

Aus der  
Universitätsklinik für  
Anästhesiologie und Intensivmedizin

**Aktivierung der HO-1 im LPS-induzierten akuten  
Lungenversagen durch lokale versus  
systemische Gabe von Hämin**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Grimm, geb. Hoene, Rebekka Sophia

2020

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. J. Reutershan
2. Berichterstatter: Professor Dr. A. Kirschniak

Tag der Disputation: 14.12.2020

Wem sonst  
als euch

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	5
Tabellenverzeichnis .....	6
Abkürzungsverzeichnis .....	7
1. Einleitung .....	9
1.1 Acute Respiratory Distress Syndrome.....	9
1.1.1 Definition.....	9
1.1.2 Epidemiologie.....	10
1.1.3 Ätiologie .....	10
1.1.4 Klinik und Therapie.....	11
1.2 Pathomechanismus des ARDS .....	12
1.2.1 Interleukin 6.....	12
1.2.2 Pulmonale Inflammation und neutrophile Granulozyten .....	13
1.2.3 Neutrophilendiapedese .....	14
1.3 Hämoxygenase 1 .....	15
1.3.1 Die Metabolite der HO-1 und ihre zytoprotektiven Eigenschaften	17
1.4 Hämin .....	20
1.5 Fragestellung der Dissertation .....	21
2. Material und Methoden .....	22
2.1 Material.....	22
2.1.1 Mäuse.....	22
2.1.2 Geräte.....	22
2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	23
2.1.4 Chemikalien.....	24
2.1.5 Medien .....	25
2.1.6 Medikamente .....	26

2.1.7	Enzyme, Antikörper und Kits .....	26
2.2	Induktion einer pulmonalen Inflammation durch LPS- Applikation .....	28
2.3	Verabreichung von Hämin.....	28
2.3.1	Intraperitoneale Applikation.....	28
2.3.2	Inhalative Applikation .....	29
2.4	Untersuchung der Neutrophilenmigration .....	30
2.4.1	Hämin-Gabe nach LPS-Vernebelung .....	34
2.5	Herstellung histologischer Präparate der Lunge.....	35
2.5.1	Immunhistochemische Färbung von Granulozyten .....	36
2.5.2	Immunhistochemische Färbung der HO-1 .....	39
2.6	Untersuchung der Gefäßpermeabilität mit Hilfe von Evans Blue.....	40
2.7	IL-6-Bestimmung in der BAL mittels ELISA.....	42
2.8	Statistik .....	43
3.	Ergebnisse.....	44
3.1	Untersuchung der Neutrophilenmigration ins Lungengewebe.....	44
3.2	Anfärbung von PMN im Lungengewebe .....	49
3.3	Anfärbung von HO-1 im Lungengewebe .....	51
3.4	Untersuchung der Gefäßpermeabilität.....	53
3.5	IL-6-Konzentration in der BAL.....	54
4.	Diskussion .....	55
5.	Zusammenfassung .....	63
6.	Literaturverzeichnis .....	65
7.	Erklärung zum Eigenanteil .....	72
8.	Veröffentlichungen.....	73
9.	Danksagung .....	74

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel von Hämin. ....	20
Abbildung 2: Schematische Darstellung der LPS-Vernebelungskammer.....	28
Abbildung 3: Oro-Nasal and Respiratory Exposure System (ONARES) .....	29
Abbildung 4: Behandlungsschema und zeitlicher Ablauf des Migrationsversuchs .....	30
Abbildung 5: Zeitlicher Ablauf von Hämin-Gabe zeitgleich bzw. nach LPS-Inhalation .....	35
Abbildung 6: Behandlungsschema und zeitlicher Ablauf der Organentnahme für histologischer Präparate.....	35
Abbildung 7: Behandlungsschema und zeitlicher Ablauf für Evans Blue-Versuch .....	41
Abbildung 8: Behandlungsschema und zeitlicher Ablauf der Zytokinbestimmung .....	42
Abbildung 9: Neutrophilenzahl im Lungengewebe mit und ohne intraperitoneale Gabe von Hämin .....	45
Abbildung 10: Ergebnisse der Dosisfindung für die inhalative Gabe von Hämin .....	46
Abbildung 11: Vergleich der Neutrophilenzahl nach Vernebelung von Hämin oder Placebo .....	47
Abbildung 12: Auswirkung von Hämin-Gabe nach LPS- Vernebelung auf die Neutrophilenzahl .....	48
Abbildung 13: Immunhistochemische Färbung der PMN im Lungengewebe .....	50
Abbildung 14: Immunhistochemische Färbung von HO-1 im Lungengewebe.....	52
Abbildung 15: Untersuchung der Gefäßpermeabilität mit Hilfe von Evans Blue.....	53
Abbildung 16: Konzentration von Interleukin-6 (IL-6) in der BAL .....	54

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Schweregradeinteilung des ARDS .....	9
Tabelle 2: Zusammensetzung der Anästhesielösung .....	30
Tabelle 3: Zusammensetzung des Färbepuffers .....	31
Tabelle 4: Zusammensetzung der Enzymlösung .....	32
Tabelle 5: Zusammensetzung des Lysepuffers .....	32
Tabelle 6: Schema der Antikörper-Verdünnung .....	33
Tabelle 7: Färbeschema BAL- und Lungenproben .....	33
Tabelle 8: Färbeschema Isotypenkontrolle und Gating-Proben .....	34
Tabelle 9: Entparaffinierungsschema .....	37
Tabelle 10: Zusammensetzung der Avidin-Blocking-Solution für Granulozyten-Färbung .....	37
Tabelle 11: Schema für das Auftragen des Primär-Antikörpers für Granulozyten-Färbung .....	38
Tabelle 12: Zusammensetzung der Sekundärantikörper-Lösung für Granulozyten-Färbung .....	38
Tabelle 13: Zusammensetzung der Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Lösung .....	38
Tabelle 14: Zusammensetzung der DAB-Lösung .....	39
Tabelle 15: Zusammensetzung der Avidin-Blocking-Solution für HO-1-Färbung .....	39
Tabelle 16: Schema für die Inkubation mit Primärantikörper für HO-1-Färbung .....	40
Tabelle 17: Zusammensetzung der Sekundärantikörper-Lösung für HO-1-Färbung .....	40

## Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
Aq. dest	Aqua destillata
ABC-Lsg.	Avidin-Biotin-Komplex-Lösung
ANOVA	Analysis of Variance
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
BAL	broncho-alveoläre Lavage
BSA	Bovines Serumalbumin
CO-Hb	Carboxyhämoglobin
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CORM	Carbon Monoxide Releasing Molecule
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluoreszenz Activated Cell Scanning
FiO <sub>2</sub>	inspiratorische Sauerstofffraktion
FSGO	Fish Skin Gelatin Oil
h	Stunde
HO-1	Hämoxygenase-1
HO-2	Hämoxygenase-2
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal

i.v.	intravasal
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
n.d.	nicht detektierbar
neb.	nebulized (vernebelt)
NET	Neutrophile Extracellular Trap
ONARES	Oro-Nasal and Respiratory Exposure System
P	Signifikanzwert
p <sub>a</sub> O <sub>2</sub>	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PEEP	positiver endexpiratorischer Druck
PFA	Paraformaldehyd
PMN	Polymorphonucleäre Neutrophile
RT	Raumtemperatur
UPM	Umdrehungen pro Minute
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor Alpha
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

# 1. Einleitung

## 1.1 Acute Respiratory Distress Syndrome

Das akute Lungenversagen (englisch: acute respiratory distress syndrome, ARDS) ist eine schwere, akut auftretende pulmonale Insuffizienz unterschiedlicher Genese, die gekennzeichnet ist durch diffuse alveoläre Schädigung mit konsekutivem Lungenödem und Oxygenierungsstörungen. Mit seiner hohen Mortalität stellt es trotz jahrzehntelanger Forschung auch heute noch eine große Herausforderung im klinischen Alltag dar.

### 1.1.1 Definition

Nach den neuesten ARDS-Kriterien von 2012 (der sog. „Berlin-Definition“) lässt sich ARDS wie folgt definieren<sup>1</sup>:

- Beginn innerhalb einer Woche nach Auftreten des auslösenden Ereignisses
- Bilaterale Infiltrate (im CT oder Röntgen-Thorax) die sich nicht vollständig durch Atelektasen, Ergüsse oder Rundherde erklären lassen.
- Das respiratorische Versagen lässt sich nicht vollständig durch Herzinsuffizienz oder Hyperhydratation erklären. Evtl. Ausschluss eines hydrostatischen Lungenödems durch Echokardiographie.
- Oxygenierungsstörung trotz eines positiven endexpiratorischen Drucks (PEEP)  $\geq 5$  cm H<sub>2</sub>O. Die Einteilung des Schweregrades findet dabei anhand des Oxygenierungsquotienten nach Horovitz<sup>2</sup> statt (s. Tabelle 1).

**Tabelle 1: Schweregradeinteilung des ARDS.** ARDS: Acute Respiratory Distress Syndrome, p<sub>a</sub>O<sub>2</sub>: arterieller Sauerstoffpartialdruck, FiO<sub>2</sub> : inspiratorische Sauerstofffraktion; p<sub>a</sub>O<sub>2</sub>/ FiO<sub>2</sub>: Oxygenierungsquotient nach Horovitz, mm Hg: millimeter Quecksilbersäule

Schweregradeinteilung des ARDS	
mild	p <sub>a</sub> O <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> = 201-300 mm Hg
moderat	p <sub>a</sub> O <sub>2</sub> / FiO <sub>2</sub> = 101-200 mm Hg
schwer	p <sub>a</sub> O <sub>2</sub> / FiO <sub>2</sub> = $\leq$ 100 mm Hg

Die Bezeichnung „acute lung injury“, welche in vielen Publikationen zu finden ist, entfiel mit Einführung der neuen Definition und wurde durch die Einteilung „mildes ARDS“ ersetzt<sup>1</sup>.

### **1.1.2 Epidemiologie**

Die Daten zur Inzidenz variieren teilweise sehr, was an mangelnder Schärfe der Definitionskriterien<sup>3</sup>, aber auch an unterschiedlichen Populationsgruppen der untersuchenden Studien, geographischen Unterschieden und der Qualität der medizinischen Versorgung liegen kann. So ergab eine Studie in den USA von 2005 eine Inzidenz von 78,9 Fällen pro 100.000 Einwohner und Jahr<sup>4</sup>. Eine spanische Studie von 2011 kam auf eine Inzidenz von 7,2/100.000<sup>5</sup> und eine 2014 in Brasilien erhobene Studie auf 10,1 Fälle pro 100.000 Personen und Jahr<sup>6</sup>.

In der LUNG-SAFE-Studie von 2016<sup>7</sup> wurde die Inzidenz von ARDS auf Intensivstationen in 50 Ländern untersucht. Dabei wurden die Daten von 29.144 auf Intensivstationen aufgenommenen Patienten ausgewertet. Insgesamt 3022 Patienten (10,4%) erfüllten die ARDS-Kriterien. Davon hatten 30,0% ein mildes, 46,6% ein moderates und 23,4 ein schweres ARDS.

In einer kürzlich publizierten, in Deutschland mit Daten von 2004 erhobenen Studie<sup>8</sup> wurden 7540 Patienten auf Intensivstationen erfasst. Dort entwickelten 2,6% der in die Studie eingeschlossenen Patienten ein moderates oder schweres ARDS.

Die Krankenhausletalitätsrate lag in der LUNG-SAFE- Studie bei 34,9% für mildes, 40,3% für moderates und 46,1% für schweres ARDS<sup>7</sup>.

### **1.1.3 Ätiologie**

Bei der Genese lässt sich unterscheiden, ob das ARDS direkt durch lokale Schädigung ausgelöst wurde oder ob hämatogen vermittelt eine indirekte Schädigung stattgefunden hat. Die häufigsten Auslöser sind Sepsis, Pneumonie, Schock, Trauma und Aspiration<sup>5,7</sup>, aber auch Pankreatitis, Verbrennungen, Inhalation von toxischen Gasen oder Dämpfen und Medikamenten- und Drogenvergiftungen können zu ARDS führen<sup>9</sup>. Eine direkte Schädigung des Lungenparenchyms tritt z.B. bei einer Pneumonie oder durch toxische

Gase auf. Zu einer indirekten Schädigung kommt es im Rahmen einer überschießenden systemischen Entzündungsreaktion z.B. bei Sepsis oder Pankreatitis<sup>10</sup>.

#### **1.1.4 Klinik und Therapie**

Klinisch präsentieren sich die Patienten initial mit Dyspnoe, schneller, flacher Atmung, Hypokapnie und leicht erniedrigtem arteriellen Sauerstoffpartialdruck ( $p_aO_2$ ). Spezifische Biomarker oder andere diagnostische Mittel, mit denen sich ein ARDS zweifelsfrei nachweisen ließe, gibt es aktuell nicht. Das unspezifische klinische Bild ist vermutlich der Hauptgrund dafür, dass ARDS im Frühstadium häufig nicht erkannt wird.<sup>7</sup>

Im späteren Stadium folgt ein stark erniedrigter  $p_aO_2$ , radiologisch zeigen sich bilaterale Verschattungen.

Kann trotz Intervention der Zustand nicht verbessert werden, so geht die Erkrankung in ein Stadium über, in dem der Sauerstoffmangel trotz Beatmung mit hohen inspiratorischen  $O_2$ -Konzentrationen und Beatmungsdrücken nicht adäquat behoben werden kann. Es kommt aufgrund der zunehmenden Totraumventilation zu einer Hyperkapnie, radiologisch zeigen sich großflächige Verschattungen („white lung“). Zeigt sich keine Besserung, so ist unter maschineller Beatmung häufig ein Multiorganversagen todesursächlich.<sup>9</sup>

Eine spezifische Therapie für das ARDS gibt es derzeit nicht, daher stehen supportive Maßnahmen und, wenn möglich, die Behandlung der auslösenden Erkrankung im Vordergrund<sup>11</sup>.

Das Erhalten der Spontanatmung ist häufig nicht möglich, sollte aber angestrebt werden, um beatmungsinduzierte Lungenschäden zu vermeiden. Bei invasiver Beatmung werden lungenprotektive Einstellungen mit niedrigen Atemhubvolumina und einem positiven endexpiratorischen Atemwegsdruck verwendet. Um sekundäre Schäden zu vermeiden, sollte die inspiratorische Sauerstofffraktion so niedrig wie möglich gewählt werden.<sup>9</sup> Des Weiteren empfiehlt sich bei schwerem ARDS die intermittierende Beatmung in Bauchlage<sup>12</sup>. Andere neuere Ansätze mit vielversprechender Studienlage sind eine niedrigdosierte Gabe von Glukokortikoiden<sup>13</sup>, die kurzzeitige Gabe von Muskelrelaxantien<sup>14</sup> und die extrakorporale Membranoxygenierung<sup>15</sup>.

Nach überstandener ARDS zeigt sich im Langzeitverlauf häufig eine verminderte Lebensqualität mit eingeschränkter körperlicher Leistungsfähigkeit<sup>16</sup> sowie ein vermehrtes Auftreten von Depressionen und posttraumatischen Belastungsstörungen<sup>17</sup>.

## 1.2 Pathomechanismus des ARDS

Nach dem auslösenden Ereignis treten innerhalb weniger Stunden Schäden an Kapillarmembran und Pneumozyten auf, gefolgt von einem interstitiellen und alveolären Lungenödem (exsudative Phase)<sup>18</sup>. In der im Anschluss folgenden proliferativen Phase finden sich in den Alveolen hyaline Membranen sowie Makrophagen und neutrophile Granulozyten, des Weiteren zeigt sich eine Proliferation der Pneumozyten<sup>9,19</sup>. Insbesondere hyaline Membranen im Alveolarraum gelten dabei nach neuerer Ansicht als Nachweis eines diffusen alveolären Schadens und damit als histologisch sicheres Zeichen für ARDS<sup>20</sup>.

Die nun folgende fibrotische Phase ist nicht mehr vollständig reversibel. Dabei führen der bindegewebige Umbau und die Verdickung der Alveolarsepten zu einer weiteren Verschlechterung der Oxygenierung.<sup>9,19</sup>

### 1.2.1 Interleukin 6

Zytokine sind Proteine, die als Botenstoffe Einfluss auf Wachstum und Differenzierung anderer Zellen nehmen können. Man unterscheidet dabei Chemokine, Tumor- Nekrose-Faktoren, Interleukine, Interferone und Kolonien-Stimulierende-Faktoren. Relativ viele Zellen sind in der Lage, nach Kontakt mit Pathogenen Zytokine zu produzieren. So sind zum Beispiel Makrophagen, Lymphozyten, Mastzellen, aber auch Endothelzellen und Fibroblasten Zytokin-Produzenten.

Das Zytokin Interleukin-6 (IL-6) wird beim Auftreten einer Läsion lokal synthetisiert, gelangt anschließend in die Leber und bewirkt dort die Freisetzung von Akute-Phase-Proteinen. IL-6 fördert u.a. verschiedene systemische Effekte wie das Auslösen von Fieber und eine vermehrte Ausschüttung von Neutrophilen aus dem Knochenmark.<sup>21-23</sup>

### 1.2.2 Pulmonale Inflammation und neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten spielen beim ARDS eine entscheidende Rolle und sind als Teil der angeborenen Immunabwehr als erste Zellen vor Ort.<sup>24-27</sup> Histologische Untersuchungen des Lungengewebes zeigen eine erhöhte Neutrophilenzahl im Rahmen des ARDS<sup>28,29</sup> und in der broncho-alveoläre Lavage (BAL) von an ARDS erkrankten Patienten lassen sich vermehrt Neutrophile nachweisen.<sup>30</sup> Des Weiteren wird eine Zunahme an polymorphonukleären Neutrophilen (PMN) mit einem schlechteren Outcome von ARDS in Verbindung gebracht<sup>31</sup>, wohingegen eine Neutropenie in den meisten Tiermodellen mit einer Besserung assoziiert ist.<sup>32</sup>

Normalerweise dienen neutrophile Granulozyten der Abwehr von Mikroorganismen, indem sie über Phagozytose, NETose (Neutrophile Extracellular Trap- Chromatinfallen, welche extrazellulär Erreger binden) und das Ausschütten antimikrobieller Substanzen Erreger unschädlich machen<sup>33</sup>. Im Rahmen einer überschießenden Immunantwort kommt es durch die beim oxidativen Burst durch PMN freigesetzten, zytotoxischen, reaktiven Sauerstoffspezies jedoch zu einer Schädigung des gesunden Lungengewebes.<sup>34</sup> Die Schädigung der Lunge im Rahmen des ARDS wird daher nicht allein durch die vermehrte Einwanderung von Neutrophilen ausgelöst, sondern im Wesentlichen durch deren übermäßige Aktivierung<sup>35</sup>. So konnte bei Ratten mit Streptococcus pneumoniae-induzierter Pneumonie gezeigt werden, dass sich die metabolisch aktivsten PMN in den Alveolen befinden.<sup>36</sup>

Das pulmonale Kapillarnetz hat zu mehr als 50% einen geringeren (2-15  $\mu\text{m}$ ) Durchmesser als PMN (6-10  $\mu\text{m}$ ). Daher können neutrophile Granulozyten das Gefäßbett nur passieren, indem sie sich verformen. Folglich brauchen PMN im Vergleich zu Erythrozyten deutlich länger, um voran zu kommen, was einen physiologischen Neutrophilen-Pool in der Lunge bewirkt.<sup>37</sup> Inflammatorische Reize führen über zytoskeletale Veränderungen zu einer geringeren Verformbarkeit der Granulozyten und somit zu einer weiteren Zunahme der PMN-Zahl im Lungengewebe<sup>38</sup>.

### 1.2.3 Neutrophilendiapedese

In den meisten Geweben findet der Durchtritt von Neutrophilen aus dem Gefäßsystem in hochendothelialen (postkapillären) Venolen statt. In der Lunge geschieht die Diapedese jedoch in den Kapillaren. Durch aktivierte Makrophagen und zerstörte Endothelzellen kommt es zur Ausschüttung von Chemokinen, welche die Exprimierung von P- und E-Selektinen in Endothelzellen auslösen. Selektine gehören zur Gruppe der sogenannten Zelladhäsionsmoleküle und sind Transmembranproteine, welche u.a. an bestimmte Glykoproteine von Leukozyten binden. Diese Bindung erfolgt nur unter Einfluss von Scherkräften, hat jedoch eine geringe Affinität, was zum typischen „Rollen“ der Granulozyten führt.<sup>39</sup>

In den Lungenkapillaren selber wird nicht gerollt, was vermutlich am geringen Gefäßdurchmesser liegt. Prä- und postkapillär tritt das Rollen jedoch auf<sup>40</sup>.

