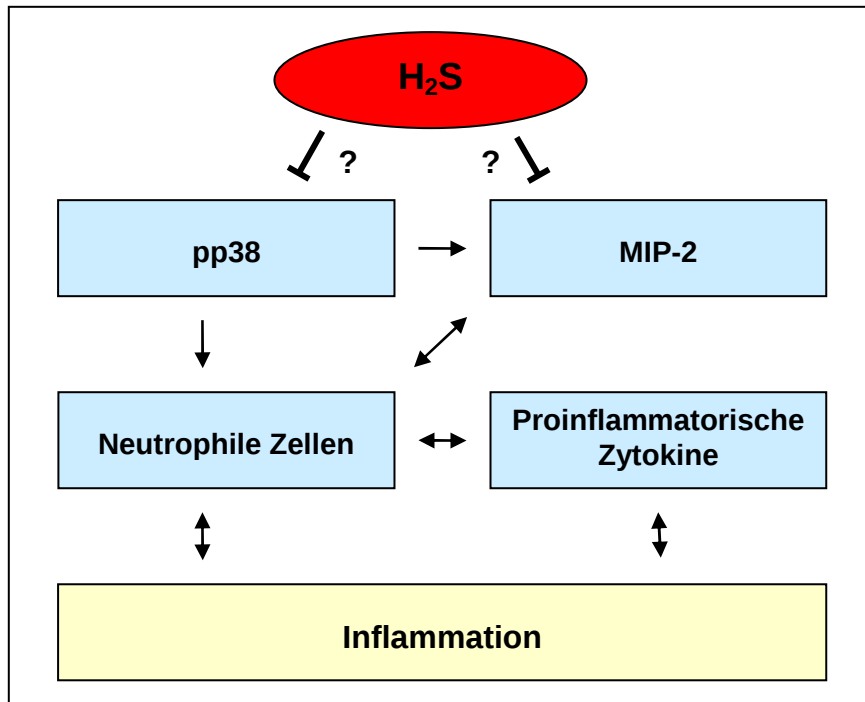


Abb. 30: Potenzielle Wirkmechanismen der Lungenprotektion durch H₂S bei Inflammation

H₂S: Schwefelwasserstoff, pp38: Proteinkinase p38, MIP-2: Macrophage Inflammatory Protein-2, → aktivierende Wirkung, —| hemmende Wirkung [21; 61; 74; 90].

5.5 Einfluss der exogenen Zufuhr von H₂S auf die endogene H₂S-Synthese

Neben der oben dargelegten Charakterisierung der H₂S-vermittelten Lungenprotektion, sollte in der vorliegenden Arbeit in Abhängigkeit des Schadenmodells ein möglicher Einfluss von exogen zugeführtem H₂S auf die endogene H₂S-Synthese evaluiert werden. Wie schon in der Einleitung beschrieben, sind neben der 3-Mercaptopyruvat Sulfurtransferase die Enzyme Cystathionin-γ-Lyase (CTH) und Cystathionin-β-Synthetase (CBS) wesentlich an der Synthese von H₂S beteiligt.

Nach unseren Beobachtungen in der Hyperoxie-Studie beeinflussten weder hyperoxische Bedingungen noch die Applikation von H₂S die endogene H₂S-Synthese. Nach unserem Wissen gibt es bislang keine weiteren Untersuchungen zu der Wechselwirkung von Hyperoxie und Schwefelwasserstoff, mit denen unsere Daten zu vergleichen wären.

Im Gegensatz zum Hyperoxie-Modell zeigte sich nach der intranasalen Instillation von LPS ein diskreter Anstieg des CBS-Proteins. Dieser Befund korreliert mit der bereits beschriebenen Induktion der H₂S-Syntheseenzyme nach LPS-Gabe [23; 61] und in weiteren Entzündungsmodellen [13; 15; 70]. Den häufig gezeigten Anstieg der CTH konnten wir nicht verifizieren. Ein möglicher Erklärungsansatz liegt in der Tatsache, dass CTH überwiegend in der Leber und in glatten Muskelzellen gebildet wird und eine Regulation in der Lunge von untergeordneter Bedeutung sein könnte [96]. Die Behandlung mit H₂S vor und nach der Inhalation von LPS bewirkte in unseren Versuchen eine deutliche Repression des CBS-Proteins und spricht für einen negativen Feedbackmechanismus der endogenen H₂S-Synthese, wenn das Gas exogen zugeführt wird. Ungeklärt bleibt hierbei die Beobachtung, dass unter Kontrollbedingungen exogenes H₂S die Expression der CBS nicht beeinflusst, obwohl eine Substrathemmung auch in diesem Fall zu erwarten wäre. Aufgrund der Erstmaligkeit dieser Befunde, finden sich in der Literatur weder vergleichbare Daten noch erklärende Hinweise.

5.6 Klinische Relevanz von H₂S

Trotz der erheblichen toxischen Wirkung von H₂S sind bei niedriger Konzentration gesundheitsförderliche Effekte schwefelhaltiger Stoffe bekannt. Knoblauch beispielsweise ist seit Jahrhunderten als gesundheitsförderliche Pflanze beliebt [5]. Er schützt das Herz-Kreislauf-System indem er unter anderem den Blutdruck senken und die Thrombozytenaggregation hemmen kann [5]. Es konnte gezeigt werden, dass Knoblauch und seine Derivate die H₂S-Synthese induzieren können und dieser Effekt die kardioprotektive Wirkung hervorruft [9]. Zudem wurden in den letzten Jahren zunehmend H₂S-freisetzende Medikamente entwickelt, deren entzündungshemmende Wirkung in Studien belegt wurde [35; 62; 63; 96; 126].

Unsere Ergebnisse deuten ebenfalls auf eine klare antiinflammatorische und antioxidative Wirkung von H₂S hin und würden das therapeutische Potential des Gases zum jetzigen Kenntnisstand unterstreichen. Vor einer möglichen klinischen Erprobung des Gases gilt es noch viele Fragen zu klären. Zum Beispiel wäre es wichtig zu wissen, wie genau exogenes H₂S im menschlichen Körper seine Zielgewebe erreicht, in welchen Organen und Zellen es seine Wirkung entfaltet und

wie es dort mit welchen Folgen die endogene H₂S-Synthese beeinflusst. Auch wenn unsere Daten und Vorversuche keine toxischen Wirkungen des niedrig dosierten Gases erkennen ließen, so müssen vor einer potenziellen klinischen Erprobung toxikologische Nebenwirkungen unter der angewendeten Dosierung ausgeschlossen werden.

5.7 Schlussfolgerung

Die eingangs gestellten Fragen können nach unseren Ergebnissen wie folgt beantwortet werden:

- ad 1) Bei Hyperoxie-induziertem Lungenschaden wirkt H₂S lungenprotektiv. Die Behandlung mit dem H₂S-Donator NaHS verhindert die Proteinleckage, die zelluläre Infiltration und den histologischen Lungenschaden.
- ad 2) Der protektive Effekt von H₂S auf den oxidativen Schaden wird vermutlich über die Hemmung des Proteins Angiopoietin 2 vermittelt. Die H₂S-induzierte Reduktion der ROS-Bildung vermindert direkt und / oder über die Hemmung der Ang2-Synthese den hyperoxischen Lungenschaden.
- ad 3) H₂S kann die Lunge vor inflammatorischer Schädigung schützen. Die gasförmige H₂S-Applikation bewirkt bei LPS-induziertem Lungenschaden eine deutliche Reduktion der Infiltration proinflammatorischer Zellen, der Synthese proinflammatorischer Zytokine und der Ausbildung von Alveolarwand-Ödemen.
- ad 4) Die schützende Wirkung von H₂S auf den inflammatorischen Lungenschaden ist mit einer H₂S-induzierten Reduktion der pp38-Expression assoziiert. Eine Abnahme der p38-MAP-Kinase könnte zu einer Reduktion von MIP-2 und Neutrophilen-Rekrutierung in die Lunge führen und in der Folge den inflammatorischen Prozess hemmen.
- ad 5) Eine prolongierte Sauerstoffexposition zeigt keinen Effekt auf die endogene H₂S-Synthese. Eine Modulation von CTH oder CBS durch NaHS findet weder in der Hyperoxie noch unter Raumluft statt. Eine LPS-Instillation führt zu einem Anstieg der CBS, nicht jedoch der CTH. Die Behandlung mit H₂S bei LPS-Gabe reduziert das CBS-Protein.

6 Literaturverzeichnis

1. Abe, K. and H. Kimura (1996). "The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator." *J Neurosci* 16(3): 1066-71.
2. Abraham, E. (2003). "Neutrophils and acute lung injury." *Crit Care Med* 31(4 Suppl): S195-9.
3. Ahotupa, M., E. Mantyla, V. Peltola, A. Puntala and H. Toivonen (1992). "Pro-oxidant effects of normobaric hyperoxia in rat tissues." *Acta Physiol Scand* 145(2): 151-7.
4. Altemeier, W. A. and S. E. Sinclair (2007). "Hyperoxia in the intensive care unit: why more is not always better." *Curr Opin Crit Care* 13(1): 73-8.
5. Banerjee, S. K. and S. K. Maulik (2002). "Effect of garlic on cardiovascular disorders: a review." *Nutr J* 1: 4.
6. Barazzone, C., F. Tacchini-Cottier, C. Vesin, A. F. Rochat and P. F. Piguet (1996). "Hyperoxia induces platelet activation and lung sequestration: an event dependent on tumor necrosis factor-alpha and CD11a." *Am J Respir Cell Mol Biol* 15(1): 107-14.
7. Baumgart, K., P. Radermacher and F. Wagner (2009). "Applying gases for microcirculatory and cellular oxygenation in sepsis: effects of nitric oxide, carbon monoxide, and hydrogen sulfide." *Curr Opin Anaesthesiol* 22(2): 168-76.
8. Beauchamp, R. O., Jr., J. S. Bus, J. A. Popp, C. J. Boreiko and D. A. Andjelkovich (1984). "A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity." *Crit Rev Toxicol* 13(1): 25-97.
9. Benavides, G. A., G. L. Squadrito, R. W. Mills, H. D. Patel, T. S. Isbell, R. P. Patel, V. M. Darley-Usmar, J. E. Doeller and D. W. Kraus (2007). "Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(46): 17977-82.
10. Bhandari, V., R. Choo-Wing, C. G. Lee, Z. Zhu, J. H. Nedrelow, G. L. Chupp, X. Zhang, M. A. Matthay, L. B. Ware, R. J. Homer, P. J. Lee, A. Geick, A. R. de Fougères and J. A. Elias (2006). "Hyperoxia causes angiotensin 2-mediated acute lung injury and necrotic cell death." *Nat Med* 12(11): 1286-93.
11. Bhandari, V. and J. A. Elias (2007). "The role of angiotensin 2 in hyperoxia-induced acute lung injury." *Cell Cycle* 6(9): 1049-52.
12. Bhatia, M. (2005). "Hydrogen sulfide as a vasodilator." *IUBMB Life* 57(9): 603-6.
13. Bhatia, M., J. Sidhapuriwala, S. M. Mochhala and P. K. Moore (2005). "Hydrogen sulphide is a mediator of carrageenan-induced hindpaw oedema in the rat." *Br J Pharmacol* 145(2): 141-4.
14. Bhatia, M., J. N. Sidhapuriwala, A. Sparatore and P. K. Moore (2008). "Treatment with H₂S-releasing diclofenac protects mice against acute pancreatitis-associated lung injury." *Shock* 29(1): 84-8.
15. Bhatia, M., F. L. Wong, D. Fu, H. Y. Lau, S. M. Mochhala and P. K. Moore (2005). "Role of hydrogen sulfide in acute pancreatitis and associated lung injury." *FASEB J* 19(6): 623-5.
16. Bhatia, M., L. Zhi, H. Zhang, S. W. Ng and P. K. Moore (2006). "Role of substance P in hydrogen sulfide-induced pulmonary inflammation in mice." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291(5): L896-904.
17. Bian, J. S., Q. C. Yong, T. T. Pan, Z. N. Feng, M. Y. Ali, S. Zhou and P. K. Moore (2006). "Role of hydrogen sulfide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and cardiac myocytes." *J Pharmacol Exp Ther* 316(2): 670-8.