Im Anschluss an das Rollen kommt es zur integrinvermittelten Bindung an das Endothel. Integrine sind Transmembranproteine und verbinden als sog. Adhäsionsmoleküle Zellen mit anderen Zellen oder der extrazellulären Matrix. Des Weiteren sind sie ein wichtiger Signalübermittler zwischen Zellen und deren unmittelbarer Umgebung. Für die Bindung im Rahmen der Leukozytendiapedese sind insbesondere die  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ - Untereinheiten der Integrine verantwortlich<sup>41</sup>.

Vermittelt durch Chemokine kommt es zu einer Veränderung der Integrine auf Granulozyten, welche daraufhin eine feste Bindung mit Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche des Gefäßendothels eingehen. Die Exprimierung dieser Adhäsionsmoleküle, z.B. von Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) und Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) wird ebenfalls durch Chemokine vermittelt.<sup>41</sup>

Im Anschluss an das Rollen und feste Binden durchwandern die Neutrophilen das Endothel. Dies geschieht zumeist interzellulär, kann aber auch transzellulär erfolgen und wird durch zytoskeletale Veränderungen der Endothelzelle, welche über die Bindung der PMN ausgelöst werden, begünstigt.<sup>42</sup> Um den Gasaustausch zu erleichtern, ist im Bereich der Alveolen die Basalmembran von Kapilarendothel und Alveolarepithel verschmolzen. Vermutlich wird die Basalmembran durchwandert, indem in ihr existierende Lücken genutzt werden.<sup>42</sup>

Die transepitheliale Migration erfolgt parazellulär und vor allem an Stellen, an denen zwei Pneumozyten Typ I auf einen Pneumozyten Typ II stoßen.<sup>43</sup>

### 1.3 Hämoxygenase 1

Die Hämoxygenase ist ein in nahezu allen höheren Organismen vorkommendes Enzym, das den Abbau von Häm zu äquivalenten Teilen CO, Fe<sup>2+</sup> und Biliverdin katalysiert. Dazu benötigt sie als Koenzym Reduktionsäquivalente von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH), sowie drei Sauerstoffmoleküle<sup>44</sup>. Über die Bildung von  $\alpha$ -Hydroxyhäm kommt es unter CO-Abgabe zur Bildung von Verdohäm. Anschließend folgt die Bildung von Biliverdin-Fe-Chelat, was der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Häm-Abbaus ist. Zum Schluss erfolgt die Bildung und Freisetzung von Biliverdin- IX $\alpha$  und Fe<sup>2+</sup>.<sup>45</sup>

Es existieren drei Isoformen der Hämoxygenase. Die Hämoxygenase-2 (HO-2) wird konstitutiv in vielen Geweben wie zum Beispiel Hoden und Nervensystem exprimiert.<sup>46</sup> Die Hämoxygenase-3 ist relativ wenig erforscht. Jüngere Studien deuten jedoch darauf hin, dass es sich um ein Pseudogen der HO-2 handeln könnte.<sup>47</sup>

Die Hämoxygenase- 1 (HO-1) wird auf transkriptionaler Ebene reguliert und findet sich ebenfalls in vielen Zellen, unter anderem in Pneumozyten Typ II und Makrophagen, wobei sie unter physiologischen Bedingungen nur in geringen Mengen synthetisiert wird.<sup>48</sup> Innerhalb der Zelle ist sie überwiegend im endoplasmatischen Retikulum sowie in geringeren Mengen in Nucleus, Mitochondrien und Zellmembran zu finden<sup>49</sup> Ihr wird eine protektive Rolle im Rahmen von inflammatorischem und oxidativem Stress zugeschrieben, welche sie zu einem wichtigen Enzym der Zellhomöostase macht. Darüber hinaus konnten auch anti-apoptotische und anti-proliferative Eigenschaften bei ihr nachgewiesen werden.<sup>46,48-51</sup>

Ein stark erhöhtes Vorkommen von Häm, dem Substrat der HO-1, führt zu toxischen Effekten, da es u.a. Zellmembranen schädigt, DNA denaturiert, Enzyme wie Caspasen aktiviert und die Synthese von Chemokinen induziert. Daher wird ein Teil der protektiven Eigenschaften der HO-1 der Tatsache zugeschrieben, dass sie Häm abbaut.<sup>52</sup>

Die Expression von HO-1 wird durch ihr Substrat, aber auch durch viele andere Substanzen induziert, z.B. Schwermetalle, bakterielle Endotoxine, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aber auch UV-Strahlung, sowie Hyper- und Hypoxie<sup>50,53</sup>, wobei prooxidativen Eigenschaften eine Gemeinsamkeit vieler HO-1-Induktoren sind.<sup>53</sup>

Eine erhöhte HO-1-Aktivität in der Lunge findet sich bei vielen pulmonalen Erkrankungen wie zum Beispiel ARDS, COPD, Asthma, Mukoviszidose und pulmonaler Hypertonie.<sup>48,54</sup> Da zwischen der Aktivität der HO-1 und der Resistenz gegenüber oxidativem und inflammatorischem Stress eine positive Korrelation besteht, geht man inzwischen davon aus, dass eine Steigerung der HO-1-Expression eine protektive zelluläre Antwort ist.<sup>55</sup> So konnte bei Patienten mit schwerer Sepsis ein Zusammenhang zwischen erhöhter HO-1 Expression und Überlebenswahrscheinlichkeit festgestellt werden.<sup>56</sup>

Das HO-1 anti-inflammatorisch wirkt und Zellen vor oxidativem Stress schützt, wurde 1997 von Poss et. al. bestätigt, nachdem Mäuse mit deletiertem HO-1-Gen gezüchtet worden waren. Diese Hmox1<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten eine erhöhte Sterblichkeit, Anämie, und Zeichen chronischer Inflammation mit Leukozytose, Glomerulonephritis und Hepatosplenomegalie. Des Weiteren fanden sich vermehrt Eisenablagerungen in Leber und Nieren.<sup>55,57</sup>

Eine von Otterbein et. al. mittels Gentransfer durchgeführte Überexpression von HO-1 in der Lunge hingegen bewirkte in einem Modell von Sauerstoff-induzierter Lungenschädigung bei Ratten eine geringere Mortalität mit verringerten Anzeichen von Inflammation.<sup>58</sup>

Eine bei Mäusen durch Cobalt- Protoporphyrin ausgelöste HO-1-Überexpression schützte vor LPS-induziertem Lungenschaden und führte zu weniger Neutrophilen in der BAL, geringerem Lungenödem und niedrigerem TNF- $\alpha$ -Gehalt.<sup>59</sup> Auch auf die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies und anderen Biomarkern für oxidativen Stress konnte die pharmakologische Induktion der HO-1 einen positiven Effekt erzielen.<sup>60</sup>

Die wenigen bei Menschen bisher bekannten Fälle von HO-1-Defizienz verdeutlichen die wichtige Rolle der HO-1 für die Zellhomöostase. So führte eine homozygote HO-1-

Mutation bei einem Paar mit Kinderwunsch mehrfach zu schweren, fetalen Missbildungen und Abort <sup>61</sup>. In zwei weiteren beim Menschen beschriebenen Fälle von HO-1-Defizienz starben die Patienten im Alter von sechs bzw. 15 Jahren. Beide präsentierten sich mit Nephropathie, generalisierter Inflammation, intravasaler Hämolyse und kongenitaler Asplenie und verstarben letztendlich an einer intrakraniellen Blutung <sup>62,63</sup>.

Für verschiedene Erkrankungen (u.a. Lungenkrebs, Lungenemphysem und Pneumonie) konnte ein Zusammenhang zwischen Schwere der Erkrankung und Anzahl an GT-Wiederholungen im HO-1 Promotor nachgewiesen werden. Dabei führt ein längerer GT-Repeat (>25 Wiederholungen) zu geringeren HO-1-Mengen und einem schwerwiegenderen Krankheitsgeschehen. Ein kürzerer Repeat (<25 Wiederholungen) hingegen geht mit einer geringeren Krankheitsanfälligkeit und höherer HO-1-Expression einher.<sup>64</sup>

Die HO-1 spielt also bei vielen Erkrankungen eine wichtige Rolle. Insbesondere für ARDS ist eine Erhöhung der HO-1-Expression ein möglicher Therapieansatz. Neben der pharmakologischen Aktivierung könnte sich dies durch eine Überexpression mithilfe gentherapeutischer Methoden bewerkstelligen lassen. Tatsächlich wurden schon mehrere erfolgreiche Versuche unternommen, eine Überexpression mit genetischen Vektoren zu erzielen<sup>58,65</sup>, jedoch müssen diese Methoden noch deutlich optimiert werden bevor ein sicherer Einsatz beim Menschen möglich wäre.

### **1.3.1 Die Metabolite der HO-1 und ihre zytoprotektiven Eigenschaften**

Die genauen Mechanismen, welche den protektiven Eigenschaften der HO-1 im Hinblick auf oxidativen Stress und Inflammation zugrunde liegen, konnten bis heute noch nicht vollständig entschlüsselt werden.

Wie oben bereits erwähnt, wird zum einen vermutet, dass der Abbau von überschüssigem Häm durch HO-1 einen schützenden Effekt hat. Eine weitere wichtige, protektive Wirkung wird den Metaboliten der HO-1 zugeschrieben. Das beim Häm-Abbau entstehende freie Eisen wirkt an sich schädigend, da es eine prooxidative Wirkung hat und selber freie Radikale bilden kann. Allerdings stößt freies Eisen auch die Synthese von

Ferritin an, welches Eisen bindet und antioxidative sowie antiapoptotische Eigenschaften hat.<sup>46,48</sup> Nichtsdestotrotz stellt Eisen als mögliches Therapeutikum bei inflammatorischem Stress momentan keinen Forschungsschwerpunkt dar, da neben der prooxidativen Wirkung auch die übermäßige Akkumulierung ein gesundheitliches Problem darstellen würde.

Als vielversprechend haben sich jedoch die beiden anderen Produkte der HO-1 erwiesen: Das beim Häm-Abbau entstehende Biliverdin IX $\alpha$  wird mithilfe der Biliverdin-Reduktase und eines Reduktionsäquivalents von NADPH relativ schnell zu Bilirubin IX $\alpha$  umgewandelt. Sowohl für Biliverdin als auch für Bilirubin konnten antioxidative, antiproliferative und antiinflammatorische Eigenschaften nachgewiesen werden.<sup>46,48</sup> So zeigten Zellen *in vitro* eine höhere Resistenz gegenüber oxidativem Stress nach Bilirubin-Gabe<sup>66,67</sup> und bei Ratten mit Endotoxin-induzierter Inflammation kam es nach Gabe von Biliverdin zu einer Reduktion von proinflammatorischen Zytokinen und Besserung des pulmonalen Entzündungsgeschehens.<sup>68</sup>

Zu viel Bilirubin ist jedoch schädlich. So kann ein Neugeborenenikterus hervorgerufen werden und, sobald die Bilirubin-Menge so groß ist, dass die Blut-Hirn-Schranke überwunden wird, zu einer Bilirubinzephalopathie führen, welche im schlimmsten Fall letal endet.<sup>69</sup>

Insbesondere die Wirkung von Kohlenmonoxid wurde in den letzten Jahren intensiv erforscht. CO ist ein inertes Gas, das unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich durch den Häm-Abbau entsteht, ins Blut diffundiert und letztendlich über die Lunge abgeatmet wird. Für eine niedrigkonzentrierte Gabe von CO konnte in zahlreichen Versuchen antiproliferative, antiinflammatorische, antiapoptotische und vasodilatative Effekte nachgewiesen werden.<sup>48,50,64,70</sup>

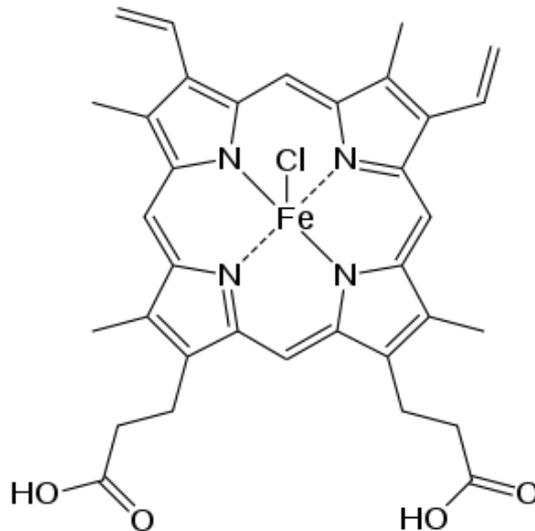
So zeigten Otterbein et. al., dass eine niedrige Gabe von CO nach LPS-Exposition sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bei Mäusen zu einer Reduktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  führte und gleichzeitig das protektiv wirkende IL-10 erhöhte.<sup>71</sup> *In vitro* kam es bei Fibroblasten nach CO-Vorbehandlung zu einer verringerten Apoptoserate nach TNF- $\alpha$ -Exposition<sup>72</sup> und Mäuse, die zusätzlich geringe Mengen an CO erhielten, überlebten eine Hyperoxie deutlich länger als Mäuse, die reinen Sauerstoff einatmeten.<sup>73</sup>

CO konkurriert allerdings mit ungefähr 240-fach höherer Affinität als Sauerstoff um die Bindungsstelle am Hämoglobin. Dabei erhöht es gleichzeitig die Affinität von bereits gebundenem Sauerstoff zum Hämoglobin und bewirkt so eine Linksverschiebung der Sauerstoffbindungskurve. Dies hat zur Folge, dass bei zu hohen Carboxyhämoglobin (CO-Hb)-Werten eine mangelnde Sauerstoffversorgung des Gewebes droht. Bei etwa 20% CO-Hb kommt es zu den ersten Symptomen (Kopfschmerzen, Schwindel), und eine CO-Hb Konzentration von 50-80% ist tödlich.<sup>74</sup>

In klinischen Studien beim Menschen zur inhalativen CO-Gabe konnte bisher kein eindeutig positiver Effekt nachgewiesen werden<sup>49</sup>. Dies könnte allerdings darauf beruhen, dass das therapeutische Level nicht erreicht wurde: Denn während in humanen Studien aus Sicherheitsgründen nur eine maximale Menge von 14% CO-Hb toleriert wird, zeigten sich zytoprotektive Effekte in den meisten Nagetiermodellen erst bei etwa 20% CO-Hb<sup>46</sup>. Ein anderer Ansatz zur CO-Gabe, der das oben genannte Problem bei inhalativer Gabe eventuell umgehen könnte, sind Carbon Monoxide Releasing Molecules (CORM)<sup>49</sup> sowie ein lokaler Einsatz, z.B. bei zu transplantierenden Organen<sup>70</sup>

## 1.4 Hämin

Hämin (Ferriprotoporphyrin IX –chlorid) setzt sich zusammen aus dem in menschlichen Erythrozyten vorkommenden Fe-Protoporphyrin IX-Molekül (Häm) und einem Chlorid-Ion als axialem Liganden am zentralen Eisen (siehe Abbildung 1). Es ist ein dunkelgraues Pulver, das in Wasser und Säuren unlöslich ist und sich nur in starken Basen löst.<sup>75</sup>



**Abbildung 1: Strukturformel von Hämin.** Die Grundstruktur des Hämins ist ein Häm-Molekül, an dessen zentralem Eisen ein Chlorid-Ion axial gebunden ist. Aus <sup>76</sup>.

Hämin ist ein bekannter Induktor der HO-1.<sup>49</sup>

Nach Hämin-Gabe kann bei mit Influenza A- Virus infizierten Mäusen eine geringere Sterblichkeit, weniger Gewichtsverlust sowie eine verminderte Lungenschädigung nachgewiesen werden<sup>77</sup>. Mit Hämin behandelte Ratten zeigen nach Cisplatin-Gabe eine geringere Schädigung der Hoden sowie einen besseren Erhalt der Zeugungsfähigkeit<sup>78</sup>, und ebenfalls bei Ratten zeigt sich nach Hornhauttransplantation ein besseres Outcome mit geringerer Abstoßungsrate.<sup>79</sup>

Unter den Namen Normosang<sup>80</sup> und Panhematin<sup>81</sup> ist Hämin beim Menschen zur Behandlung von hepatischer Porphyrie, insbesondere der akuten intermittierenden Porphyrie, in mehreren Ländern zugelassen.

Dies macht Hämin, neben seinem großen therapeutischen Potential, zu einem vielversprechenden Forschungsobjekt in Hinblick auf oxidative und inflammatorische Krankheitsgeschehen.

## 1.5 Fragestellung der Dissertation

Für ARDS, das mit seinen unterschiedlichen Ätiologien und der hohen Mortalität eine große klinische Herausforderung darstellt, sind Ansätze zur Therapie ein wichtiges Forschungsgebiet. In der Vergangenheit wurde bereits gezeigt, dass Hämin-Gabe die HO-1 Expression in der Lunge induziert und das Entzündungsgeschehen dadurch positiv beeinflusst.<sup>82-84</sup>

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirksamkeit einer inhalativen Hämin-Gabe mit der systemischen Applikation zu vergleichen, um die Potenziale verschiedener Darreichungsformen für einen eventuellen Therapieansatz abschätzen zu können.

Folgende Fragen sollten im Rahmen dieser Dissertation beantwortet werden:

- Wie wirkt sich die intraperitoneale Hämin-Applikation auf die Neutrophilenmigration in der Lunge aus?
- Ist eine inhalative Hämin-Gabe ähnlich effektiv wie die intraperitoneale Applikation im Hinblick auf die Neutrophilenmigration und wenn ja, bei welcher Dosis?
- Welchen Einfluss hat Hämin auf die vaskuläre Permeabilität?
- Beeinflusst Hämin die Menge am proinflammatorisch wirkendem Interleukin-6 im Alveolarraum?
- Hat die Gabe von Hämin auch nach stattgefundenener Noxenexposition einen Einfluss auf die Neutrophilenmigration und damit auch eine therapeutische Relevanz?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Mäuse

Für die Versuche wurden männliche C57/BL6-Mäuse (Charles River Laboratories, Sulzberg, Germany) verwendet.

Zum Zeitpunkt der Versuche waren die Tiere 8-12 Wochen alt und wogen zwischen 22 und 29 Gramm.

Sämtliche Tierversuche wurden vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (Genehmigungs-Nr. A 3/10).