18. Bitterman, H. (2009). "Bench-to-bedside review: oxygen as a drug." *Crit Care* 13(1): 205.
19. Bitterman, N. and P. Halpern (1995). "The effect of flumazenil on CNS oxygen toxicity in the rat." *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 17(3): 169-74.
20. Black, S. M. (2010). "New insights into acute lung injury." *Vascul Pharmacol* 52(5-6): 171-4.
21. Brigham, K. L. (1986). "Role of free radicals in lung injury." *Chest* 89(6): 859-63.
22. Brigham, K. L. and B. Meyrick (1986). "Endotoxin and lung injury." *Am Rev Respir Dis* 133(5): 913-27.
23. Collin, M., F. B. Anuar, O. Murch, M. Bhatia, P. K. Moore and C. Thiernemann (2005). "Inhibition of endogenous hydrogen sulfide formation reduces the organ injury caused by endotoxemia." *Br J Pharmacol* 146(4): 498-505.
24. Cooper, C. E. and G. C. Brown (2008). "The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance." *J Bioenerg Biomembr* 40(5): 533-9.
25. Crapo, J. D. (1986). "Morphologic changes in pulmonary oxygen toxicity." *Annu Rev Physiol* 48: 721-31.
26. Cuadrado, A. and A. R. Nebreda (2010). "Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling." *Biochem J* 429(3): 403-17.
27. Dal-Secco, D., T. M. Cunha, A. Freitas, J. C. Alves-Filho, F. O. Souto, S. Y. Fukada, R. Grespan, N. M. Alencar, A. F. Neto, M. A. Rossi, S. H. Ferreira, J. S. Hotherhall and F. Q. Cunha (2008). "Hydrogen sulfide augments neutrophil migration through enhancement of adhesion molecule expression and prevention of CXCR2 internalization: role of ATP-sensitive potassium channels." *J Immunol* 181(6): 4287-98.
28. Dong, L., S. Wang, M. Chen, H. Li and W. Bi (2008). "The activation of macrophage and upregulation of CD40 costimulatory molecule in lipopolysaccharide-induced acute lung injury." *J Biomed Biotechnol* 2008: 852571.
29. Elrod, J. W., J. W. Calvert, J. Morrison, J. E. Doeller, D. W. Kraus, L. Tao, X. Jiao, R. Scalia, L. Kiss, C. Szabo, H. Kimura, C. W. Chow and D. J. Lefer (2007). "Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(39): 15560-5.
30. Erickson, S. E., G. S. Martin, J. L. Davis, M. A. Matthay and M. D. Eisner (2009). "Recent trends in acute lung injury mortality: 1996-2005." *Crit Care Med* 37(5): 1574-9.
31. Esechie, A., L. Kiss, G. Olah, E. M. Horvath, H. Hawkins, C. Szabo and D. L. Traber (2008). "Protective effect of hydrogen sulfide in a murine model of acute lung injury induced by combined burn and smoke inhalation." *Clin Sci (Lond)* 115(3): 91-7.
32. Faffe, D. S., V. R. Seidl, P. S. Chagas, V. L. Goncalves de Moraes, V. L. Capelozzi, P. R. Rocco and W. A. Zin (2000). "Respiratory effects of lipopolysaccharide-induced inflammatory lung injury in mice." *Eur Respir J* 15(1): 85-91.
33. Faller, S., S. W. Ryter, A. M. Choi, T. Loop, R. Schmidt and A. Hoetzel (2010). "Inhaled hydrogen sulfide protects against ventilator-induced lung injury." *Anesthesiology* 113(1): 104-15.
34. Fiorucci, S., E. Antonelli, E. Distrutti, G. Rizzo, A. Mencarelli, S. Orlandi, R. Zanardo, B. Renga, M. Di Sante, A. Morelli, G. Cirino and J. L. Wallace (2005). "Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs." *Gastroenterology* 129(4): 1210-24.

35. Fiorucci, S. and L. Santucci (2011). "Hydrogen sulfide-based therapies: focus on H₂S releasing NSAIDs." *Inflamm Allergy Drug Targets* 10(2): 133-40.
36. Fredenburgh, L. E., M. A. Perrella and S. A. Mitsialis (2007). "The role of heme oxygenase-1 in pulmonary disease." *Am J Respir Cell Mol Biol* 36(2): 158-65.
37. Geng, B., L. Chang, C. Pan, Y. Qi, J. Zhao, Y. Pang, J. Du and C. Tang (2004). "Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol." *Biochem Biophys Res Commun* 318(3): 756-63.
38. Gobbi, G., F. Ricci, C. Malinverno, C. Carubbi, M. Pambianco, G. Panfilis, M. Vitale and P. Mirandola (2009). "Hydrogen sulfide impairs keratinocyte cell growth and adhesion inhibiting mitogen-activated protein kinase signaling." *Lab Invest* 89(9): 994-1006.
39. Gordo-Vidal, F., E. Calvo-Herranz, A. Abella-Alvarez and I. Salinas-Gabina (2010). "[Hyperoxia-induced pulmonary toxicity]." *Med Intensiva* 34(2): 134-8.
40. Guha, M. and N. Mackman (2001). "LPS induction of gene expression in human monocytes." *Cell Signal* 13(2): 85-94.
41. Hagiwara, S., H. Iwasaka, S. Matsumoto, T. Noguchi and H. Yoshioka (2007). "Association between heat stress protein 70 induction and decreased pulmonary fibrosis in an animal model of acute lung injury." *Lung* 185(5): 287-93.
42. Harfouche, R., N. A. Malak, R. P. Brandes, A. Karsan, K. Irani and S. N. Hussain (2005). "Roles of reactive oxygen species in angiopoietin-1/tie-2 receptor signaling." *FASEB J* 19(12): 1728-30.
43. Hashiba, T., M. Suzuki, Y. Nagashima, S. Suzuki, S. Inoue, T. Tsuburai, T. Matsuse and Y. Ishigatubo (2001). "Adenovirus-mediated transfer of heme oxygenase-1 cDNA attenuates severe lung injury induced by the influenza virus in mice." *Gene Ther* 8(19): 1499-507.
44. Hayashi, Y., Y. Sawa, N. Fukuyama, H. Nakazawa and H. Matsuda (2002). "Preoperative glutamine administration induces heat-shock protein 70 expression and attenuates cardiopulmonary bypass-induced inflammatory response by regulating nitric oxide synthase activity." *Circulation* 106(20): 2601-7.
45. Hazelton, J. L., I. Balan, G. I. Elmer, T. Kristian, R. E. Rosenthal, G. Krause, T. H. Sanderson and G. Fiskum (2010). "Hyperoxic reperfusion after global cerebral ischemia promotes inflammation and long-term hippocampal neuronal death." *J Neurotrauma* 27(4): 753-62.
46. Hegde, A. and M. Bhatia (2011). "Hydrogen sulfide in inflammation: friend or foe?" *Inflamm Allergy Drug Targets* 10(2): 118-22.
47. Ho, Y. S., M. S. Dey and J. D. Crapo (1996). "Antioxidant enzyme expression in rat lungs during hyperoxia." *Am J Physiol* 270(5 Pt 1): L810-8.
48. Hui, L., L. Bakiri, E. Stepniak and E. F. Wagner (2007). "p38alpha: a suppressor of cell proliferation and tumorigenesis." *Cell Cycle* 6(20): 2429-33.
49. Ishikawa, K., S. Yoshida, K. Kadota, T. Nakamura, H. Niino, S. Arakawa, A. Yoshida, K. Akashi and T. Ishibashi (2010). "Gene expression profile of hyperoxic and hypoxic retinas in a mouse model of oxygen-induced retinopathy." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51(8): 4307-19.
50. Ivashkiv, L. B. (2011). "Inflammatory signaling in macrophages: transitions from acute to tolerant and alternative activation states." *Eur J Immunol* 41(9): 2477-81.
51. Jackson, R. M. (1985). "Pulmonary oxygen toxicity." *Chest* 88(6): 900-5.
52. Johansen, D., K. Ytrehus and G. F. Baxter (2006). "Exogenous hydrogen sulfide (H₂S) protects against regional myocardial ischemia-reperfusion injury--Evidence for a role of K⁺ ATP channels." *Basic Res Cardiol* 101(1): 53-60.