#### 2.1.2 Geräte

Produktbezeichnung	Hersteller
Absaugpumpe Vario Vaccubrand BVC 21	Vaccubrand, Wertheim
Durchflusszytometer FACSort	Becton&Dickinson, Heidelberg
Eismaschine AF-10	Scotsman, Sprockhoevel
Gewebeinfiltrationsautomat TP1050	Leica biosystems, Nussloch
Histoembedder EG 11160	Leica biosystems, Nussloch
Inkubationswasserbad Typ 1003	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Labor-pH-Meter 526	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim
Mehrkanalpipette (3114000158)	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Leica DM-IRB	Leica, Wetzlar
Mikrowelle Cookmate	DEAWOO, Butzbach
Multipette Plus (4981000.019)	Eppendorf, Hamburg
Oro-Nasal and Respiratory Exposure System- ONARES	CH Technologies Inc., Westwood, NJ, USA
Photometer GENios	Tecan, Crailsheim
Photometer Ultraspec 3000 pro	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Pinzetten (BD312R, BD311R)	Aeskulap, Tuttlingen
PipetBoy acu (155000)	INTEGRA Bioscience, Fernwald
Pipetten (0.1-2500 µl)	Eppendorf, Hamburg
Plate washer Columbus Plus	Tecan, Crailsheim
Rotationsmikrotom RM 2235	Leica Biosystems, Nussloch
Scheren (BC590R, BC060R)	Aeskulap, Tuttlingen
Thermoschüttler AK 82	Infors AG, Bottmingen, CH
Vernebler Micro-Air U22	OMRON Healthcare, Illinois, USA
Vortex K-55-GE	Bender und Hobein AG, Zürich, CH

Waage HR-120-EC	A&D Instruments, Ltd, Ahrensburg
Waage Sout II	Ohaus, Kirchheim
Wärmeplatte HI 1220	Leica biosystems, Nussloch
Wasserbad HI 1210	Leica biosystems, Nussloch
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Produktbezeichnung	Hersteller
Cell culture tube 12ml, steril (163160)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Combitips Plus 10ml (0030069.269)	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser (01-2460/1)	R. Langenbrinck, Emmendingen
Einbettkassetten Rotilapo (k.113.1)	Carl Roth, Karlsruhe
Einweg-Pasteurpipetten (EA70.1)	Carl Roth, Karlsruhe
Färbeeinsatz (11-0002)	R. Langenbrinck, Emmendingen
Färbeküvette (11-0001)	R. Langenbrinck, Emmendingen
GAZIN Mullkompressen (18501)	Lohmann&Rauscher, Neuwied
GAZIN Mullkompressen steril (13620)	Lohmann&Rauscher, Neuwied
Glas Röhrchen No 2775/6 75x12mm	Assistent, Sondheim
Glaspasteurpipetten 150mm	WU, Mainz
Handschuhe Dermaclean (PFC 4303971)	Ansell, München
ImmEdge Hydrophobic Barrier PAP Pen (H-4000)	Vector Labs, Peterborough, UK
Kanülen Microlance 20G (301300)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Kanülen Microlance 24G (304100)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Kanülen Microlance 25G (300400)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Kanülen Microlance 27G (302200)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Kyroröhrchen 1,8ml Nunc (368632)	Thermo Scientific, Bonn
Mikrotiterplatte Microplate (655101)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Mikrotiterplatte Nunc Maxisorp (442404)	Thermo Scientific, Bonn
Mikrotomklinge S35	Feather, Tokyo, Japan
Multi-SafeSeal Tubes (7083.1)	Carl Roth, Karlsruhe
Nähgarn Mercifil No 50 (M3541)	Amann und Söhne, Bönningheim
Objektträger (03-0004)	R. Langenbrinck, Emmendingen

Objektträger Superfrost Plus (03-0060)	R. Langenbrinck, Emmendingen
Parafilm	Parafilm
Petrischalen Cellstar (627160)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Petrischalen Cellstar (628160)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Petrischalen Cellstar (633171)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen 10µl (70.1115)	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen 200 µl (0030.000.870)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 200µl (70760002)	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen 1000µl (686290)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen 2000µl (K315.1)	Carl Roth, Karlsruhe
Polypropylen Zentrifugenröhrchen 5ml	Becton&Dickinson, Heidelberg
Polypropylen Zentrifugenröhrchen 15ml	Becton&Dickinson, Heidelberg
Polypropylen Zentrifugenröhrchen 50ml	Becton&Dickinson, Heidelberg
Quarzglasküvetten (105-200.QS)	Hellma, Müllheim
Reaction tubes 1,5ml (616201)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Safe-lock tubes 0,5ml (00301121023)	Eppendorf, Hamburg
Spritze 1ml (300013)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Spritze Injekt 2ml (4606027V)	Braun, Melsungen
Spritze Injekt 5ml (4606051V)	Braun, Melsungen
Spritze Injekt 10ml (4606108V)	Braun, Melsungen
Stripetten 1ml (356521)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Stripetten 5ml (356543)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Stripetten 10ml (356551)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Stripetten 25ml (356525)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Transwell Plate 24 well (3472-Clesar)	Corning Inc., Wiesbaden
Venenkatheter Insyte 22G (381223)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Zählkammer C-Chip (DHC-N01)	Digital Bio, Seoul, ROK
Zellsiebe Cell Strainer 70µm (352350)	Becton&Dickinson, Heidelberg

#### 2.1.4 Chemikalien

Produktbezeichnung	Hersteller
CH <sub>3</sub> OH	Merck, Darmstadt
DAB Chromogen (S3000)	Dako, Hamburg

EDTA (ED4S)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Evans Blue (206334-10G)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formamid (F9037)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% (108597)	Merck, Darmstadt
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (100731)	Merck, Darmstadt
Hämin (H9039-1G)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
KCl (4936)	Merck, Darmstadt
NaCl (106404)	Merck, Darmstadt
NaHCO <sub>3</sub> (K10720529)	Merck, Darmstadt
NaN <sub>3</sub> (S-8032)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NaOH	Merck, Darmstadt
NH <sub>4</sub> Cl (A0988)	AppliChem, Darmstadt
PBS (D56529)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS- (D8537)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PFA 4% (P6148)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

### 2.1.5 Medien

Produktbezeichnung	Hersteller
Antigen Unmasking Solution (H-3300)	Vector Labs, Peterborough, UK
Avidin/Biotin Blocking Kit (SP-2001)	Vector Labs, Peterborough, UK
Bluing Reagent (7301)	Thermo Scientific, Bonn
Bovine serum albumine BSA (100018)	Boehringer, Mannheim
Diff-Quik (130832)	Medion Diagnostics, Düdingen, CH
Ethanol absolut (A3678)	AppliChem, Darmstadt
Eukitt (03989)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fast Nuclear Red (H-3403)	Vector Labs, Peterborough, UK
Formalin 4% (A3697)	AppliChem, Darmstadt
FSGO Gelatin (G7765)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hämatoxylin (GHS316)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Histogreen Kit Histoprime (E109)	Linaris, Dossenheim
ImmunoSet HO-1 (mouse) ELISA development set (ADI-960-071)	Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA

LPS (L6011)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Normal Goat Serum (S-1000)	Vector Labs, Peterborough, UK
Paraffin Rotiplast (6642.5)	Carl Roth, Karlsruhe
Reagent Diluent (DY995)	R&D Systems, Wiesbaden
Stop Solution (80-194)	Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA
Substrat Solution (DY999)	R&D Systems, Wiesbaden
Türk'sche Lösung (109277)	Merck, Darmstadt
Tween 20 (A4974)	AppliChem, Darmstadt
Xylol (9713.3)	Carl Roth, Karlsruhe

### 2.1.6 Medikamente

Produktbezeichnung	Hersteller
Atropinsulfat 0,5mg/ml	Radiopharm, Ulm
Desinfektionsspray Softasept	Braun, Melsungen
Heparin-Natrium 25000 I.E./5ml	Ratiopharm, Ulm
Ketamin 50mg/ml	Ratiopharm, Ulm
NaCl 0,9% 10ml	Braun, Melsungen
NaCl 0,9% 100ml	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Rompun 2% (25ml Xylazin) 20mg/ml	Bayer, Leverkusen

### 2.1.7 Enzyme, Antikörper und Kits

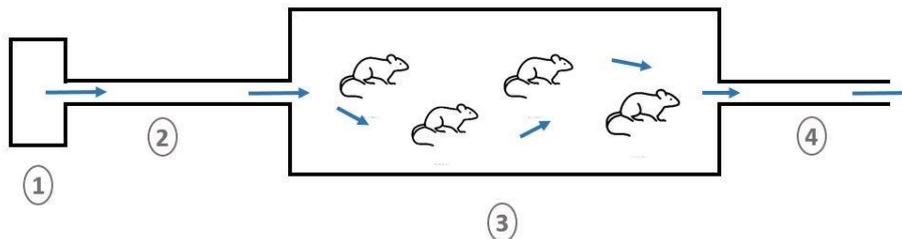
Produktbezeichnung	Hersteller
7/4 FITC (MCA771F)	AbD Serotec, Düsseldorf
Biotinylated goat anti rabbit (BA 1000)	Vector Labs, Peterborough, UK
Biotinylated rabbit anti rat (BA 4001)	Vector Labs, Peterborough, UK
CD45 PerCP (557235)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Collagenase XI (C7657)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNase (D4527)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DuoSet ELISA IL-6 (DY 406)	R&D Systems, Wiesbaden
Gr1 (RB6-8C5)	Lymphocyte Culture Center Core, University of Virginia, Charlottesville, USA

Gr1-633	Lymphocyte Culture Center Core, University of Virginia, Charlottesville, USA
HO-1 rabbit anti mouse (ADI-SPA-895-F)	Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA
Hyaluronidase (H3506)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IgG 2a FITC (553929)	Becton&Dickinson, Heidelberg
IgG 2b APC (553991)	Becton&Dickinson, Heidelberg
Normal rabbit IgG (SC-2027)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
Rat anti mouse neutrophils (MCA771GA)	AbD Serotec, Düsseldorf
Vectastain ABC-Kit (PK-4004)	Vector Labs, Peterborough, UK

## 2.2 Induktion einer pulmonalen Inflammation durch LPS- Applikation

Lipopolysaccharide (LPS) sind Bestandteile der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien und wirken nach dem Zerfall dieser Bakterien als Endotoxine. Die inhalative Applikation von LPS ruft sowohl eine systemische Inflammation als auch eine Entzündung des pulmonalen Gewebes hervor, deren Intensität dosisabhängig ist<sup>85</sup>.

LPS von *Salmonella enteritidis* wurde in 0,9%iger NaCl gelöst, sodass eine Konzentration von 0,5 g/l vorlag. 7 ml dieser Lösung wurden als Aerosol den Mäusen verabreicht. Dazu wurden jeweils 4 Mäuse in eine Vernebelungskammer gesetzt (siehe Abbildung 2), in die aus einem Vernebler über einen zuführenden Schlauch das Aerosol geleitet wurde. Ein abführender Schlauch erzeugte durch einen konstanten Unterdruck einen kontinuierlichen Luftstrom in der Kammer, der während der ca. 30-Minütigen Applikation eine gleichmäßige LPS-Inhalation gewährleistete. In der Kontrollgruppe wurden 7 ml 0,9%ige NaCl vernebelt.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der LPS-Vernebelungskammer** 1) Vernebler, 2) zuführender Schlauch, 3) Vernebelungskammer, 4) abführender Schlauch. Blaue Pfeile: Strömungsrichtung des Aerosols.

## 2.3 Verabreichung von Hämin

Für Hämin wurden zwei unterschiedliche Applikationsarten angewendet: intraperitoneale Gabe und Vernebelung.

### 2.3.1 Intraperitoneale Applikation

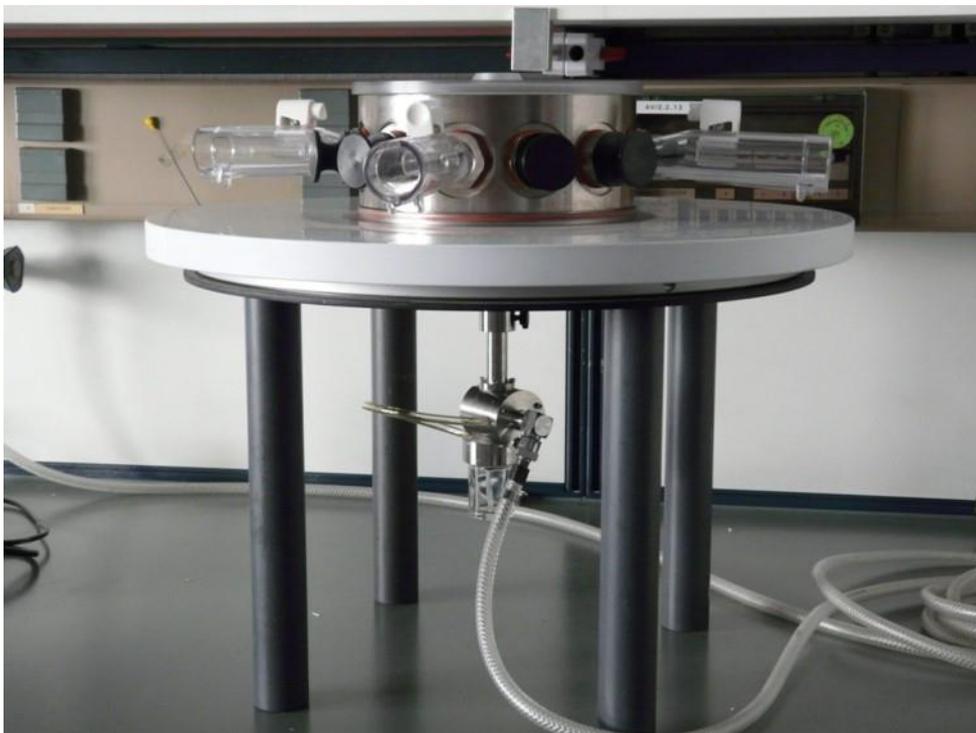
260,8 mg Hämin wurden in 1ml 0,1 M NaOH gelöst und dann 1:50 mit 9%iger NaCl verdünnt. Von dieser Lösung wurde den Mäusen 10 µl/g Körpergewicht intraperitoneal (i.p.) appliziert. Dies entspricht einer Menge von 52 mg Hämin/kg Körpergewicht.

### 2.3.2 Inhalative Applikation

Für die inhalative Applikation wurde zunächst eine Dosisfindung durchgeführt. Dabei wurden folgende Konzentrationen getestet: 2080 mg/kg, 520 mg/kg, 260 mg/kg, 52 mg/kg und 10,4 mg/kg.

Nach erfolgter Dosisfindung wurden ebenfalls 52 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Im Oro-Nasal and Respiratory Exposure System (ONARES), siehe Abbildung 3, wurde standardisiert die Menge für eine 25 Gramm wiegende Maus vernebelt, unabhängig davon, wie viele Mäuse sich im ONARES befanden. Es wurden 250 µl Hämin-Lösung (10 µl/g Körpergewicht) in 5 ml 0,9%iger NaCl gelöst und innerhalb von ca. 30 Minuten vernebelt. Anschließend wurde der am Innenrand des Vernebler-Röhrchens noch haftende Hämin-Rückstand mit 1 ml NaCl gespült und ebenfalls vernebelt.

In den Kontrollgruppen wurde, entsprechend der Verum-Trägerlösung, 0,1 M NaOH im Verhältnis 1:50 mit 9%iger NaCl vermischt und in o.g. Dosierung vernebelt bzw. intraperitoneal appliziert.

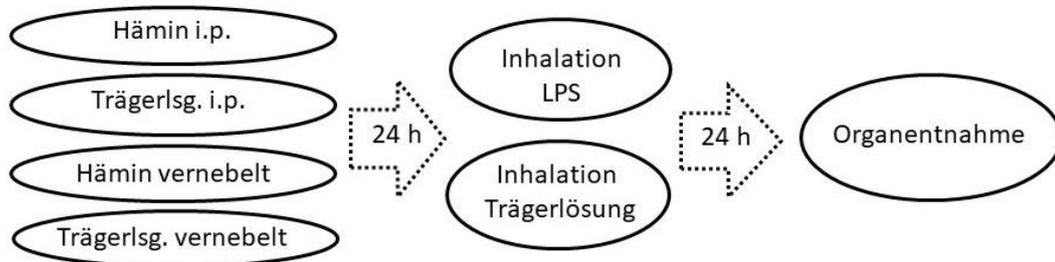


**Abbildung 3: Oro-Nasal and Respiratory Exposure System (ONARES)** .Zwischen den Beinen des Drehgestells sind der Druckluftschlauch sowie das Glasgefäß, in das die zu vernebelnde Substanz gegeben wird, zu erkennen. Oberhalb der drehbaren Tischplatte befindet sich die Expositionseinheit, um welche herum die Polycarbonat-Röhren gruppiert sind, in denen die Mäuse während der Vernebelung fixiert werden.

## 2.4 Untersuchung der Neutrophilenmigration

Um die Migration von neutrophilen Granulozyten durch die einzelnen Kompartimente des Lungengewebes genauer differenzieren zu können, wurde der sogenannte Migrationsversuch durchgeführt. Neben einer Aussage, ob sich neutrophile Granulozyten zum Zeitpunkt der Organentnahme interstitiell oder intraalveolär befanden, was mithilfe der gezielten Gabe von gefärbtem und ungefärbtem GR-1-Antikörper geschieht, erlaubt der Migrationsversuch auch eine Aussage zur Quantität der Neutrophilenmigration. Dabei wurde die Organentnahme 24 h nach LPS-Applikation gestartet, da vorhergehende Untersuchungen von Reutershan et. al. den Höhepunkt der transepithelialen Neutrophilenmigration 24 h nach Auslösen einer pulmonalen Inflammation nachweisen konnten.<sup>27</sup>

Den Mäusen wurde 24 h nach LPS- bzw. NaCl- Vernebelung (Behandlungsschema siehe Abbildung 4) 300 µl mit Alexa Fluor 633 gefärbter GR-1-Antikörper intravasal (i.v.) in die Schwanzvene appliziert (7 µl GR-1 und 293 µl NaCl).



**Abbildung 4: Behandlungsschema und zeitlicher Ablauf des Migrationsversuchs.** Trägerlsg.: Trägerlösung, i.p.: intraperitoneal, h: Stunden

Anschließend an die Injektion des Antikörpers wurde den Mäusen jeweils 300µl Anästhesielösung (siehe Tabelle 2) intraperitoneal injiziert.

**Tabelle 2: Zusammensetzung der Anästhesielösung**

Anästhesielösung	
710 µl	0,9% NaCl
50 µl	Rompun
200 µl	Ketamin

Nach Eintritt einer suffizienten Narkose wurden die Tiere in Rückenlage an allen vier Extremitäten fixiert, der Kopf in Dorsalextension befestigt und das Fell mit Alkohol desinfiziert.

Anschließend wurde das Peritoneum eröffnet und das Diaphragma von kaudal durchtrennt, wobei darauf geachtet wurde, die Lunge bei der Eröffnung des Thorax nicht zu verletzen. 6 Minuten nach Gabe des Antikörpers wurden die Bauchgefäße durchtrennt und die Lungengefäße gereinigt, indem der sich noch kontrahierende rechte Ventrikel langsam mit 3 ml phosphatpufferter Salzlösung (PBS) gespült. Hiermit wurden die Blutgefäße von nicht am vaskulären Endothel adhären PMN gereinigt.

Nun wurde die Trachea freipräpariert, intubiert und der Brochoalveolarraum mit 5ml PBS unter konstantem Druck gespült. Die Flüssigkeit der broncho-alveolären Lavage wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Bodensatz mit 1 ml Färbepuffer (siehe Tabelle 3) resuspendiert.

**Tabelle 3: Zusammensetzung des Färbepuffers**

Färbepuffer	
0,5 g	Natriumazid
5 g	bovines Serumalbumin (BSA)
500 ml	PBS

Anschließend wurden 10 µl der Proben zur Zellzählung entnommen und mit 90 µl Türk'scher Lösung vermischt. Türk'sche Lösung löst Erythrozyten auf und ermöglicht ein erleichtertes Auszählen der Zellen. Nach erfolgter Zellzählung wurde die BAL anschließend mit Färbepuffer auf eine Konzentration von 200.000 Zellen/100 µl verdünnt.

Direkt im Anschluss an die BAL-Gewinnung wurde das Herz- Lungen-Paket entnommen. Die Lungen wurden abpräpariert, mithilfe einer Schere zerkleinert und für Gewebeverdau und Antikörperfärbung in die Enzymlösung (siehe Tabelle 4) gegeben.

**Tabelle 4: Zusammensetzung der Enzymlösung**

Enzymlösung	
5 ml	PBS
5 µl	Hyaluronidase
5 µl	Kollagenase
5 µl	DNase
100 µl	ungefärbter GR-1 Antikörper

Der ungefärbte Antikörper der Enzymlösung verhinderte, dass eventuell überschüssiger, gefärbter Antikörper aus dem Gefäßendothel an PMNs aus dem Interstitium binden konnte, sodass nur intravasale PMN positiv für den Alexa-gefärbten GR1-Antikörper waren.

Der Farbstoff Alexa Fluor 633 ist lichtsensitiv, daher erfolgte die Versuchsdurchführung unter minimaler Lichtexposition der Proben (schnelles Arbeiten, Dunkelkammer während der Inkubationszeiten etc.).

Die Lunge wurde für 30 Minuten auf dem Thermoschüttler (100 Umdrehungen pro Minute -UPM) bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Daraufhin wurde das Gewebe durch ein 70 µm Zellsieb passiert und dabei mit 20 ml PBS gespült, um die Leukozyten von Bindegewebe zu trennen, und im Anschluss zentrifugiert (300g, 10 Min, 4°C). Der Überschuss wurde verworfen und das Pellet mit 5 ml Lysepuffer (siehe Tabelle 5) resuspendiert.

**Tabelle 5: Zusammensetzung des Lysepuffers**

Lysepuffer	
10,03 g	NH <sub>4</sub> Cl
1,05 g	NaHCO <sub>3</sub>
465 mg	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
125 ml	Aqua dest.
o.g. Mischung 1:10 mit destilliertem Wasser (Aq. dest) verdünnen	

Nach 5 Minuten Inkubationszeit wurde die Lyse mit 20 ml Färbepuffer gestoppt und die Flüssigkeit zentrifugiert (300g, 10 Min, 4 °C). Im Anschluss wurde das Pellet in 3 ml Färbepuffer resuspendiert. Von dieser Flüssigkeit wurden 10µl abgenommen und mit 90µl Türk'scher Lösung verdünnt und ausgezählt. Im Anschluss wurde die Zellsuspension mit Färbepuffer auf 200.000 Zellen/100 µl verdünnt.