53. Kimura, Y. and H. Kimura (2004). "Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress." *FASEB J* 18(10): 1165-7.
54. Kinoshita, M., H. Mochizuki and S. Ono (1999). "Pulmonary neutrophil accumulation following human endotoxemia." *Chest* 116(6): 1709-15.
55. Kolliputi, N. and A. B. Waxman (2009). "IL-6 cytoprotection in hyperoxic acute lung injury occurs via PI3K/Akt-mediated Bax phosphorylation." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297(1): L6-16.
56. Kolliputi, N. and A. B. Waxman (2009). "IL-6 cytoprotection in hyperoxic acute lung injury occurs via suppressor of cytokine signaling-1-induced apoptosis signal-regulating kinase-1 degradation." *Am J Respir Cell Mol Biol* 40(3): 314-24.
57. Kuroki, M., E. E. Voest, S. Amano, L. V. Beerepoot, S. Takashima, M. Tolentino, R. Y. Kim, R. M. Rohan, K. A. Colby, K. T. Yeo and A. P. Adamis (1996). "Reactive oxygen intermediates increase vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo." *J Clin Invest* 98(7): 1667-75.
58. Lee, P. J., J. Alam, S. L. Sylvester, N. Inamdar, L. Otterbein and A. M. Choi (1996). "Regulation of heme oxygenase-1 expression in vivo and in vitro in hyperoxic lung injury." *Am J Respir Cell Mol Biol* 14(6): 556-68.
59. Lee, S. G., J. L. Kim, H. K. Lee, G. W. Ryu, D. Y. Hur, I. H. Yun, J. W. Yang and H. W. Kim (2011). "Simvastatin suppresses expression of angiogenic factors in the retinas of rats with streptozotocin-induced diabetes." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 249(3): 389-97.
60. Li, J., F. Xu, L. Hu, L. P. Tan, Y. Q. Fu, F. Fang, F. W. Kuang and Z. Y. Lu (2009). "[Expression and role of p38 mitogen-activated protein kinase in hyperoxia-induced lung injury juvenile rat model]." *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* 11(5): 389-92.
61. Li, L., M. Bhatia, Y. Z. Zhu, Y. C. Zhu, R. D. Ramnath, Z. J. Wang, F. B. Anuar, M. Whiteman, M. Salto-Tellez and P. K. Moore (2005). "Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse." *FASEB J* 19(9): 1196-8.
62. Li, L., P. Rose and P. K. Moore (2011). "Hydrogen sulfide and cell signaling." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 51: 169-87.
63. Li, L., G. Rossoni, A. Sparatore, L. C. Lee, P. Del Soldato and P. K. Moore (2007). "Anti-inflammatory and gastrointestinal effects of a novel diclofenac derivative." *Free Radic Biol Med* 42(5): 706-19.
64. Lowicka, E. and J. Beltowski (2007). "Hydrogen sulfide (H₂S) - the third gas of interest for pharmacologists." *Pharmacol Rep* 59(1): 4-24.
65. Lu, M., L. F. Hu, G. Hu and J. S. Bian (2008). "Hydrogen sulfide protects astrocytes against H₂O₂-induced neural injury via enhancing glutamate uptake." *Free Radic Biol Med* 45(12): 1705-13.
66. MacCallum, N. S. and T. W. Evans (2005). "Epidemiology of acute lung injury." *Curr Opin Crit Care* 11(1): 43-9.
67. Mantell, L. L. and P. J. Lee (2000). "Signal transduction pathways in hyperoxia-induced lung cell death." *Mol Genet Metab* 71(1-2): 359-70.
68. Matute-Bello, G., C. W. Frevert and T. R. Martin (2008). "Animal models of acute lung injury." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295(3): L379-99.
69. Mickel, H. S., Y. N. Vaishnav, O. Kempfski, D. von Lubitz, J. F. Weiss and G. Feuerstein (1987). "Breathing 100% oxygen after global brain ischemia in Mongolian Gerbils results in increased lipid peroxidation and increased mortality." *Stroke* 18(2): 426-30.

70. Mok, Y. Y., M. S. Atan, C. Yoke Ping, W. Zhong Jing, M. Bhatia, S. Moochhala and P. K. Moore (2004). "Role of hydrogen sulphide in haemorrhagic shock in the rat: protective effect of inhibitors of hydrogen sulphide biosynthesis." *Br J Pharmacol* 143(7): 881-9.
71. Moore, P. K., M. Bhatia and S. Moochhala (2003). "Hydrogen sulfide: from the smell of the past to the mediator of the future?" *Trends Pharmacol Sci* 24(12): 609-11.
72. Morse, D., L. E. Otterbein, S. Watkins, S. Alber, Z. Zhou, R. A. Flavell, R. J. Davis and A. M. Choi (2003). "Deficiency in the c-Jun NH2-terminal kinase signaling pathway confers susceptibility to hyperoxic lung injury in mice." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285(1): L250-7.
73. Nagata, K., Y. Iwasaki, T. Yamada, T. Yuba, K. Kono, S. Hosogi, S. Ohsugi, H. Kuwahara and Y. Marunaka (2007). "Overexpression of manganese superoxide dismutase by N-acetylcysteine in hyperoxic lung injury." *Respir Med* 101(4): 800-7.
74. Nick, J. A., S. K. Young, K. K. Brown, N. J. Avdi, P. G. Arndt, B. T. Suratt, M. S. Janes, P. M. Henson and G. S. Worthen (2000). "Role of p38 mitogen-activated protein kinase in a murine model of pulmonary inflammation." *J Immunol* 164(4): 2151-9.
75. Nishina, K., K. Mikawa, Y. Takao, M. Shiga, N. Maekawa and H. Obara (1998). "Intravenous lidocaine attenuates acute lung injury induced by hydrochloric acid aspiration in rabbits." *Anesthesiology* 88(5): 1300-9.
76. Oh, G. S., H. O. Pae, B. S. Lee, B. N. Kim, J. M. Kim, H. R. Kim, S. B. Jeon, W. K. Jeon, H. J. Chae and H. T. Chung (2006). "Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor-kappaB via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide." *Free Radic Biol Med* 41(1): 106-19.
77. Oh, H., H. Takagi, K. Suzuma, A. Otani, M. Matsumura and Y. Honda (1999). "Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively up-regulate angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells." *J Biol Chem* 274(22): 15732-9.
78. Osipov, R. M., M. P. Robich, J. Feng, Y. Liu, R. T. Clements, H. P. Glazer, N. R. Sodha, C. Szabo, C. Bianchi and F. W. Sellke (2009). "Effect of hydrogen sulfide in a porcine model of myocardial ischemia-reperfusion: comparison of different administration regimens and characterization of the cellular mechanisms of protection." *J Cardiovasc Pharmacol* 54(4): 287-97.
79. Otulakowski, G. and B. P. Kavanagh (2010). "Hydrogen sulfide in lung injury: therapeutic hope from a toxic gas?" *Anesthesiology* 113(1): 4-6.
80. Pagano, A. and C. Barazzzone-Argiroffo (2003). "Alveolar cell death in hyperoxia-induced lung injury." *Ann N Y Acad Sci* 1010: 405-16.
81. Pan, L. L., X. H. Liu, Q. H. Gong, D. Wu and Y. Z. Zhu (2011). "Hydrogen sulfide attenuated tumor necrosis factor-alpha-induced inflammatory signaling and dysfunction in vascular endothelial cells." *PLoS One* 6(5): e19766.
82. Papapetropoulos, A., A. Pyriochou, Z. Altaany, G. Yang, A. Marazioti, Z. Zhou, M. G. Jeschke, L. K. Branski, D. N. Herndon, R. Wang and C. Szabo (2009). "Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(51): 21972-7.
83. Parsey, M. V., R. M. Tuder and E. Abraham (1998). "Neutrophils are major contributors to intraparenchymal lung IL-1 beta expression after hemorrhage and endotoxemia." *J Immunol* 160(2): 1007-13.
84. Phua, J., J. R. Badia, N. K. Adhikari, J. O. Friedrich, R. A. Fowler, J. M. Singh, D. C. Scales, D. R. Stather, A. Li, A. Jones, D. J. Gattas, D. Hallett, G. Tomlinson, T. E. Stewart and N. D. Ferguson (2009). "Has mortality from acute respiratory distress syndrome decreased over time?: A systematic review." *Am J Respir Crit Care Med* 179(3): 220-7.

85. Pugin, J., B. Ricou, K. P. Steinberg, P. M. Suter and T. R. Martin (1996). "Proinflammatory activity in bronchoalveolar lavage fluids from patients with ARDS, a prominent role for interleukin-1." *Am J Respir Crit Care Med* 153(6 Pt 1): 1850-6.
86. Qingyou, Z., D. Junbao, Z. Weijin, Y. Hui, T. Chaoshu and Z. Chunyu (2004). "Impact of hydrogen sulfide on carbon monoxide/heme oxygenase pathway in the pathogenesis of hypoxic pulmonary hypertension." *Biochem Biophys Res Commun* 317(1): 30-7.
87. Reiffenstein, R. J., W. C. Hulbert and S. H. Roth (1992). "Toxicology of hydrogen sulfide." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 32: 109-34.
88. Romashko, J., 3rd, S. Horowitz, W. R. Franek, T. Palaia, E. J. Miller, A. Lin, M. J. Birrer, W. Scott and L. L. Mantell (2003). "MAPK pathways mediate hyperoxia-induced oncotic cell death in lung epithelial cells." *Free Radic Biol Med* 35(8): 978-93.
89. Schnyder-Candrian, S., V. F. Quesniaux, F. Di Padova, I. Maillet, N. Noulain, I. Couillin, R. Moser, F. Erard, B. B. Vargaftig, B. Ryffel and B. Schnyder (2005). "Dual effects of p38 MAPK on TNF-dependent bronchoconstriction and TNF-independent neutrophil recruitment in lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome." *J Immunol* 175(1): 262-9.
90. Sen, U., S. Givvimani, O. A. Abe, E. D. Lederer and S. C. Tyagi (2011). "Cystathionine beta-synthase and cystathionine gamma-lyase double gene transfer ameliorate homocysteine-mediated mesangial inflammation through hydrogen sulfide generation." *Am J Physiol Cell Physiol* 300(1): C155-63.
91. Shi, Y., Z. Tu, D. Tang, H. Zhang, M. Liu, K. Wang, S. K. Calderwood and X. Xiao (2006). "The inhibition of LPS-induced production of inflammatory cytokines by HSP70 involves inactivation of the NF-kappaB pathway but not the MAPK pathways." *Shock* 26(3): 277-84.
92. Sidhapuriwala, J. N., S. W. Ng and M. Bhatia (2009). "Effects of hydrogen sulfide on inflammation in caerulein-induced acute pancreatitis." *J Inflamm (Lond)* 6: 35.
93. Singleton, K. D. and P. E. Wischmeyer (2007). "Glutamine's protection against sepsis and lung injury is dependent on heat shock protein 70 expression." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292(5): R1839-45.
94. Smith, L. J., H. Friedman and J. Anderson (1988). "Hyperoxic lung injury in mice: effect of neutrophil depletion and food deprivation." *J Lab Clin Med* 111(4): 449-58.
95. Spiller, F., M. I. Orrico, D. C. Nascimento, P. G. Czaikoski, F. O. Souto, J. C. Alves-Filho, A. Freitas, D. Carlos, M. F. Montenegro, A. F. Neto, S. H. Ferreira, M. A. Rossi, J. S. Hothersall, J. Assreuy and F. Q. Cunha (2010). "Hydrogen sulfide improves neutrophil migration and survival in sepsis via K⁺ATP channel activation." *Am J Respir Crit Care Med* 182(3): 360-8.
96. Szabo, C. (2007). "Hydrogen sulphide and its therapeutic potential." *Nat Rev Drug Discov* 6(11): 917-35.
97. Tamizhselvi, R., P. K. Moore and M. Bhatia (2007). "Hydrogen sulfide acts as a mediator of inflammation in acute pancreatitis: in vitro studies using isolated mouse pancreatic acinar cells." *J Cell Mol Med* 11(2): 315-26.
98. Tamizhselvi, R., P. K. Moore and M. Bhatia (2008). "Inhibition of hydrogen sulfide synthesis attenuates chemokine production and protects mice against acute pancreatitis and associated lung injury." *Pancreas* 36(4): e24-31.
99. Tokuda, K., K. Kida, E. Marutani, E. Crimi, M. Bougaki, A. Khatri, H. Kimura and F. Ichinose (2012). "Inhaled hydrogen sulfide prevents endotoxin-induced systemic inflammation and improves survival by altering sulfide metabolism in mice." *Antioxid Redox Signal* 17(1): 11-21.
100. Truong, S. V., M. M. Monick, T. O. Yarovinsky, L. S. Powers, T. Nyunoya and G. W. Hunninghake (2004). "Extracellular signal-regulated kinase activation delays hyperoxia-