Nun wurden die BAL- bzw. Lungengewebelösungen für die Durchflusszytometrie gefärbt. Dafür wurden zunächst die Antikörper nach dem in Tabelle 6 dargestellten Schema mit PBS verdünnt.

**Tabelle 6: Schema der Antikörper-Verdünnung**

Antikörper- Verdünnung	
7/4 FITC (Stock- Konzentration 0,1mg/ml)	1:5
CD45 PerCP (Stock- Konzentration 0,2mg/ml)	1:10
GR-1 633 (Stock- Konzentration 0,5mg/ml)	1:10
IgG2a FITC (Stock- Konzentration 0,5mg/ml)	1:25
IgG2b APC (Stock- Konzentration 0.2mg/ml)	1:4

Jeweils 100 µl Zellsuspension wurden nun mit den verdünnten Antikörpern gefärbt (Schema siehe Tabelle 7). Dabei erhielt nur die BAL- Probe den gefärbten Antikörper GR-1 633.

**Tabelle 7: Färbeschema BAL- und Lungenproben**

Antikörper (je 1µl)	BAL	Lunge
7/4 FITC	✓	✓
CD45 PerCP	✓	✓
GR-1 633	✓	✗

Des Weiteren wurde zur Isotypenkontrolle eine Färbung von BAL- und Lungenprobe mit 1µl CD45 PerCP, IgG2a FITC und IgG2b APC durchgeführt, und zum späteren „Gating“ jeweils eine Probe mit einer Einzelfärbung (siehe Tabelle 8).

**Tabelle 8: Färbeschema Isotypenkontrolle und Gating-Proben**

Probe Nr. 1	Probe Nr. 2	Probe Nr. 3	Probe Nr. 4	Probe Nr. 5
ungefärbt	7/4 FITC	CD45 PerCP	GR-1 633	CD45PerCP IgG2a FITC IgG2b APC

Nach 20-minütiger Inkubationszeit (4 °C) wurden die Proben zwei Mal mit jeweils 2 ml Färbepuffer gewaschen und zentrifugiert (300g, 5 Min. 4°C) und im Anschluss die Pellets mit jeweils 400 µl Fixierlösung resuspendiert und fixiert. Die Fixierlösung setzte sich aus jeweils der gleichen Menge Färbepuffer und 4% Paraformaldehyd (PFA) zusammen.

Nun wurde mit den Zellen im Durchflusszytometer das sogenannte „Fluoreszenz Activated Cell Scanning“ (FACS) durchgeführt.

Beim FACS werden Zellen einzeln an einem Lichtstrahl vorbei geführt. Die Lichtbrechung in gleiche Richtung zum ausgesandten Licht erlaubt dabei eine Aussage über die Größe der Zelle, die seitliche Brechung des Lichtes über die Granularität der Zelle und die Struktur des Zellkerns. Mit Hilfe der zusätzlichen Färbung der Zelle durch fluoreszenz-markierte Antikörper und deren Anregung im FACS-Gerät durch Laser der entsprechenden Wellenlänge ist eine relativ genaue Aussage zu Zellzahl und Zellart einer Probe möglich.

Bei der Auswertung wurde mit Hilfe des sogenannten Gatings gearbeitet, um innerhalb des zweidimensionalen Punktediagramms weitere Parameter einfließen zu lassen, zusätzlich zu den zwei auf der x- und y-Achse angezeigten. Durch Gating kann ein Teil aus der Gesamtheit der gemessenen Zellen ausgewählt werden, der in den weiteren Analysen untersucht werden soll. So wurde es möglich, aus dem Lungenhomogenisat die intravasalen PMN von den interstitiellen PMN zu unterscheiden. Denn die intravasalen PMN waren, im Gegensatz zu den interstitiellen PMN, positiv für den fluoreszierenden Farbstoff Alexa Fluor 633.

#### **2.4.1 Hämin-Gabe nach LPS-Vernebelung**

Um zu sehen, welchen Einfluss Hämin-Gabe nach stattgefundenener pulmonaler Schädigung hat, wurde ein weiteres Versuchsetting erstellt. Dabei wurde entweder zeitgleich mit LPS-Inhalation oder 2 Stunden nach LPS-Inhalation Hämin inhalativ

verabreicht (s. Abbildung 5) und die Auswirkung dieser Behandlung auf die Neutrophilenmigration ermittelt.

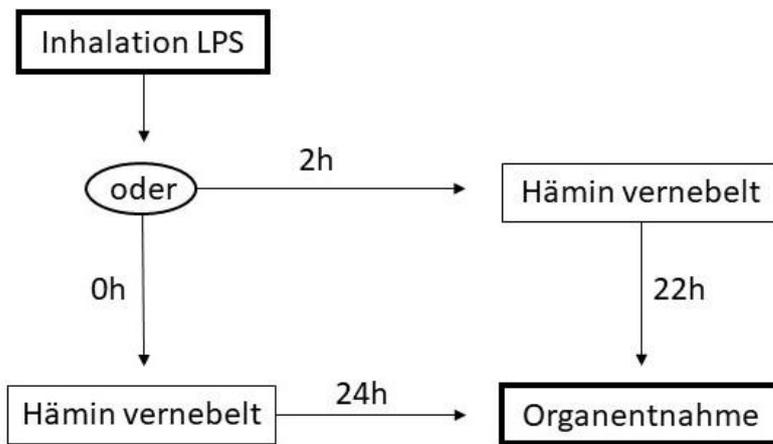


Abbildung 5: Zeitlicher Ablauf von Hämin-Gabe zeitgleich bzw. nach LPS-Inhalation

## 2.5 Herstellung histologischer Präparate der Lunge

Um immunhistochemische Färbungen von Granulozyten und HO-1 im Lungenparenchym durchführen zu können, wurden bei einer zusätzlichen Gruppe von Mäusen histologische Präparate der Lungen gewonnen.

Dazu wurden die Mäuse entsprechend des Versuchsschemas vorbehandelt (siehe Abbildung 6).

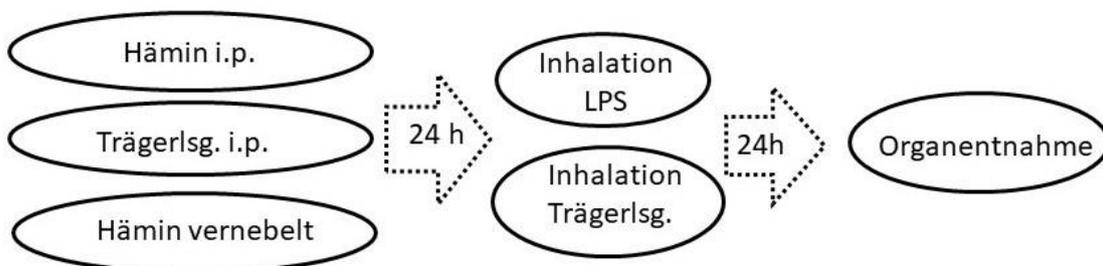


Abbildung 6: Behandlungsschema und zeitlicher Ablauf der Organentnahme für histologischer Präparate

24h nach LPS- bzw. NaCl-Vernebelung wurden die Mäuse anästhesiert und der Thorax vom Bauchraum aus eröffnet.

Die Lungengefäße wurden anschließend gereinigt, indem die Bauchgefäße durchtrennt wurden und der sich noch kontrahierende, rechte Ventrikel mit 3 ml PBS gespült wurde. Dabei zeigte sich eine Weißfärbung der Lunge.

Nun wurde die Trachea mit Hilfe eines peripheren Venenkatheters intubiert und für 15 Minuten mit 4%igem Formaldehyd infundiert, wobei der Flüssigkeitspegel mit 25 cm H<sub>2</sub>O passiv in das luftleitende System drang. Das gewährleistete eine ausreichende Perfundierung, ohne das Lungengewebe dabei durch zu hohen Druck zu zerstören.

Nach Entnahme der größeren thorakalen Organe wurden rechte und linke Lunge vorsichtig freipräpariert, in Einbettkassetten gelegt und für 24 h in Formaldehyd belassen. In dieser Zeit bewirkte das Formaldehyd durch Denaturierung der Proteine eine Fixierung des Gewebes.

Um die Lunge in feine Scheiben schneiden zu können, erfolgte nun die Einbettung in Paraffin. Durch das Einlegen für etwa 60 Minuten in 70%igem Alkohol wurde überschüssiges Formaldehyd aus dem Gewebe geschwemmt. Die weiteren Schritte der Paraffineinbettung erfolgten automatisiert mit Hilfe eines Gewebeinfiltrationsautomaten. Anschließend wurden die Lungen mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms in 7 µm dicke Scheiben geschnitten. Dabei wurde versucht, möglichst transversale Schnitte zu erhalten. Mithilfe von warmem Wasser und einem Pinsel wurden die Schnitte vereinzelt und jeweils 3 auf einen Objektträger gegeben. Die Fixierung erfolgte durch Trocknen auf einer Wärmeplatte.

### **2.5.1 Immunhistochemische Färbung von Granulozyten**

Um ermitteln zu können, inwieweit sich LPS-Vernebelung und Häminapplikationsarten auf die Neutrophilenzahl im Lungengewebe auswirkt, wurde eine immunhistochemische Färbung der Granulozyten durchgeführt. Dabei wurde als Primärantikörper rat-anti-mouse Antikörper verwendet und als Sekundärantikörper ein biotinylierter rabbit-anti-rat-Antikörper. Die Färbung erfolgte mit 3,3 Diaminobenzidin (DAB). Diese Färbetechnik ermöglichte eine deutliche Verstärkung des Signals.

Zunächst wurden die Schnitte entparaffiniert und rehydriert. Dabei wurde das in Tabelle 9 dargestellte Schema unter jeweils 5 Minuten Einwirkzeit verwendet.

**Tabelle 9: Entparaffinierungsschema**

Entparaffinierungsschema		
3x	Xylol	
2x	Ethanol	100%
2x	Ethanol	95%
1x	Ethanol	70%
1x	Ethanol	50%
2x	Aqua dest	

Zum Blocken der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte 30 Min bei Raumtemperatur in einer Lösung aus 200 ml Methanol und 3 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert und anschließend für 5 Minuten in Aqua dest gespült.

Um die durch die Fixierung quervernetzten Antigenproteine wieder zu renaturieren, wurden die Proben für 20 Minuten bei 600 Watt in der Mikrowelle in verdünnter Unmasking Solution (480 ml Aqua dest und 4,5 ml Unmasking Solution) erhitzt und nach dem Abkühlen für 5 Minuten in PBS gespült.

Nun wurden die Schnitte auf den Objektträgern mit einem PAP-Pen eingekreist und mit Avidin Blocking Solution (siehe Tabelle 10) in einer feuchten Kammer 60 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

**Tabelle 10: Zusammensetzung der Avidin-Blocking-Solution für Granulozyten-Färbung**

Avidin Blocking Solution	
6 ml	0,5% FSGO/PBS
600 µl	Normal Rabbit Serum
24 Tropfen	Avidin Blocking Solution

Im Anschluss wurde die Flüssigkeit abgesaugt, die Schnitte für 5 Min. in PBS bei RT gespült, der Primär-Antikörper aufgetragen (Schema siehe Tabelle 11) und bei 4 °C über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert.

**Tabelle 11: Schema für das Auftragen des Primär-Antikörpers für Granulozyten-Färbung**

Negativkontrolle	-	1 ml FSGO/PBS 0,5%	100 µl Normal Rabbit Serum	4 Tropfen Biotin Blocking Solution
Isotypenkontrolle	1µl Normal- Rat-IgG	1 ml FSGO/PBS 0,5%	100 µl Normal Rabbit Serum	4 Tropfen Biotin Blocking Solution
PMN- Färbung	1 µl Rat- anti- Mouse Ly-6B.2	1 ml FSGO/PBS 0,5%	100 µl Normal Rabbit Serum	4 Tropfen Biotin Blocking Solution

Nach Absaugen und 5 Minütigem Spülen in 0,5%iger FSGO/PBS wurde der Sekundärantikörper aufgetragen (siehe Tabelle 12) und für 60 Min bei RT inkubiert.

**Tabelle 12: Zusammensetzung der Sekundärantikörper-Lösung für Granulozyten-Färbung**

Lösung für Sekundärantikörper	
50 µl	Biotinyl. Rabbit-anti-Rat IgG
5 ml	0,5%FSGO/PBS
500 µl	Normal Rabbit Serum

Nach Absaugen und Spülen (FSGO/PBS, 5 Min) wurde Avidin-Biotin-Komplex-Lösung (ABC-Lsg., Vectastain Kit) aufgetragen (siehe Tabelle 13) und für 30 Min bei RT inkubiert, wodurch mit Peroxidase gekoppelte Avidin-Biotin-Komplexe an den biotinylierten Sekundärantikörper binden konnten.

**Tabelle 13: Zusammensetzung der Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Lösung**

ABC-Lsg. (Vectastain)	
1ml	PBS
20 µl	Solution A
20 µl	Solution B

Nun wurde die Wirksamkeit der ABC-Lösung getestet, indem in die verbliebene Flüssigkeit etwas DAB- Lösung (Zusammensetzung s. Tabelle 14) gegeben wurde. Die Meerrettichperoxidase als Reporterenzym am Avidin-Biotin-Komplex bewirkte eine deutliche Braunfärbung des DAB.

**Tabelle 14: Zusammensetzung der DAB-Lösung**

DAB-Lösung (Sigmafast)	
1 Tablette	DAB
1 Tablette	Carbamidperoxid
1 ml	Nukleasefreies Wasser

Die Schnitte wurden nun mit Puffer gespült, die DAB-Lösung aufgetragen und 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde zwei Mal mit Aq. dest für je 3 Minuten gespült. Mit Hämatoxylin erfolgte nun die Gegenfärbung. Nach 5-minütigem Spülen unter fließendem Leitungswasser erfolgte das Bläuen mit Bluing Reagent.

Das Dehydrieren erfolgte analog des in Tabelle 9 genannten Schemas in entgegengesetzter Reihenfolge, anschließend wurde in Eukitt eingedeckt.

### **2.5.2 Immunhistochemische Färbung der HO-1**

Um ermitteln zu können, inwieweit sich LPS und Hämin auf die Aktivität der Hämoxygenase-1 im Lungengewebe auswirkt, wurde eine immunhistochemische Färbung der HO-1 durchgeführt. Dabei wurde als Primärantikörper rabbit-anti-mouse-Antikörper verwendet, als Sekundärantikörper ein biotinylierter goat-anti-rabbit-Antikörper. Die im Gewebe exprimierte HO-1 wurde mit HistoGreen blaugrün gefärbt, die Zellkerne mit Nuclear Fast Red hellrot gefärbt.

Zunächst wurden die Schnitte analog des oben genannten Schemas entparaffiniert, rehydriert, die endogene Peroxidase geblockt und die Antigene demaskiert.

Nun erfolgte für 60 Minuten bei RT das Avidin-Blocking (Zusammensetzung siehe Tabelle 15).

**Tabelle 15: Zusammensetzung der Avidin-Blocking-Solution für HO-1-Färbung**

Avidin-Blocking-Solution	
6 ml	0,5% FSGO/PBS
600 µl	Normal Goat Serum
24 Tropfen	Avidin Blocking Solution

Nach Spülen mit PBS folgte nun das inkubieren mit dem Primärantikörper nach dem in Tabelle 16 aufgeführten Schema:

**Tabelle 16: Schema für die Inkubation mit Primärantikörper für HO-1-Färbung**

Negativkontrolle	-	1 ml FSGO/PBS 0,5%	100 µl Normal Goat Serum	4 Tropfen Biotin Blocking Solution
Isotypenkontrolle	1µl Normal- Rabbit-IgG	1 ml FSGO/PBS 0,5%	100 µl Normal Goat Serum	4 Tropfen Biotin Blocking Solution
HO-1 Färbung	1 µl HO-1 rabbit-Ak (Enzo)	1 ml FSGO/PBS 0,5%	100 µl Normal Goat Serum	4 Tropfen Biotin Blocking Solution

Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C.

Nach Spülen mit FSGO/PBS- erfolgte nun das Inkubieren mit dem Sekundärantikörper (s. Tabelle 17) für 60 Minuten bei RT.

**Tabelle 17: Zusammensetzung der Sekundärantikörper-Lösung für HO-1-Färbung**

Lösung für Sekundärantikörper	
50 µl	Biotinyl. Goat-anti-Rabbit IgG
5 ml	0,5%FSGO/PBS
500 µl	Normal Goat Serum

Danach wurde die Avidin-Biotin-Komplex-Lösung zugegeben (s. Tabelle 13) und anschließend an das Spülen mit Histogreen (Histoprime Kit) gemäß den Herstellerangaben für 5 Minuten gefärbt.

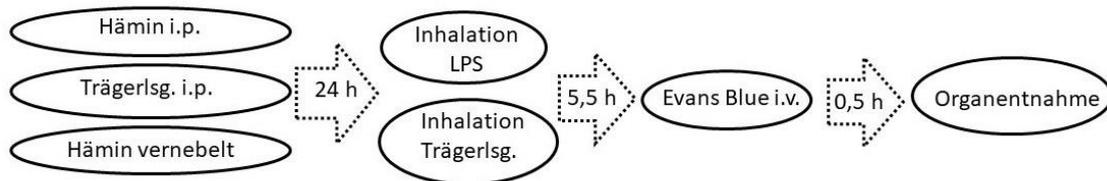
Anschließend erfolgte die 10-minütige Gegenfärbung mit Fast Nuclear Red (Vector Laboratories).

Nach dem Dehydrieren (Schema s.o.) erfolgte das Eindecken in Eukitt.

## 2.6 Untersuchung der Gefäßpermeabilität mit Hilfe von Evans Blue

Um herauszufinden, inwieweit sich LPS- und Hämin-Gabe auf die Gefäßpermeabilität auswirken, wurde in einer weiteren Gruppe von Mäusen die extravasale Evans Blue-Konzentration photometrisch bestimmt. Evans Blue ist ein Azofarbstoff, der mit sehr großer Affinität an Albumin bindet<sup>86</sup> und dessen interstitieller Nachweis daher eine Aussage über den Grad der Schädigung der vaskulären Membran zulässt<sup>87</sup>.

5 ½ Stunden nach LPS-Gabe (Behandlungsschema und zeitlicher Ablauf s. Abbildung 7) wurde Evans Blue in einer Dosierung von 20 mg/kg Körpergewicht intravenös appliziert. Dazu wurden 10 mg Evans Blue in 10 ml NaCl gelöst und von dieser Lösung 20 µl/g Körpergewicht in die Schwanzvene gespritzt. Die Reste dieser Lösung wurden zum Ansetzen der Standardreihe zur Kalibrierung des Photometers verwendet.



**Abbildung 7: Behandlungsschema und zeitlicher Ablauf für Evans Blue-Versuch**

6 Stunden nach LPS-Inhalation, also 30 Minuten nach Evans Blue- Gabe, erfolgte die Probenentnahme. Dazu wurden die Mäuse analog des o.g. Schemas anästhesiert und der Thorax eröffnet. Mit einer heparinisierten Spritze wurde 1 ml Blut aus dem noch pulsierenden Herz entnommen. Das Blut wurde anschließend zentrifugiert (13.000 UPM, 15 Min, 4 °C) und das Plasma abpipettiert.

Anschließend an die Blutentnahme wurde die Vena Cava infrahepatisch durchtrennt und der noch schlagende rechte Ventrikel vorsichtig mit 3 ml PBS gespült, um die Lungengefäße von Blut zu reinigen. Dabei zeigte sich eine Weißfärbung des Lungengewebes. Nun wurde die Lunge mitsamt der mediastinalen Strukturen entnommen und anschließend die einzelnen Lungenlappen abpräpariert, wobei auf eine möglichst gründliche Entfernung der Gefäße und Hauptbronchien geachtet wurde. Nun wurden die Lungen gewogen, pro 100 mg Lunge 350 µl PBS zugegeben, und dann homogenisiert. Das Homogenisat wurde 1:3 mit Formamid versetzt und über Nacht auf dem Thermoschüttler inkubiert (30 UPM, 12-18h, 60 °C). Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (5000 UPM, 30 Min, RT) und der Überstand abpipettiert. Vom Überstand wurden 200 µl/Well in Triplikaten auf eine 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert.