-
- induced epithelial cell death in conditions of Akt downregulation." *Am J Respir Cell Mol Biol* 31(6): 611-8.
101. Tsan, M. F., C. Y. Lee and J. E. White (1991). "Interleukin 1 protects rats against oxygen toxicity." *J Appl Physiol* 71(2): 688-97.
 102. Turrens, J. F. (1997). "Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain." *Biosci Rep* 17(1): 3-8.
 103. Ulich, T. R., L. R. Watson, S. M. Yin, K. Z. Guo, P. Wang, H. Thang and J. del Castillo (1991). "The intratracheal administration of endotoxin and cytokines. I. Characterization of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA expression and the LPS-, IL-1-, and TNF-induced inflammatory infiltrate." *Am J Pathol* 138(6): 1485-96.
 104. Varisco, B. M. (2011). "The pharmacology of acute lung injury in sepsis." *Adv Pharmacol Sci* 2011: 254619.
 105. Villar, J., S. P. Ribeiro, J. B. Mullen, M. Kuliszewski, M. Post and A. S. Slutsky (1994). "Induction of the heat shock response reduces mortality rate and organ damage in a sepsis-induced acute lung injury model." *Crit Care Med* 22(6): 914-21.
 106. Wagner, C. A. (2009). "Hydrogen sulfide: a new gaseous signal molecule and blood pressure regulator." *J Nephrol* 22(2): 173-6.
 107. Wang, R. (2002). "Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter?" *FASEB J* 16(13): 1792-8.
 108. Ware, L. B. and M. A. Matthay (2000). "The acute respiratory distress syndrome." *N Engl J Med* 342(18): 1334-49.
 109. Warenycia, M. W., L. R. Goodwin, C. G. Benishin, R. J. Reiffenstein, D. M. Francom, J. D. Taylor and F. P. Dieken (1989). "Acute hydrogen sulfide poisoning. Demonstration of selective uptake of sulfide by the brainstem by measurement of brain sulfide levels." *Biochem Pharmacol* 38(6): 973-81.
 110. Whiteman, M., J. S. Armstrong, S. H. Chu, S. Jia-Ling, B. S. Wong, N. S. Cheung, B. Halliwell and P. K. Moore (2004). "The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite 'scavenger'?" *J Neurochem* 90(3): 765-8.
 111. Whiteman, M., N. S. Cheung, Y. Z. Zhu, S. H. Chu, J. L. Siau, B. S. Wong, J. S. Armstrong and P. K. Moore (2005). "Hydrogen sulphide: a novel inhibitor of hypochlorous acid-mediated oxidative damage in the brain?" *Biochem Biophys Res Commun* 326(4): 794-8.
 112. Wispe, J. R., B. B. Warner, J. C. Clark, C. R. Dey, J. Neuman, S. W. Glasser, J. D. Crapo, L. Y. Chang and J. A. Whitsett (1992). "Human Mn-superoxide dismutase in pulmonary epithelial cells of transgenic mice confers protection from oxygen injury." *J Biol Chem* 267(33): 23937-41.
 113. Wolpe, S. D. and A. Cerami (1989). "Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: members of a novel superfamily of cytokines." *FASEB J* 3(14): 2565-73.
 114. Wong, H. R., I. Y. Menendez, M. A. Ryan, A. G. Denenberg and J. R. Wispe (1998). "Increased expression of heat shock protein-70 protects A549 cells against hyperoxia." *Am J Physiol* 275(4 Pt 1): L836-41.
 115. Yan, S. K., T. Chang, H. Wang, L. Wu, R. Wang and Q. H. Meng (2006). "Effects of hydrogen sulfide on homocysteine-induced oxidative stress in vascular smooth muscle cells." *Biochem Biophys Res Commun* 351(2): 485-91.
 116. Yang, C., Z. Yang, M. Zhang, Q. Dong, X. Wang, A. Lan, F. Zeng, P. Chen, C. Wang and J. Feng (2011). "Hydrogen Sulfide Protects against Chemical Hypoxia-Induced Cytotoxicity and
-