Das Plasma wurde zunächst 1:5 mit PBS verdünnt und dann ebenfalls in Triplikaten auf die Platte gegeben. Anschließend wurde die Absorption der Proben zusammen mit der

Standardreihe bekannter Konzentration im Photometer bei 620 nm und 740 nm gemessen und mithilfe der Messergebnisse der Evans Blue-Gehalt im Lungengewebe berechnet.

## 2.7 IL-6-Bestimmung in der BAL mittels ELISA

Mithilfe des Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) kann eine quantitative Aussage über Antigene (z.B. Proteine) gemacht werden. Hier wurde zum Nachweis des Zytokins IL-6 bei einer weiteren Gruppe von Mäusen der sogenannte Sandwich-ELISA angewendet. Das Behandlungsschema und der zeitliche Ablauf sind in Abbildung 8 dargestellt.

Beim Sandwich-Elisa werden zwei Antikörper (AK) angewendet, die an unterschiedliche Epitope des Antigens binden. Der eine AK ist an ein festes Medium (hier eine 96 Well-Platte) gebunden, und bindet das Antigen an die Mikrotiterplatte. Der zweite AK ist für die Farbumschlagsreaktion notwendig. Mit Hilfe einer Standardreihe mit bekannter Antigenkonzentration kann eine Kalibrierungskurve erstellt werden, anhand derer die Antigenmenge photometrisch bestimmt werden kann.

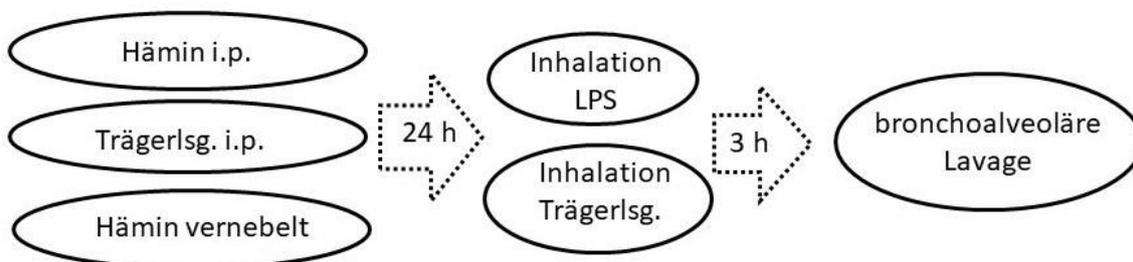


Abbildung 8: Behandlungsschema und zeitlicher Ablauf der Zytokinbestimmung

Der ELISA erfolgte mit dem DuoSet ELISA-Kit von R&D-Systems.

Die narkotisierten Mäuse wurden tracheotomiert und mit PBS 2 ml BAL entnommen. Die BAL-Flüssigkeit wurde zentrifugiert (10 Min, 4 °C 1300 UPM) und auf die zuvor mit dem coat-Antikörper versehene Platte pipettiert. Anschließend wurde 3x mit Waschpuffer gewaschen, und der biotinylierte Detektionsantikörper zugegeben. Die Inkubation erfolgte 2 Stunden bei RT. Als Reporterenzym erfolgte nun die Zugabe von Streptavidin-Meerrettichperoxidase, welches nach Zugabe von Tetramethylbenzidin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> einen

blauen Farbumschlag bewirkte. Nach 20 Minuten wurde die Reaktion mit Schwefelsäure gestoppt, was zu einer Gelbfärbung führte. Nun wurde die Antigenmenge bei 450 nm und 540 nm photometrisch bestimmt.

## 2.8 Statistik

Zur Durchführung der statistischen Analysen wurde die Software GraphPad Prism 5.3 (GraphPad Software, San Diego, CA) verwendet. Um die Versuchsgruppen mit den Kontrollgruppen zu vergleichen, wurde zunächst ein one-way Analysis of Variance (ANOVA)-Test durchgeführt, gefolgt von einem Bonferoni post hoc-Test.

Die Resultate wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt und das Signifikanzniveau bei einem p-Wert  $< 0,05$  festgesetzt.

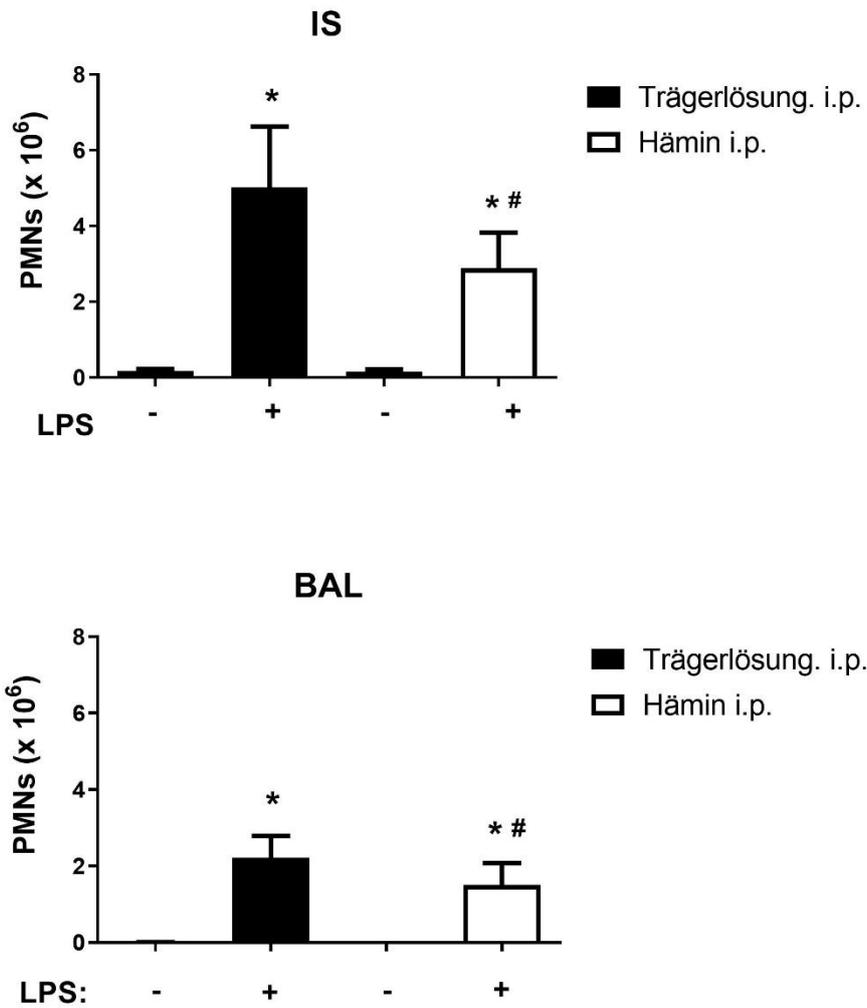
## 3. Ergebnisse

### 3.1 Untersuchung der Neutrophilenmigration ins Lungengewebe

Um den Einfluss von intraperitonealer, inhalativer und nachträglicher Hämin-Gabe auf die pulmonale Inflammation zu ermitteln, wurde die interstitielle und intraalveoläre Neutrophilenzahl im Lungengewebe durchflusszytometrisch bestimmt.

Bei Mäusen, welche i.p. mit Trägerlösung behandelt wurden, kam es nach LPS-Inhalation sowohl intraalveolär als auch interstitiell zu einer höheren Anzahl an Neutrophilen (siehe Abbildung 9).

Nach intraperitonealer Hämin-Gabe und LPS-Inhalation kam es zu einer deutlichen Verminderung des Neutrophilen-Einstroms in Interstitium und Alveolarraum. Eine reine Hämin-Gabe ohne pulmonale Inflammation zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Negativkontrolle.

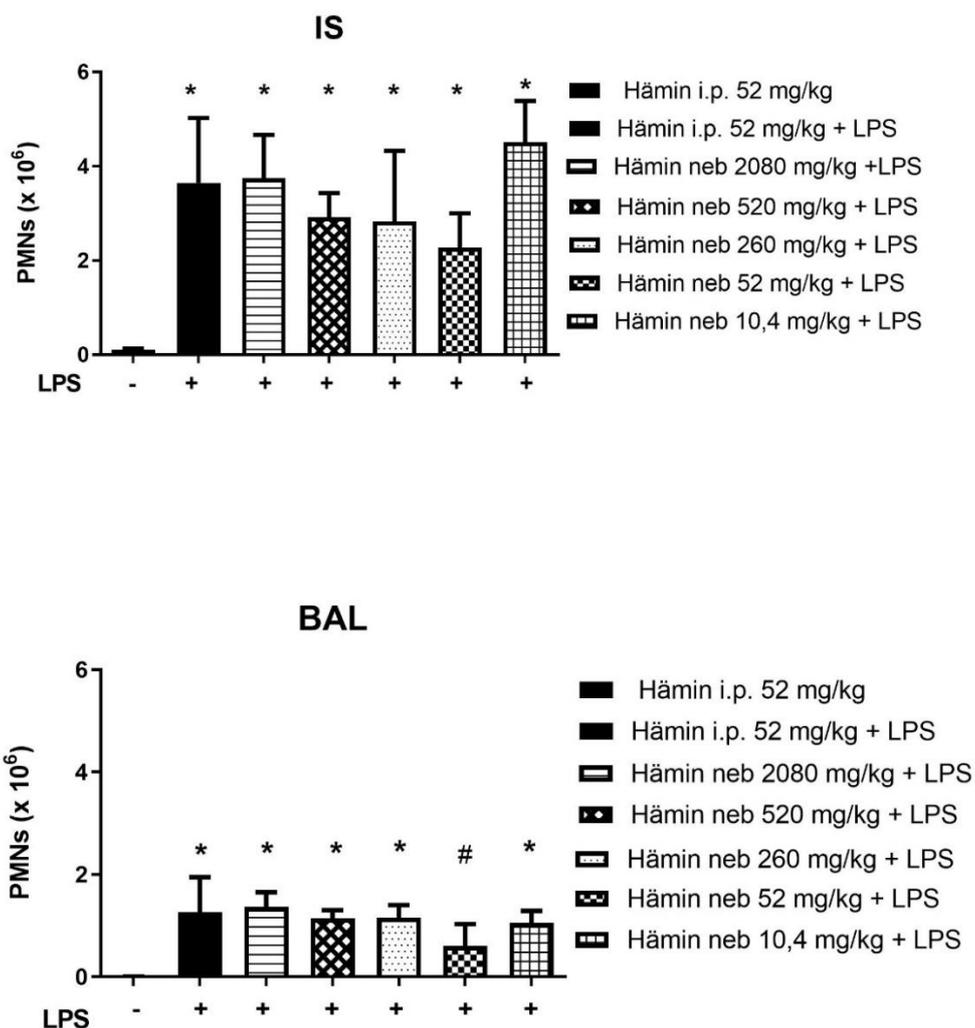


**Abbildung 9: Neutrophilenzahl im Lungengewebe mit und ohne intraperitoneale Gabe von Hämin .**  
 IS: interstitiell, BAL: intraalveolär, i.p.: intraperitoneal. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Die ersten beiden Balken von links zeigen mit Trägerlösung vorbehandelte Tiere, der dritte und vierte Balken von links mit Hämin i.p. vorbehandelte Tiere. In der BAL hatten beide Gruppen ohne LPS-Behandlung einen PMN-Wert von 0,00. \*  $P < 0,05$  zur Kontrollgruppe ohne LPS, #  $P < 0,05$  zur Kontrollgruppe mit LPS,  $n \geq 6$  Tiere pro Gruppe.

Für die Aerosol-Dosisfindung wurde die Wirkung mit intraperitonealer Gabe der Standard-Dosis von 52 mg Hämin verglichen (siehe Abbildung 10).

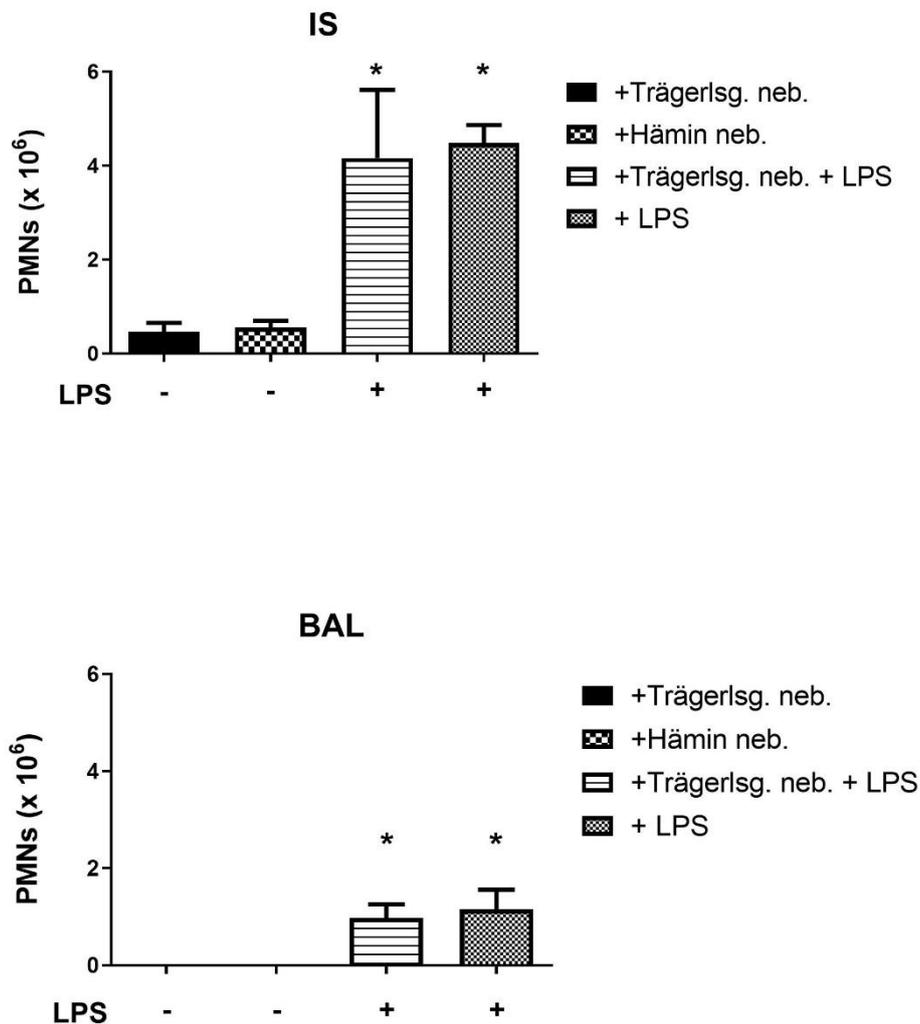
Zwischen Aerosol + LPS und Hämin i.p. + LPS zeigte sich bei allen getesteten Dosen kein relevanter Unterschied in der Neutrophilenzahl im Interstitium. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich jedoch zur Negativkontrolle.

Im Alveolarraum kam es mit 52 mg Hämin neb + LPS zu einem verminderten Anstieg der PMN-Zahl im Vergleich von Hämin i.p. + LPS. Alle anderen Aerosol + LPS-Gruppen zeigten keinen signifikanten Unterschied zur Hämin i.p. + LPS-Gruppe.



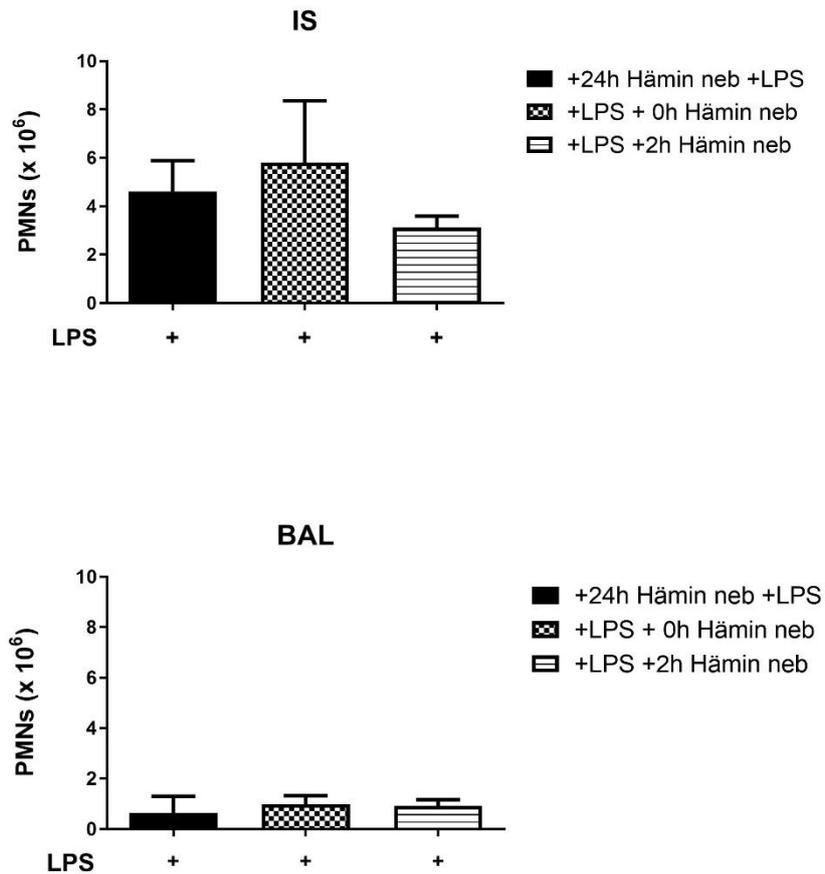
**Abbildung 10: Ergebnisse der Dosisfindung für die inhalative Gabe von Hämin** IS: interstitiell, BAL: intraalveolär, neb: nebulized (vernebelt), i.p.: intraperitoneal. Dosisangaben pro kg Körpergewicht. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung. In der BAL hatte die Kontrolle ohne LPS-Behandlung einen PMN-Wert von 0,00. \* P<0,05 zur Kontrollgruppe ohne LPS, # P<0,05 zur Kontrollgruppe mit LPS. Anzahl der Tiere in den beiden Kontrollgruppen n= 4, Gruppe „Hämin 2080 mg/kg“ n=3. Restliche Gruppen n ≥6 Tiere. Teile der Daten wurden veröffentlicht in <sup>88</sup>.

In der Dosisfindung war den Tieren in der Negativ-Kontrollgruppe (ohne LPS) zugleich Hämin i.p. verabreicht worden. Darüber hinaus war kein Vergleich zwischen inhalativer Verabreichung von Hämin und Trägerlösung erfolgt. Daher wurde als nächstes ein Vergleich von inhalativer Hämin-Gabe, inhalativer Gabe der Trägerlösung mit- und ohne LPS, sowie alleiniger LPS-Gabe durchgeführt (siehe Abbildung 11). Dabei zeigte sich sowohl interstitiell als auch intraalveolär zwischen vernebeltem Placebo und vernebeltem Hämin kein signifikanter Unterschied. Reine LPS-Gabe führten zu einem deutlichen, statistisch signifikanten Anstieg der PMNs in beiden Kompartimenten, der bei vernebelter Trägerlösung + LPS vergleichbar hoch war.



**Abbildung 11: Vergleich der Neutrophilenzahl nach Vernebelung von Hämin oder Placebo** IS: interstitiell, BAL: intraalveolär, neb: nebulized (vernebelt), Trägerlsg.: Trägerlösung. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. In der BAL hatten beide Gruppen ohne LPS-Behandlung einen PMN-Wert von 0,00. \*  $P < 0,05$  zur Kontrollgruppe ohne LPS, n=4 Tiere pro Gruppe.

Bei der Untersuchung auf Wirksamkeit von vernebeltem Hämin nach stattgefundener pulmonaler Inflammation (siehe Abbildung 12) zeigte sich sowohl interstitiell als auch im Alveolarraum kein Unterschied in der PMN-Zahl, unabhängig ob 24h vor LPS-Gabe, zeitgleich mit LPS, oder 2 Stunden danach Hämin verabreicht wurde.