-
- Inflammation in HaCaT Cells through Inhibition of ROS/NF-kappaB/COX-2 Pathway." *PLoS One* 6(7): e21971.
117. Yang, G., L. Wu, B. Jiang, W. Yang, J. Qi, K. Cao, Q. Meng, A. K. Mustafa, W. Mu, S. Zhang, S. H. Snyder and R. Wang (2008). "H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase." *Science* 322(5901): 587-90.
 118. Yin, H., X. Li, Q. Gong, X. Jin, H. Gu, B. Yuan, B. Zhang, F. Zheng, F. Gong and J. Zhu (2010). "Heme oxygenase-1 upregulation improves lipopolysaccharide-induced acute lung injury involving suppression of macrophage migration inhibitory factor." *Mol Immunol* 47(15): 2443-9.
 119. Zaher, T. E., E. J. Miller, D. M. Morrow, M. Javdan and L. L. Mantell (2007). "Hyperoxia-induced signal transduction pathways in pulmonary epithelial cells." *Free Radic Biol Med* 42(7): 897-908.
 120. Zanardo, R. C., V. Brancialeone, E. Distrutti, S. Fiorucci, G. Cirino and J. L. Wallace (2006). "Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation." *FASEB J* 20(12): 2118-20.
 121. Zhang, H., L. Zhi, S. Moochhala, P. K. Moore and M. Bhatia (2007). "Hydrogen sulfide acts as an inflammatory mediator in cecal ligation and puncture-induced sepsis in mice by upregulating the production of cytokines and chemokines via NF-kappaB." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292(4): L960-71.
 122. Zhang, H., L. Zhi, S. M. Moochhala, P. K. Moore and M. Bhatia (2007). "Endogenous hydrogen sulfide regulates leukocyte trafficking in cecal ligation and puncture-induced sepsis." *J Leukoc Biol* 82(4): 894-905.
 123. Zhang, H., L. Zhi, P. K. Moore and M. Bhatia (2006). "Role of hydrogen sulfide in cecal ligation and puncture-induced sepsis in the mouse." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290(6): L1193-201.
 124. Zhang, X., P. Shan, G. Jiang, S. S. Zhang, L. E. Otterbein, X. Y. Fu and P. J. Lee (2006). "Endothelial STAT3 is essential for the protective effects of HO-1 in oxidant-induced lung injury." *FASEB J* 20(12): 2156-8.
 125. Zhang, X., P. Shan, M. Sasidhar, G. L. Chupp, R. A. Flavell, A. M. Choi and P. J. Lee (2003). "Reactive oxygen species and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase mediate hyperoxia-induced cell death in lung epithelium." *Am J Respir Cell Mol Biol* 28(3): 305-15.
 126. Zhao, Y., H. Wang and M. Xian (2011). "Cysteine-activated hydrogen sulfide (H₂S) donors." *J Am Chem Soc* 133(1): 15-7.
 127. Zhi, L., A. D. Ang, H. Zhang, P. K. Moore and M. Bhatia (2007). "Hydrogen sulfide induces the synthesis of proinflammatory cytokines in human monocyte cell line U937 via the ERK-NF-kappaB pathway." *J Leukoc Biol* 81(5): 1322-32.
-

7 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater **Prof. Dr. Alexander Hötzel** bedanken, für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe unter besten Bedingungen durchführen zu dürfen. Durchweg habe ich eine sehr gute Betreuung und förderliches Feedback erhalten und viel Unterstützung erfahren.

Ich danke auch meiner Betreuerin **Dr. Simone Faller**, die mir alle Freiheit gelassen hat, meine Projekte eigenständig durchzuführen, bei Bedarf aber hilfsbereit an meiner Seite stand. Sie hat sich zu Beginn meiner Arbeit viel Zeit genommen und mich mit viel Geduld in die Labortechniken eingeführt und auch im weiteren Verlauf gut begleitet.

Ein herzlicher Dank gilt dem ganzen **Team der Experimentellen Anästhesie**, das mich sehr schnell und herzlich aufgenommen und mir, wenn nötig, mit guten Tipps und Ratschlägen weitergeholfen hat. Ich habe mich dank der freundschaftlichen und kollegialen Arbeitsatmosphäre ausgesprochen wohl gefühlt. **Dr. Sashko Spassov** möchte ich für die vielen anregenden Gespräche während der Phase des Schreibens und auch für sein Interesse an dem Hyperoxie-Projekt danken. Ein besonderer Dank geht an **Martina de Groot, Dr. Karl M. Strosing, Dr. Christian Fröhlich und Michael Föckler**, die mir auch neben dem Arbeitsalltag als gute Freunde beistanden und immer ein offenes Ohr hatten.

Schließlich will ich **meiner Familie** und allen **Freunden** danken, die in der Zeit des Forschens und des Schreibens hinter mir standen, mich ermutigten und aufbauten. Ich danke auch für die ein oder andere kritische oder anregende Frage, die mich meine Arbeit von anderen Perspektiven hat anschauen lassen. Namentlich erwähnen will ich **Jochen**, der immer für mich da war und mich durch die gesamte Zeit begleitet hat. Meinem **Frisbee-Team** und besonders der **Bergwacht-Jugendgruppe** im Münstertal sei gedankt dafür, dass es auch ein sehr fröhliches Leben nach den Labortagen gab.

8 Curriculum vitae

Diese Seiten enthalten persönliche Daten. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.