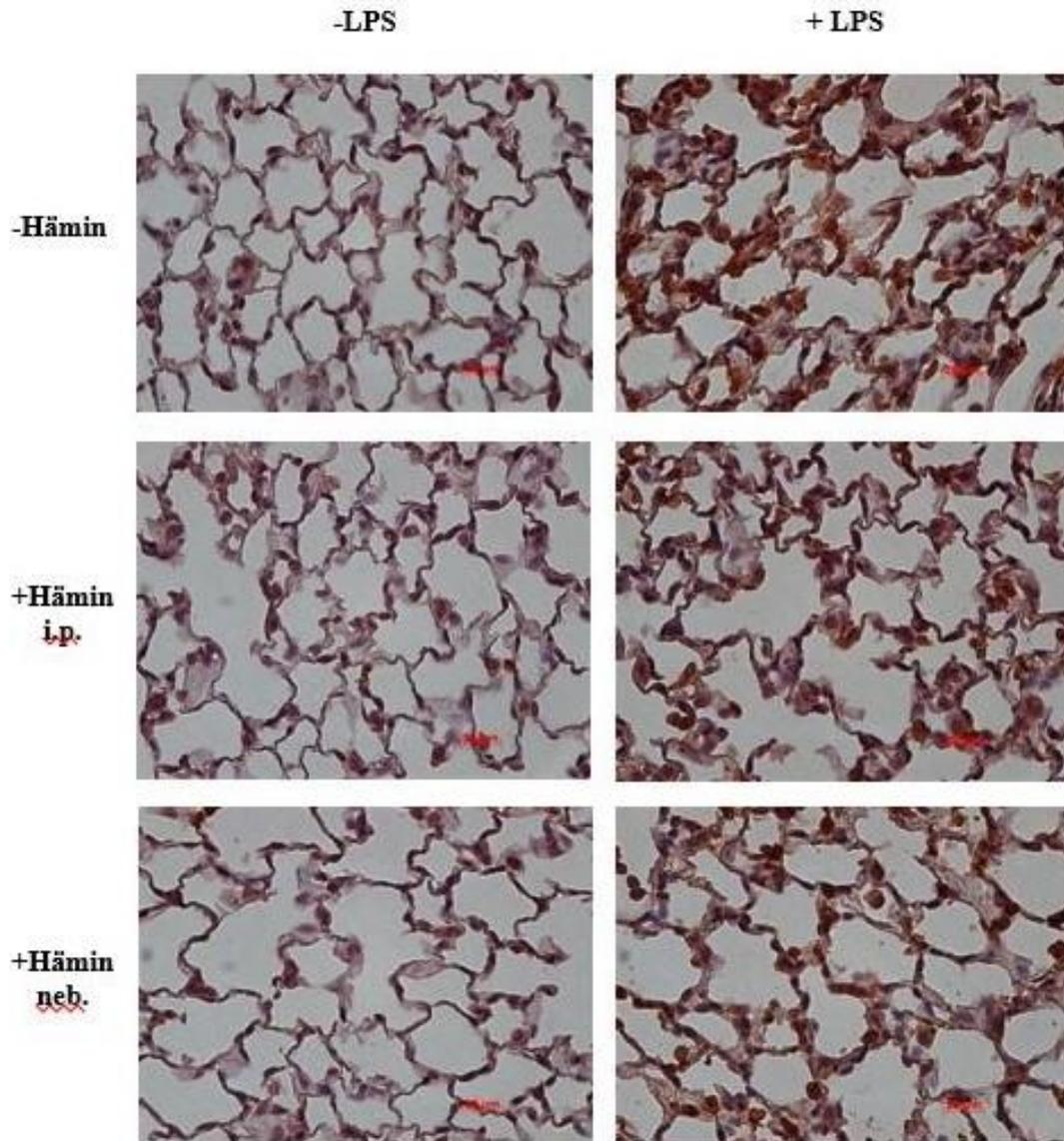
**Abbildung 12: Auswirkung von Hämin-Gabe nach LPS- Vernebelung auf die Neutrophilenzahl** IS: interstitiell, BAL: intraalveolär, neb: nebulized (vernebelt). Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Anzahl der Mäuse „LPS +2 h Hämin“ n=3, restliche Gruppen n= 4 Tiere.

### 3.2 Anfärbung von PMN im Lungengewebe

Da neutrophile Granulozyten eine wichtige Rolle im Rahmen der pulmonalen Inflammation darstellen, wurden histologische Färbungen der PMN im Lungengewebe durchgeführt (siehe Abbildung 13). Mithilfe eines Sekundärantikörpers wurde dabei eine Signalverstärkung erzielt und die PMN braun eingefärbt.

Ohne pulmonale Inflammation zeigten sowohl die Lungen der unbehandelten Kontrollgruppe als auch die Lungen von mit Hämin i.p. und Hämin vernebelt behandelten Tieren schlanke Alveolarsepten bei nur sporadischem Vorhandensein von PMN. Insgesamt war in der Gruppe ohne LPS-Gabe das histologische Bild sehr einheitlich und im Prinzip keine Unterschiede zwischen Negativkontrolle, Hämin i.p. und Hämin neb. zu erkennen.

24 Stunden nach LPS-Vernebelung zeigten sich bei den Tieren ohne Hämin-Gabe deutlich ödematös verdickte Alveolarsepten und stark vermehrtes Auftreten von neutrophilen Granulozyten. Im Vergleich dazu zeigten die mit Tiere, welche neben LPS Hämin erhalten hatten, weniger stark verdickte Alveolarsepten und weniger vielen Granulozyten. Dabei zeigte sich, unabhängig von der Applikationsart, in beiden Hämin-Gruppen nach pulmonaler Inflammation ein ähnliches Bild. (siehe Abbildung 13).



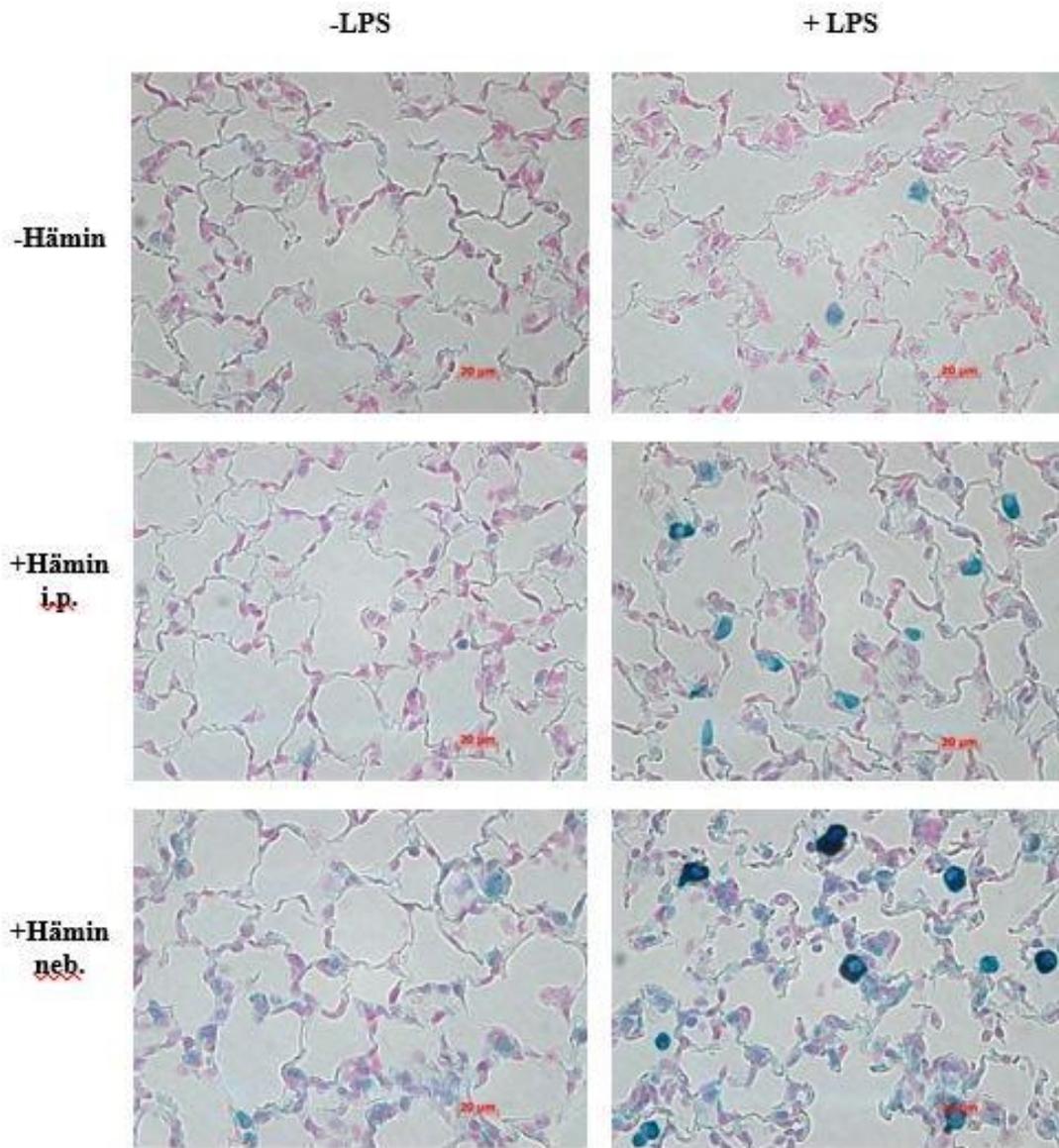
**Abbildung 13: Immunhistochemische Färbung der PMN im Lungengewebe** Mithilfe eines Brückenantikörpers wurden die Granulozyten mit der ABC-Komplex-Methode braun angefärbt. Oben links die Negativkontrolle ohne LPS- und Hämin-Gabe. In der rechten Reihe von oben nach unten, jeweils 24 h nach LPS-Gabe: ohne Hämin, Hämin intraperitoneal (i.p.), Hämin vernebelt (neb.). In der linken Reihe jeweils ohne LPS-Gabe. Vergrößerung 40-fach, repräsentativ für n=2 Tiere pro Gruppe.

### 3.3 Anfärbung von HO-1 im Lungengewebe

Um die Expression von HO-1 im Lungengewebe beurteilen zu können, wurde sie in einer immunhistochemischen Färbung mit HistoGreen angefärbt (siehe Abbildung 14).

In der unbehandelten Kontrollgruppe zeigte sich keine Färbung der HO-1. Die Probe mit peritonealer Hämin-Gabe zeigte allenfalls eine leichte Anfärbung der HO-1, war jedoch kaum von der Negativkontrolle zu unterscheiden. Bei Hämin-Gabe als Aerosol zeigte sich eine zartblaue Färbung von Lungengewebe und vereinzelt Makrophagen.

Die Gruppe LPS-behandelter Tiere zeigte keine nennenswerte Färbung des Lungengewebes, jedoch waren vereinzelt Makrophagen mit blauer HO-1 Färbung zu erkennen. LPS induzierte pulmonale Inflammation kombiniert mit intraperitonealer Hämin-Gabe zeigte eine zartblaue Färbung des Lungengewebes und eine Vielzahl an deutlich blau gefärbten Makrophagen. LPS- und vernebelte Hämin-Gabe führten zu einer deutlichen Blaufärbung des Lungengewebes und einer großen Anzahl an teilweise nahezu dunkelblau gefärbten Makrophagen als Hinweis auf eine deutlich erhöhte Menge an HO-1 (siehe Abbildung 14).

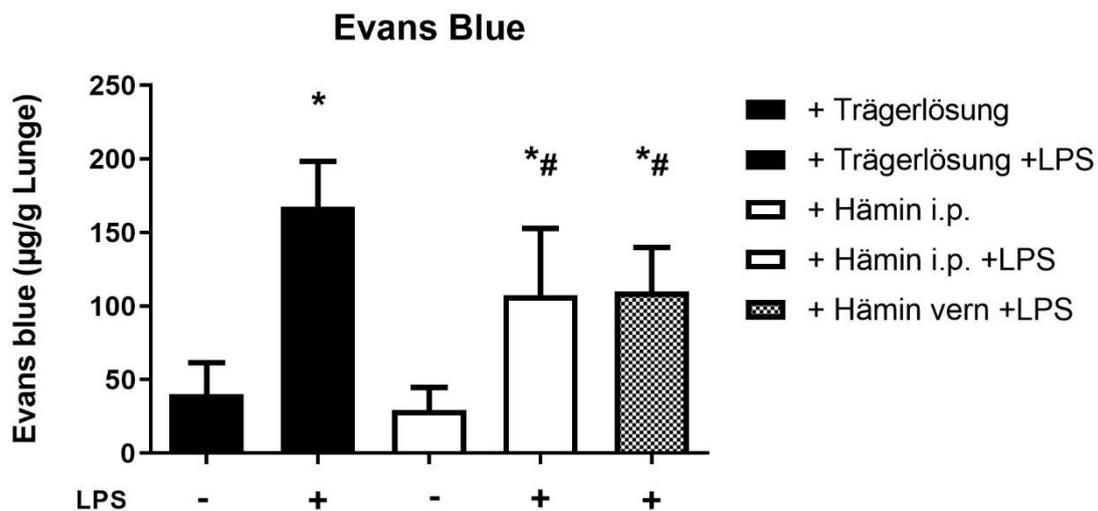


**Abbildung 14: Immunhistochemische Färbung von HO-1 im Lungengewebe** Die HO-1 im Lungengewebe wurde mit HistoGreen blaugrün angefärbt, die Zellkerne mit Nuclear Fast Red hellrot gefärbt. Oben links die Negativkontrolle ohne LPS- und Hämin-Gabe. In der rechten Reihe von oben nach unten, jeweils 24h nach LPS-Gabe: ohne Hämin, Hämin intraperitoneal (i.p.), Hämin vernebelt (neb.). In der linken Reihe jeweils ohne LPS-Gabe. Vergrößerung 40-fach, repräsentativ für n=2 Tiere pro Gruppe.

### 3.4 Untersuchung der Gefäßpermeabilität

Mithilfe des Farbstoffs Evans Blue wurde das Ausmaß des Kapillarlecks bestimmt (siehe Abbildung 15).

Im Vergleich zur Kontrollgruppe kam es nach LPS-Gabe zu einem signifikanten Anstieg der Gefäßpermeabilität. Alleinige intraperitoneale Hämin-Gabe zeigte keinen Unterschied des Kapillarlecks im Vergleich zur Negativkontrolle. Sowohl die vernebelte als auch die intraperitoneale Hämin-Gabe bei mit LPS behandelten Mäusen führte zu einem signifikant niedrigeren Evans Blue-Gehalt als der Gehalt von Tieren, welche nur LPS und kein Hämin erhalten hatten.



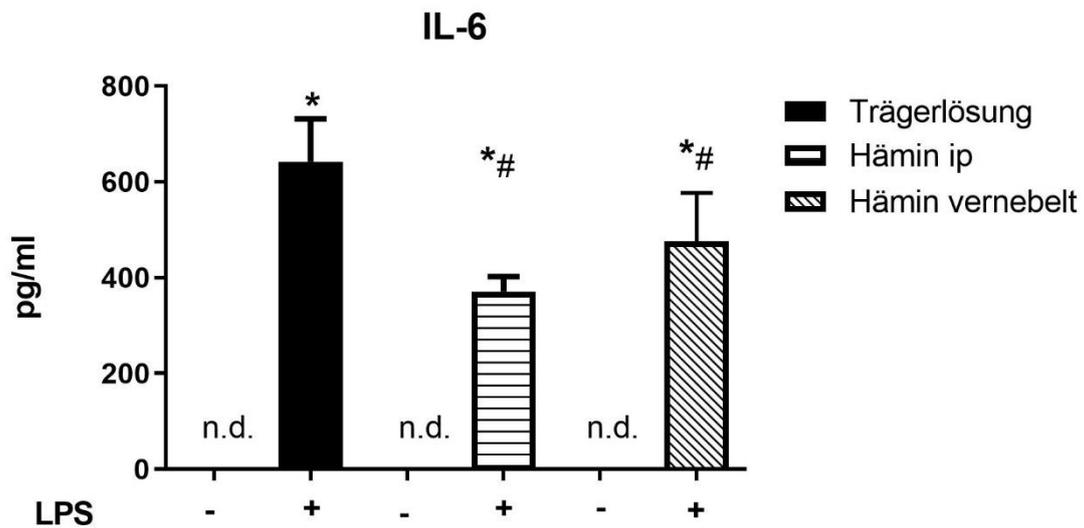
**Abbildung 15: Untersuchung der Gefäßpermeabilität mit Hilfe von Evans Blue.** Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. vern.: vernebelt, i.p.: intraperitoneal. \*  $P < 0,05$  zur Kontrolle ohne LPS, #  $P < 0,05$  zu Kontrolle mit LPS.  $n \geq 5$  Tiere pro Gruppe. Teile der Daten wurden veröffentlicht in <sup>88</sup>.

### 3.5 IL-6-Konzentration in der BAL

Mit Hilfe eines ELISAs wurde die Konzentration des Zytokin IL-6 in der bronchoalveolären Lavage bestimmt.

Ohne LPS-Inhalation war in allen drei Gruppen kaum IL-6 detektierbar, und somit auch kein statistisch relevanter Unterschied nachweisbar (siehe Abbildung 16).

Nach Induktion einer pulmonalen Inflammation durch LPS stieg der IL-6 Wert in allen Gruppen im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant an. Beide Hämin-Gruppen zeigten dabei einen im Vergleich zu LPS alleine signifikant schwächeren Anstieg an IL-6.



**Abbildung 16: Konzentration von Interleukin-6 (IL-6) in der BAL** Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. IL-6 war in den Gruppen ohne LPS-Behandlung nicht detektierbar (n.d.). i.p.: intraperitoneal.\*  $P < 0,05$  zur Kontrolle ohne LPS, #  $P < 0,05$  zu Kontrolle mit LPS.  $n \geq 4$  Tiere pro Gruppe. Aus <sup>88</sup>.

## 4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit die inhalative Gabe von Hämin einen Einfluss auf das Krankheitsbild der pulmonalen Inflammation hat, und ob sie eine ähnliche protektive Wirkung zeigt wie die intraperitoneale Applikation von Hämin. Als Modell für ein mildes ARDS wurde die Endotoxinschädigung mittels LPS gewählt, welches als Aerosol verabreicht wurde.

Hämin, das bereits eine Zulassung als Medikament zur Behandlung der akuten hepatischen Porphyrie hat, ist ein bekannter Induktor der HO-1 mit vielversprechendem therapeutischem Potential in einem großen Spektrum von Erkrankungen.

Im Hinblick auf ARDS konnten z.B. Hualin et. al. an Alveolarmakrophagen in vitro nachweisen, dass Hämin die HO-1-Expression erhöht und zu einer Verminderung der Synthese von NO führte, welchem im Rahmen einer überschießenden Immunantwort eine zellschädigende Wirkung zugesprochen wird.<sup>84</sup>

Des Weiteren konnten An et. al. in einem Modell beatmungsinduzierter Lungenschädigung bei Ratten nachweisen, dass die intraperitoneale Gabe von Hämin protektiv wirkt<sup>82</sup>. So kam es neben einer gestiegenen HO-1 Expression auch zu einer Verminderung von TNF- $\alpha$  und einer Erhöhung des antiinflammatorisch wirkenden IL-10 in der BAL-Flüssigkeit. Zudem wurden eine Abnahme des Lungenödems sowie eine histologisch nachweisbare Verminderung der Lungenschädigung festgestellt.

In einem Modell mit pulmonalem Reperfusionsschaden bei Kaninchen konnten Wang et. al. ebenfalls einen protektiven Effekt durch Hämin nachweisen.<sup>89</sup> Neben einer deutlichen Erhöhung der HO-1 im Lungengewebe, dem histologischen Nachweis verminderter Lungenschädigung und einem kleineren feucht- zu- trocken- Verhältnis der Lungen - einem Hinweis auf das Ödemausmaß- konnte hier des Weiteren im Plasma der mit Hämin behandelten Tiere eine Zunahme von CO-Hb beobachtet werden.

Die Auswirkung von Hämin-Gabe auf die HO-1 wurde auch schon beim Menschen untersucht.<sup>90</sup> Zehn Probanden erhielten dazu einmalig 3 mg/kg Hämin i.v., was der von der US-Amerikanischen Arzneimittel-Zulassungsbehörde zugelassenen Tagesdosis für die Behandlung akuter Porphyrien entspricht.<sup>90</sup> Die Hämin-Gabe wurde insgesamt gut vertragen. Bereits drei Stunden nach der Infusion zeigte sich ein langsamer Anstieg der

HO-1 Proteinkonzentration sowie der HO-1 Aktivität im Blut, mit einem Peak bei 24 Stunden, der bis 48 Stunden nach Hämin-Gabe anhielt.

Neutrophile Granulozyten, die als Teil der angeborenen Immunität als erste Zellen vor Ort sind, spielen bei der akuten pulmonalen Inflammation eine wichtige Rolle und lassen sich im Rahmen des ARDS in der Lunge vermehrt nachweisen.<sup>24,25,27</sup>

In den hier durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass es unter LPS-Gabe im Vergleich zur Negativkontrolle zu einem vermehrten Neutrophileneinstrom in das Lungeninterstitium und den Alveolarraum kam. Die Behandlung mit intraperitonealem Hämin reduzierte die Neutrophilenzahl sowohl im Interstitium als auch intraalveolär. Eine Verminderung der Neutrophilenzahl in der BAL-Flüssigkeit nach intraperitonealer Hämin-Gabe konnten An et.al.<sup>82</sup> ebenfalls nachweisen, was den hier beobachteten Effekt zusätzlich unterstreicht.

In der im Anschluss durchgeführten Dosisfindung hatte eine vernebelte Gabe von Hämin interstitiell eine vergleichbare Wirkung wie die intraperitoneale Hämin-Gabe. Bei einer Konzentration von 52 mg/kg neb. kam es in der BAL sogar zu einer ausgeprägteren Abnahme der Neutrophilenkonzentration als bei 52 mg/kg i.p. Somit zeigte sich bei dieser Dosierung in Hinblick auf die intraalveoläre Menge an PMN die Gabe von Hämin als Aerosol der systemischen Gabe überlegen. Für die anschließenden Versuche wurde daher diese Menge als die zu vernebelnde Dosis verwendet.

Die inhalative oder intraperitoneale Gabe von Hämin allein, also ohne LPS, zeigte keine nennenswerten Unterschiede zur reinen Trägerlösung. Daher ist davon auszugehen, dass Hämin für sich in dieser Konzentration keinen Einfluss auf die gemessenen proinflammatorischen Parameter hat.

In einer vorausgehenden Arbeit wurde gezeigt, dass der protektive Effekt der HO-1-Induktion weniger über direkte Effekte in der Lunge erzielt wird, sondern vielmehr über das Verhindern der Neutrophilen-Freisetzung aus dem Knochenmark.<sup>91</sup> Dies steht in gewissem Widerspruch zu der Tatsache, dass hier ein Vorteil der eher lokal wirkenden Aerosol-Gabe im Vergleich zur systemischen Gabe in Bezug auf die intraalveoläre PMN-Menge gezeigt werden konnte. Allerdings wurde in der Studie von Konrad, Braun et al. Cobalt-Protoporphyrin als Induktor der HO-1 verwendet. Möglicherweise hat Cobalt-

Protoporphyrin, auch wenn es strukturell recht ähnlich ist, eine andere Wirkung auf die HO-1 als Hämin.

Die Schädigung der kapillären und alveolären Membran führt zu einem übermäßigen Austritt von Flüssigkeit aus den Gefäßen, mit der Folge eines interstitiellen und alveolären, proteinreichen Ödems. An et.al.<sup>82</sup> konnten bei ihrem Versuch an Ratten ein geringeres wet-to-dry- Verhältnis der Lunge sowie eine Verminderung des Proteingehalts der BAL nach Hämin-Gabe nachweisen, was auf eine Abschwächung des Lungenödems hindeutet.<sup>82</sup> Übereinstimmend mit den Ergebnissen von An et. al. wurde hier eine Verminderung der vaskulären Permeabilität nach Hämin-Gabe nachgewiesen, welche in einem großen Maß zur Entstehung des Lungenödems beiträgt. In den hier durchgeführten Versuchen hatten die vernebelte und die systemische Gabe einen vergleichbar starken, protektiven Effekt auf die Gefäßdurchlässigkeit.

Die hier nachgewiesene verminderte vaskuläre Permeabilität könnte im Zusammenhang mit der ebenfalls nachgewiesenen Verminderung von IL-6 in der BAL stehen, welche hier für beide Applikationsarten gleichermaßen erfolgte. IL-6 ist ein starker Induktor des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)<sup>92</sup>, dessen vermehrte Freisetzung eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität bewirkt<sup>93</sup>. Somit könnte die verminderte Evans Blue Extravasation nach Hämin-Gabe von der ebenfalls durch Hämin-Gabe verursachten Abnahme der alveolären IL-6-Konzentration herrühren.

Übereinstimmend mit den anderen Ergebnissen zeigte sich auch im histologischen Bild bei schlankeren Alveolarsepten und geringerer Neutrophilenzahl eine Besserung nach Hämin-Gabe.

Ohne Auslösen einer pulmonalen Inflammation kam es nach Gabe vernebelten Hämins zu einer leichten detektierbaren HO-1-Expression im Lungengewebe, ebenso nach reiner LPS-Gabe. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Tatsache, dass sowohl Hämin als auch LPS Induktoren der HO-1 sind<sup>48,49</sup>.

Die kombinierte Gabe von LPS und Hämin führte zu einer ausgeprägten HO-1 Expression in der Lunge, wobei die deutlichste Zunahme bei der Gruppe von Mäusen zu finden war, die LPS und Hämin als Aerosol erhalten hatte. Auch An et.al.<sup>82</sup> konnten

immunohistochemisch eine deutliche Zunahme von HO-1 im Lungengewebe nach Hämin-Gabe nachweisen, was im Einklang mit den hier gefundenen Ergebnissen steht.

Die Tatsache, dass die HO-1-Expression unter Aerosol-Gabe am höchsten war, passt zu der beobachteten Überlegenheit von Aerosol in Bezug auf die Neutrophilenmigration und lässt den Schluss zu, dass der hier nachgewiesene Effekt auch tatsächlich mit der Erhöhung von HO-1-Protein durch Hämin in Verbindung steht.

Gerade im klinischen Kontext ist es von besonderer Relevanz, ob ein Medikament eher für den präventiven Einsatz in Frage kommt, oder ob es auch nach stattgefundenem, schädigendem Ereignis, d.h. therapeutisch, noch von Nutzen ist. Die inhalative Gabe von Hämin zeigte nicht nur bei zeitgleicher Gabe zusammen mit LPS eine protektive Wirkung, sondern bewirkte auch noch zwei Stunden nach LPS-Vernebelung einen antiinflammatorischen Effekt. Dies steht in gewissem Widerspruch zu einer Studie von Aziz, Kamel et. al.<sup>94</sup>, mit einem Modell von durch akute Pankreatitis ausgelöstem ARDS. Hier zeigte sich bei einer Hämin-Gabe, die 12 Stunden nach Gabe der Pankreatitis-auslösenden Substanz erfolgte, kein Effekt mehr. Zum einen könnte dieser Unterschied der Tatsache geschuldet sein, dass es sich um ein anderes Modell der Lungenschädigung handelt (indirektes, hämatogen vermitteltes ARDS im Vergleich zu dem hier angewendeten direkten, lokal ausgelösten ARDS). Des Weiteren erfolgte die Hämin-Gabe bei Aziz, Kamel et. al mit deutlich größerem zeitlichem Abstand zum schädigenden Ereignis. Zusätzlich wurde die Organentnahme für die Gruppe mit posteriorer Gabe bereits nach 12 Stunden gestartet, im Gegensatz zur Gruppe mit anteriorer Gabe, bei der die Organentnahme –analog zu dem hier verwendeten Schema- 24 Stunden nach Hämin-Gabe erfolgte. Wie im oben bereits erwähnten ersten Versuch zur Hämin-Gabe beim Menschen gezeigt<sup>90</sup>, stieg die HO-1-Konzentration nach Induktor-Gabe mit zeitlicher Verzögerung an und erreichte ihren Höhepunkt nach etwa 24 Stunden. Daher könnte das Ergebnis von Aziz, Kamel et. al. auch auf einen zu frühen Zeitpunkt der Organentnahme zurückzuführen sein.

Allerdings lässt sich aufgrund der oben genannten Tatsache vermuten, dass die Gabe von Hämin nicht zu einem kurzfristigen Behandlungserfolg führen würde und daher bei einem extrem schnellen Voranschreiten von Erkrankungen als einzige Therapie nicht das erste Mittel der Wahl wäre.

In den hier durchgeführten Versuchen wurde gezeigt, dass alleinige Hämingabe keinen negativen Effekt auf die gemessenen Parameter hat. Es gibt jedoch Forschungsergebnisse, die auf eine potentiell negative Wirkung von Hämin hinweisen. Hämin ist ein Analogon des Häm, welchem in zahlreichen Versuchen eine prooxidative Wirkung zugeschrieben wurde<sup>95 96</sup>. Auch für Hämin konnte dieser Effekt an menschlichen, neuronartigen Zellen nachgewiesen werden.<sup>97</sup> Des Weiteren könnte es bei einer Überdosierung zu unerwünschter Eisenakkumulation kommen.

In ihrem 2018 veröffentlichten Review raten Hopper, Meinel et. al. daher dazu, hämähnliche Mittel nur für bestimmte Einsätze zu verwenden und geben als Beispiel lokale Applikationsarten wie den potentiellen Einsatz bei Ballonangioplastie oder den Zusatz zu Konservierungslösungen von Spenderorganen an.<sup>49</sup>

Somit ist der Ansatz, Hämin lokal zu applizieren, von besonderer Relevanz, da so eine unerwünschte Überdosierung bzw. eine unnötige systemische Gabe mit den dazugehörigen Risiken vermieden werden könnte. Die inhalative Gabe von Hämin hat viele Vorzüge, denn Aerosol-Gaben sind einfach in der Durchführung, systemische Nebenwirkungen treten seltener bzw. abgeschwächt auf, und es kommt häufig zu einem schnelleren Wirkungseintritt.<sup>98,99</sup>

Die Tatsache, dass es bei inhalativer Applikation für gewöhnlich zu einer niedrigeren systemisch nachweisbaren Menge der verabreichten Substanz kommt<sup>100</sup> und mit weniger bzw. abgeschwächten unerwünschten Arzneimittelwirkungen zu rechnen wäre<sup>101</sup>, ist ein deutlicher Vorteil der inhalativen Verabreichung von Hämin. So sind für Hämin-Gabe beim Menschen bisher folgende unerwünschte Arzneimittelwirkungen beschrieben worden: Kopfschmerzen, Venenthrombose, Phlebitis, Übelkeit und Fieber<sup>80,90</sup>.

Die in der vorliegenden Studie erreichte lokale Hämin-Konzentration dürfte sogar noch deutlich geringer als die applizierte Menge gewesen sein:

Der hier verwendete Vernebler ist ein Druckluftvernebler. Bereits 1985 wiesen Lewis und Fleming nach, dass die in der menschlichen Lunge abgelagerte Wirkstoffmenge bei Druckluftverneblern etwa 12% der Gesamtdosis entspricht und somit nur ein kleiner Teil der verabreichten Dosis die tieferen Lungenareale erreicht.<sup>102</sup>

Die Tatsache, dass nur ein verhältnismäßig geringer Prozentsatz der Ursprungsdosis in den tiefen Lungenarealen ankommt, ist ein Aspekt, der alle gängigen Vernebler- und Inhalationsgeräte (allerdings in unterschiedlichem Ausmaß) betrifft.<sup>99</sup> Sie hat viele verschiedene Ursachen, die zusammen genommen die hohe Verlustrate bewirken.

Unter anderem hängt die Distribution vom verwendeten Inhalationsgerät (z.B. Druckluft, Ultraschall) und dessen Effektivität ab, von der erzeugten Partikelgröße, der Partikelgeschwindigkeit, aber natürlich auch vom Patienten, dessen Atemwegsanatomie, dem Inhalationsvolumen sowie dem Anteil schlecht belüfteter Lungenareale.<sup>99,103</sup> Hinzu kommt, dass ein essentieller Teil der Atemwegskonstruktion darin besteht, keine Fremdkörper zu inhalieren bzw. inhalierte Fremdkörper wieder zu entfernen oder schnell wieder unschädlich zu machen.

Der hier verwendete Vernebler-Typ hat ein verhältnismäßig großes Reservoir für das erzeugte Aerosol (siehe Abbildung 3, Seite 29), und erzeugt dementsprechend vermutlich einen deutlich größeren präinhalativen Verlust als in der Studie von Lewis und Fleming<sup>102</sup> ermittelt wurde. Da Nagetiere obligat durch die Nase atmen<sup>104</sup>, dürfte der über die Nasenschleimhaut schon vorher eliminierte Anteil ebenfalls höher sein, als bei der beim Menschen meistens angewendeten Atmung durch den Mund. Außerdem wurde nur die Dosis für eine Maus vernebelt, unabhängig davon, wie viele Mäuse sich im Gerät befanden (zwischen 4 und 8), und insbesondere in Bezug auf das ohnehin kleine Atemzugvolumen von Mäusen war das Reservoir für das schon erzeugte Aerosol relativ groß.

Nimmt man diese Tatsachen zusammen, so ist davon auszugehen, dass die letztendlich in der Lunge abgelagerte Wirkstoffmenge, auch wenn der genaue Wert schwer zu berechnen ist, vermutlich noch einmal deutlich niedriger war, als der in der in Bezug auf den Menschen von Lewis und Fleming ermittelte Anteil von 12%<sup>102</sup>. Und so dürfte die letztendlich vor Ort wirkende Menge wohl um ein vielfaches niedriger gewesen sein als 52 mg/kg.

Zijlstra, Brandsma et. al. führten ebenfalls einen Versuch zur Inhalation von Hämin durch. Dabei führte die Trockenpulver-Inhalation von Hämin bei Mäusen, ohne zusätzliche Lungenschädigung, zu einem dosisabhängigen Anstieg der HO-1 in der Lunge.<sup>83</sup> Die dort verwendete Höchstdosis war 523 µg/kg, und damit kleiner als in den

hier durchgeführten Versuchen. Allerdings erreicht bei Trockenpuder-Inhalation eine deutlich höhere Menge die Lungen (bis zu 40 %) <sup>99</sup>, daher dürfte die tatsächliche Differenz geringer gewesen sein. Außerdem wurde in dem von Zijlstra, Brandsma et. al. durchgeführten Versuch kein Modell der Lungenschädigung zugrunde gelegt.

Bei Trockenpuder-Inhalationen erreicht prozentual zwar mehr Wirkstoff die entscheidenden Lungenareale, was prinzipiell zu bevorzugen wäre. Allerdings ist die Anwendung im Kontext des ARDS eher ungeeignet, da die Patienten dabei selbstständig atmen müssen. Beatmete Patienten, wie sie hier anzutreffen sind, profitieren eher von einer Aerosolgabe, welche über den Tubus verhältnismäßig simpel und unkompliziert durchzuführen ist. <sup>88</sup>

Die Inhalationstherapie ist beim beatmeten Patienten besonders komplex, und um die tiefen Lungenareale möglichst effektiv zu erreichen, müssen zusätzliche Parameter, wie zum Beispiel der Tubusdurchmesser, das Tidalvolumen, oder die Feuchtigkeit des Atemgases, beachtet werden. <sup>105</sup> Außerdem kommt es bei inhalativer Medikamentengabe gelegentlich zu lokalen Irritationen mit Hustenreiz und Bronchospasmus. <sup>98</sup>

Des Weiteren ist der Luftfluss, der schon beim gesunden Menschen nicht gleichmäßig ist, beim typischen ARDS Patienten aufgrund der atelektatischen Bereiche nicht in alle Lungenbereiche gleichmäßig gegeben <sup>98</sup>. Für bestimmte Medikamente konnte außerdem gezeigt werden, dass abhängig vom Grad der Schädigung die Substanz schlechter aufgenommen wurde. <sup>103</sup> Daher wäre es durchaus möglich, dass Patienten mit einem milden ARDS, wie es in diesem Modell erzeugt wurde, von einer inhalativen Hämin-Therapie mehr profitieren könnten als Patienten mit einem schweren ARDS. Eine weiterführende Untersuchung zur Wirksamkeit in Abhängigkeit vom Grad der Lungenschädigung wäre daher von Interesse.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die inhalative Verabreichung von Hämin eine ähnlich gute, protektive Wirkung hat wie die systemische Gabe von Hämin. Im Hinblick auf die Neutrophilenmenge im Alveolarraum war die Aerosolgabe sogar überlegen.

Die lokale Applikation von Hämin hat viele Vorteile und könnte insbesondere unerwünschte systemische Nebenwirkungen oder eine Überdosierung vermeiden. Gerade

in Bezug auf verschiedene Atemwegserkrankungen, bei denen die HO-1-Hochregulation eine protektive Wirkung zeigt, könnte die inhalative Hämin-Gabe von besonderem Interesse sein. Zu nennen wären beispielsweise Pneumonien diverser Ursachen, Influenza-Infektionen, pulmonale Hypertonie, aber auch diverse Erkrankungen in Kombination mit Promotor-Polymorphismus.

Insgesamt besteht noch viel Forschungsbedarf zum genauen Wirkmechanismus der HO-1 und der Wirkung von Hämin im speziellen.

In Bezug auf diese Dissertation wären unter anderem weiterführende Untersuchungen über die in der Lunge ankommende Hämin-Menge sowie deren Distribution von großem Interesse, sowie das Klären der Frage, warum Hämin bei inhalativer Gabe eine bessere Wirkung im Hinblick auf die intraalveoläre Neutrophilenmigration zeigt als bei systemischer Gabe.

Sowohl die bisherige Studienlage als auch das Ergebnis dieser Dissertation verdeutlichen, dass es Lohnenswert ist, das große Potential von Hämin im Rahmen des ARDS, insbesondere im Hinblick auf inhalative Applikationsformen, weiter zu erforschen.

## 5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Gabe von Hämin als Aerosol das Ausmaß pulmonaler Inflammation positiv beeinflusst und ob diese Darreichungsform vergleichbar gut wirkt wie die systemische, intraperitoneale Hämin-Gabe.

Das akute Lungenversagen (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS) ist eine akut einsetzende Erkrankung des respiratorischen Systems, bei der eine Schädigung der Alveolarmembran mit konsekutivem Lungenödem zu massiven Oxygenierungsstörungen führt. Im Rahmen dieser Schädigung kommt es zu einem vermehrten Neutrophileneinstrom in die Lunge mit erhöhter Ausschüttung von Entzündungsmediatoren und einer überschießenden Entzündungsreaktion.

Das ARDS hat eine hohe Letalität und kann bisher nur supportiv behandelt werden, daher sind Ansätze zur Therapie ein wichtiges Forschungsgebiet.

Das Enzym Hämoxigenase-1 (HO-1) katalysiert den Abbau von Häm zu CO, Fe<sup>2+</sup> und Biliverdin. Seine Expression wird von seinem Substrat Häm sowie weiteren prooxidativen Substanzen induziert. Es spielt eine wichtige Rolle im Rahmen der Homöostase bei oxidativem Stress. Dabei führt man seine antiinflammatorische Wirkung vor allem auf die beim Häm- Abbau entstehenden Produkte zurück.

Hämin ist eine Komplexverbindung des Häms mit einem Chlorid- Ion als axialem Liganden. Ihm wird ein viel versprechendes therapeutisches Potential zugeschrieben, denn Hämin induziert HO-1 und wird beim Menschen bereits zur Therapie akuter hepatischer Porphyrien eingesetzt.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde an Mäusen untersucht, ob die Gabe von Hämin als Aerosol bei einer durch LPS ausgelösten pulmonalen Inflammation eine vergleichbar gute Wirkung hat wie die intraperitoneale Hämin-Gabe. Dies geschah anhand der Berechnung der Neutrophilenmigration in die Lunge, der Bestimmung von IL-6 in der broncho-alveolären Lavage, der Untersuchung der Gefäßpermeabilität mittels des Farbstoffs Evans Blue, sowie der Begutachtung von histologischen Präparaten.

Im Hinblick auf die Anzahl an neutrophilen Granulozyten im Lungengewebe zeigten beide Arten der Hämin-Gabe eine vergleichbare Abnahme der durch LPS induzierten Neutrophilen. Die Gabe als Aerosol führte dabei im Alveolarraum sogar zu einer stärkeren Verminderung der Neutrophilenmigration als die intraperitoneale Hämin-Gabe. Die Konzentration von IL-6 in der broncho-alveolären-Lavage nahm unter beiden Darreichungsformen vergleichbar ab, ebenso kam es zu einer in ihrer Intensität vergleichbaren, geringeren Extravasation und somit zu einer Verminderung der Gefäßpermeabilität unter beiden Formen der Hämin-Gabe. Übereinstimmend damit zeigte sich auch histologisch eine deutlich wahrnehmbare Verbesserung der Gewebestruktur mit dünneren Alveolarsepten, weniger neutrophilen Granulozyten und einer verstärkten HO-1 Expression im Vergleich zur Gruppe mit alleiniger LPS-Gabe. Der positive Einfluss der inhalativen Gabe auf die Neutrophilenmigration konnte auch noch zwei Stunden nach stattgefundener Lungenschädigung nachgewiesen werden, was gerade im Hinblick auf einen eventuellen klinischen Einsatz ein positives Ergebnis ist.

Die hier im Rahmen der inhalativen Verabreichung aufgenommene Dosis war aufgrund des angewandten Vernebelungsapparates deutlich geringer als bei der intraperitonealen Gabe, zeigte aber dennoch eine vergleichbare Wirkung. Da Hämin in einigen Studien eine potentiell schädliche Wirkung zugeschrieben wird, ist die Möglichkeit zur lokalen, niedriger dosierten Gabe von besonderer Relevanz. Dadurch könnte der positive Effekt der Hämin-Gabe mit möglichst geringen systemischen Nebenwirkungen nutzbar werden.

Diese Arbeit konnte somit zeigen, dass die Gabe von Hämin als Aerosol das Ausmaß pulmonaler Inflammation positiv beeinflusst und dabei eine vergleichbar gute Wirksamkeit zeigt wie eine systemische, intraperitoneale Hämin-Gabe.

## 6. Literaturverzeichnis

1. **Ranieri, V. M. et al.** Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA* 307, 2526–2533; 10.1001/jama.2012.5669 (2012).
2. **Luterman, A. et al.** Withdrawal from positive end-expiratory pressure. *Surgery* 83, 328–332 (1978).
3. **Villar, J., Perez-Mendez, L. & Kacmarek, R. M.** The Berlin definition met our needs: no. *Intensive care medicine* 42, 648–650; 10.1007/s00134-016-4242-6 (2016).
4. **Rubinfeld, G. D. et al.** Incidence and outcomes of acute lung injury. *The New England journal of medicine* 353, 1685–1693; 10.1056/NEJMoa050333 (2005).
5. **Villar, J. et al.** The ALIEN study: incidence and outcome of acute respiratory distress syndrome in the era of lung protective ventilation. *Intensive care medicine* 37, 1932–1941; 10.1007/s00134-011-2380-4 (2011).
6. **Caser, E. B., Zandonade, E., Pereira, E., Gama, A. M. C. & Barbas, C. S. V.** Impact of distinct definitions of acute lung injury on its incidence and outcomes in Brazilian ICUs: prospective evaluation of 7,133 patients\*. *Critical care medicine* 42, 574–582; 10.1097/01.ccm.0000435676.68435.56 (2014).
7. **Bellani, G. et al.** Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries. *JAMA* 315, 788–800; 10.1001/jama.2016.0291 (2016).
8. **Raymondos, K. et al.** Outcome of acute respiratory distress syndrome in university and non-university hospitals in Germany. *Critical care (London, England)* 21, 122; 10.1186/s13054-017-1687-0 (2017).
9. **Larsen, R., Ziegenfuß, T. & Mathes, A.** *Beatmung. Indikationen - Techniken - Krankheitsbilder.* 6th ed. (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2018).
10. **Downey, G. P., Dong, Q., Kruger, J., Dedhar, S. & Cherapanov, V.** Regulation of neutrophil activation in acute lung injury. *Chest* 116, 46S-54S (1999).
11. **Confalonieri, M., Salton, F. & Fabiano, F.** Acute respiratory distress syndrome. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* 26; 10.1183/16000617.0116-2016 (2017).
12. **Sud, S. et al.** Effect of prone positioning during mechanical ventilation on mortality among patients with acute respiratory distress syndrome: a systematic review and meta-analysis (2014 Jul 8).
13. **Briegel, J., Bein, T. & Mohnle, P.** Update on low-dose corticosteroids. *Current opinion in anaesthesiology* 30, 186–191; 10.1097/ACO.0000000000000442 (2017).
14. **Paramore, S.** Effects of the use of neuromuscular blocking agents on acute respiratory distress syndrome outcomes: A systematic review. *Journal of the American Association of Nurse Practitioners* 30, 327–332; 10.1097/JXX.0000000000000047 (2018).
15. **Munshi, L. et al.** Venovenous extracorporeal membrane oxygenation for acute respiratory distress syndrome: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Respiratory medicine*; 10.1016/S2213-2600(18)30452-1 (2019).
16. **Cheung, A. M. et al.** Two-year outcomes, health care use, and costs of survivors of acute respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine* 174, 538–544; 10.1164/rccm.200505-693OC (2006).
17. **Bienvenu, O. J. et al.** Psychiatric symptoms after acute respiratory distress syndrome: a 5-year longitudinal study. *Intensive care medicine* 44, 38–47; 10.1007/s00134-017-5009-4 (2018).

18. Gerd Herold. *Innere Medizin* (2010).
19. **Ware, L. B.** Pathophysiology of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Seminars in respiratory and critical care medicine* 27, 337–349; 10.1055/s-2006-948288 (2006).
20. **Cardinal-Fernandez, P., Lorente, J. A., Ballen-Barragan, A. & Matute-Bello, G.** Acute Respiratory Distress Syndrome and Diffuse Alveolar Damage. New Insights on a Complex Relationship. *Annals of the American Thoracic Society* 14, 844–850; 10.1513/AnnalsATS.201609-728PS (2017).
21. **Horn, F.** *Biochemie des Menschen. Das Lehrbuch für das Medizinstudium ; [ideal für die neue AO.* 3rd ed. (Thieme, Stuttgart, 2005).
22. **Heinrich, P. C., Castell, J. V. & Andus, T.** Interleukin-6 and the acute phase response. *The Biochemical journal* 265, 621–636 (1990).
23. **Tanaka, T., Narazaki, M. & Kishimoto, T.** IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 6, a016295; 10.1101/cshperspect.a016295 (2014).
24. **Lien, D. C. et al.** Neutrophil kinetics in the pulmonary microcirculation during acute inflammation. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 65, 145–159 (1991).
25. **Fujishima, S. & Aikawa, N.** Neutrophil-mediated tissue injury and its modulation. *Intensive care medicine* 21, 277–285 (1995).
26. **Reutershan, J. & Ley, K.** Bench-to-bedside review: acute respiratory distress syndrome - how neutrophils migrate into the lung. *Critical care (London, England)* 8, 453–461; 10.1186/cc2881 (2004).
27. **Reutershan, J., Basit, A., Galkina, E. V. & Ley, K.** Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 289, L807-15; 10.1152/ajplung.00477.2004 (2005).
28. **Bachofen, M. & Weibel, E. R.** Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia. *The American review of respiratory disease* 116, 589–615; 10.1164/arrd.1977.116.4.589 (1977).
29. **Bachofen, M. & Weibel, E. R.** Structural alterations of lung parenchyma in the adult respiratory distress syndrome. *Clinics in chest medicine* 3, 35–56 (1982).
30. **Pittet, J. F., Mackersie, R. C., Martin, T. R. & Matthay, M. A.** Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. *American journal of respiratory and critical care medicine* 155, 1187–1205; 10.1164/ajrccm.155.4.9105054 (1997).
31. **Miller, E. J. et al.** Elevated levels of NAP-1/interleukin-8 are present in the airspaces of patients with the adult respiratory distress syndrome and are associated with increased mortality. *The American review of respiratory disease* 146, 427–432; 10.1164/ajrccm/146.2.427 (1992).
32. **Abraham, E., Carmody, A., Shenkar, R. & Arcaroli, J.** Neutrophils as early immunologic effectors in hemorrhage- or endotoxemia-induced acute lung injury. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 279, L1137-45; 10.1152/ajplung.2000.279.6.L1137 (2000).
33. **Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G. L., Metzler, K. D. & Zychlinsky, A.** Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annual review of immunology* 30, 459–489; 10.1146/annurev-immunol-020711-074942 (2012).

34. **Nathan, C.** Points of control in inflammation. *Nature* 420, 846–852; 10.1038/nature01320 (2002).
35. **Grommes, J. & Soehnlein, O.** Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 17, 293–307; 10.2119/molmed.2010.00138 (2011).
36. **Jones, H. A. et al.** In vivo measurement of neutrophil activity in experimental lung inflammation. *American journal of respiratory and critical care medicine* 149, 1635–1639; 10.1164/ajrccm.149.6.7516252 (1994).
37. **Doerschuk, C. M., Beyers, N., Coxson, H. O., Wiggs, B. & Hogg, J. C.** Comparison of neutrophil and capillary diameters and their relation to neutrophil sequestration in the lung. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 74, 3040–3045; 10.1152/jappl.1993.74.6.3040 (1993).
38. **Drost, E. M. & MacNee, W.** Potential role of IL-8, platelet-activating factor and TNF-alpha in the sequestration of neutrophils in the lung: effects on neutrophil deformability, adhesion receptor expression, and chemotaxis. *European journal of immunology* 32, 393–403; 10.1002/1521-4141(200202)32:2<393::AID-IMMU393>3.0.CO;2-5 (2002).
39. **Tozeren, A. & Ley, K.** How do selectins mediate leukocyte rolling in venules? *Biophysical journal* 63, 700–709; 10.1016/S0006-3495(92)81660-0 (1992).
40. **Gebb, S. A. et al.** Sites of leukocyte sequestration in the pulmonary microcirculation. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 79, 493–497; 10.1152/jappl.1995.79.2.493 (1995).
41. **Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I. & Nourshargh, S.** Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews. Immunology* 7, 678–689; 10.1038/nri2156 (2007).
42. **Burns, A. R., Smith, C. W. & Walker, D. C.** Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung. *Physiological reviews* 83, 309–336; 10.1152/physrev.00023.2002 (2003).
43. **Zemans, R. L., Colgan, S. P. & Downey, G. P.** Transepithelial migration of neutrophils: mechanisms and implications for acute lung injury. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 40, 519–535; 10.1165/rcmb.2008-0348TR (2009).
44. **Pimstone, N. R., Tenhunen, R., Seitz, P. T., Marver, H. S. & Schmid, R.** The enzymatic degradation of hemoglobin to bile pigments by macrophages. *The Journal of experimental medicine* 133, 1264–1281 (1971).
45. **Sugishima, M., Moffat, K. & Noguchi, M.** Discrimination between CO and O(2) in heme oxygenase: comparison of static structures and dynamic conformation changes following CO photolysis. *Biochemistry* 51, 8554–8562; 10.1021/bi301175x (2012).
46. **Ryter, S. W. & Choi, A. M. K.** Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from metabolism to molecular therapy. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 41, 251–260; 10.1165/rcmb.2009-0170TR (2009).
47. **Hayashi, S. et al.** Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene* 336, 241–250; 10.1016/j.gene.2004.04.002 (2004).
48. **Fredenburgh, L. E., Perrella, M. A. & Mitsialis, S. A.** The role of heme oxygenase-1 in pulmonary disease. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 36, 158–165; 10.1165/rcmb.2006-0331TR (2007).

49. **Hopper, C. P., Meinel, L., Steiger, C. & Otterbein, L. E.** Where is the Clinical Breakthrough of Heme Oxygenase-1 / Carbon Monoxide Therapeutics? *Current pharmaceutical design* 24, 2264–2282; 10.2174/1381612824666180723161811 (2018).
50. **Ryter, S. W. & Choi, A. M. K.** Heme oxygenase-1/carbon monoxide: novel therapeutic strategies in critical care medicine. *Current drug targets* 11, 1485–1494 (2010).
51. **Almolki, A. et al.** Heme oxygenase attenuates allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in guinea pigs. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 287, L26-34; 10.1152/ajplung.00237.2003 (2004).
52. **Tracz, M. J., Alam, J. & Nath, K. A.** Physiology and pathophysiology of heme: implications for kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 18, 414–420; 10.1681/ASN.2006080894 (2007).
53. **Otterbein, L. E. & Choi, A. M.** Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 279, L1029-37; 10.1152/ajplung.2000.279.6.L1029 (2000).
54. **Morse, D. & Choi, A. M. K.** Heme oxygenase-1: the "emerging molecule" has arrived. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 27, 8–16; 10.1165/ajrcmb.27.1.4862 (2002).
55. **Poss, K. D. & Tonegawa, S.** Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 10925–10930 (1997).
56. **Takaki, S. et al.** Beneficial effects of the heme oxygenase-1/carbon monoxide system in patients with severe sepsis/septic shock. *Intensive care medicine* 36, 42–48; 10.1007/s00134-009-1575-4 (2010).
57. **Poss, K. D. & Tonegawa, S.** Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 10919–10924 (1997).
58. **Otterbein, L. E. et al.** Exogenous administration of heme oxygenase-1 by gene transfer provides protection against hyperoxia-induced lung injury. *The Journal of clinical investigation* 103, 1047–1054; 10.1172/JCI5342 (1999).
59. **Gong, Q. et al.** Heme oxygenase-1 upregulation significantly inhibits TNF-alpha and Hmgb1 releasing and attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *International immunopharmacology* 8, 792–798; 10.1016/j.intimp.2008.01.026 (2008).
60. **Yu, J. et al.** Effect of Heme Oxygenase-1 on Mitofusin-1 protein in LPS-induced ALI/ARDS in rats. *Scientific reports* 6, 36530; 10.1038/srep36530 (2016).
61. **Kroisel, P. M. et al.** Targeted enrichment sequencing in two midterm pregnancies with severe abnormalities on ultrasound. *Lancet (London, England)* 389, 1857–1858; 10.1016/S0140-6736(17)31049-8 (2017).
62. **Kawashima, A., Oda, Y., Yachie, A., Koizumi, S. & Nakanishi, I.** Heme oxygenase-1 deficiency: the first autopsy case. *Human pathology* 33, 125–130 (2002).
63. **Radhakrishnan, N. et al.** Human heme oxygenase-1 deficiency presenting with hemolysis, nephritis, and asplenia. *Journal of pediatric hematology/oncology* 33, 74–78; 10.1097/MPH.0b013e3181fd2aae (2011).
64. **Raval, C. M. & Lee, P. J.** Heme oxygenase-1 in lung disease. *Current drug targets* 11, 1532–1540 (2010).

65. **Abraham, N. G. et al.** Modulation of cGMP by human HO-1 retrovirus gene transfer in pulmonary microvessel endothelial cells. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 283, L1117-24; 10.1152/ajplung.00365.2001 (2002).
66. **Dore, S. et al.** Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 2445–2450 (1999).
67. **Clark, J. E., Foresti, R., Green, C. J. & Motterlini, R.** Dynamics of haem oxygenase-1 expression and bilirubin production in cellular protection against oxidative stress. *The Biochemical journal* 348 Pt 3, 615–619 (2000).
68. **Sarady-Andrews, J. K. et al.** Biliverdin administration protects against endotoxin-induced acute lung injury in rats. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 289, L1131-7; 10.1152/ajplung.00458.2004 (2005).
69. **Gourley, G. R.** Bilirubin metabolism and kernicterus. *Advances in pediatrics* 44, 173–229 (1997).
70. **Ryter, S. W., Morse, D. & Choi, A. M. K.** Carbon monoxide and bilirubin: potential therapies for pulmonary/vascular injury and disease. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 36, 175–182; 10.1165/rcmb.2006-0333TR (2007).
71. **Otterbein, L. E. et al.** Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nature medicine* 6, 422–428; 10.1038/74680 (2000).
72. **Petrache, I., Otterbein, L. E., Alam, J., Wiegand, G. W. & Choi, A. M.** Heme oxygenase-1 inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in cultured fibroblasts. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 278, L312-9; 10.1152/ajplung.2000.278.2.L312 (2000).
73. **Otterbein, L. E. et al.** MKK3 mitogen-activated protein kinase pathway mediates carbon monoxide-induced protection against oxidant-induced lung injury. *The American journal of pathology* 163, 2555–2563; 10.1016/S0002-9440(10)63610-3 (2003).
74. **Burg, R. von.** Carbon monoxide. *Journal of applied toxicology : JAT* 19, 379–386 (1999).
75. Hemin H9039. Available at <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/h9039?lang=de&region=DE>.
76. Wikipedia. Hämine. Available at <https://de.wikipedia.org/w/index.php?oldid=177193516> (2019).
77. **Wang, C. et al.** Hemin ameliorates influenza pneumonia by attenuating lung injury and regulating the immune response. *International journal of antimicrobial agents* 49, 45–52; 10.1016/j.ijantimicag.2016.09.030 (2017).
78. **Heeba, G. H., Hamza, A. A. & Hassanin, S. O.** Induction of heme oxygenase-1 with hemin alleviates cisplatin-induced reproductive toxicity in male rats and enhances its cytotoxicity in prostate cancer cell line. *Toxicology letters* 264, 38–50; 10.1016/j.toxlet.2016.10.019 (2016).
79. **Dai, Y. et al.** Hemin Promotes Corneal Allograft Survival Through the Suppression of Macrophage Recruitment and Activation. *Investigative ophthalmology & visual science* 59, 3952–3962; 10.1167/iops.17-23327 (2018).
80. AG, H. S.I. Normosang ® - compendium.ch. Available at <https://compendium.ch/mpro/mnr/7743/html/de> (2019).

81. PANHEMATIN® (hemin for injection) | Official Site. Available at <https://www.panhematin.com/>.
82. **An, L. et al.** Protective effects of hemin in an experimental model of ventilator-induced lung injury. *European journal of pharmacology* 661, 102–108; 10.1016/j.ejphar.2011.04.032 (2011).
83. **Zijlstra, G. S. et al.** Dry powder inhalation of hemin to induce heme oxygenase expression in the lung. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 67, 667–675; 10.1016/j.ejpb.2007.03.021 (2007).
84. **Hualin, C. et al.** The anti-inflammatory mechanism of heme oxygenase-1 induced by hemin in primary rat alveolar macrophages. *Inflammation* 35, 1087–1093; 10.1007/s10753-011-9415-4 (2012).
85. **Michel, O. et al.** Dose-response relationship to inhaled endotoxin in normal subjects. *American journal of respiratory and critical care medicine* 156, 1157–1164; 10.1164/ajrccm.156.4.97-02002 (1997).
86. **Lindner, V. & Heinle, H.** Binding properties of circulating Evans blue in rabbits as determined by disc electrophoresis. *Atherosclerosis* 43, 417–422 (1982).
87. **Saria, A. & Lundberg, J. M.** Evans blue fluorescence: quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissues. *Journal of neuroscience methods* 8, 41–49 (1983).
88. **Konrad, F. M., Knausberg, U., Hone, R., Ngamsri, K.-C. & Reutershan, J.** Tissue heme oxygenase-1 exerts anti-inflammatory effects on LPS-induced pulmonary inflammation. *Mucosal immunology* 9, 98–111; 10.1038/mi.2015.39 (2016).
89. **Wang, W., Wang, F., Shi, L., Jia, X. & Lin, L.** Role of heme oxygenase-1/carbon monoxide system in pulmonary ischemia-reperfusion injury. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery* 9, 159–162; 10.1510/icvts.2008.196089 (2009).
90. **Bharucha, A. E. et al.** First-in-human study demonstrating pharmacological activation of heme oxygenase-1 in humans. *Clinical pharmacology and therapeutics* 87, 187–190; 10.1038/clpt.2009.221 (2010).
91. **Konrad, F. M., Braun, S., Ngamsri, K.-C., Vollmer, I. & Reutershan, J.** Heme oxygenase-1 attenuates acute pulmonary inflammation by decreasing the release of segmented neutrophils from the bone marrow. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 307, L707-17; 10.1152/ajplung.00145.2014 (2014).
92. **Nakahara, H. et al.** Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 48, 1521–1529; 10.1002/art.11143 (2003).
93. **Connolly, D. T. et al.** Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *The Journal of clinical investigation* 84, 1470–1478; 10.1172/JCI114322 (1989).
94. **Aziz, N. M., Kamel, M. Y. & Rifaai, R. A.** Effects of hemin, a heme oxygenase-1 inducer in L-arginine-induced acute pancreatitis and associated lung injury in adult male albino rats. *Endocrine regulations* 51, 20–30; 10.1515/enr-2017-0003 (2017).
95. **Jeney, V. et al.** Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood* 100, 879–887 (2002).
96. **Kumar, S. & Bandyopadhyay, U.** Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicology letters* 157, 175–188; 10.1016/j.toxlet.2005.03.004 (2005).

97. **Goldstein, L., Teng, Z.-P., Zeserson, E., Patel, M. & Regan, R. F.** Hemin induces an iron-dependent, oxidative injury to human neuron-like cells. *Journal of neuroscience research* 73, 113–121; 10.1002/jnr.10633 (2003).
98. **Dhanani, J. et al.** Fundamentals of aerosol therapy in critical care. *Critical care (London, England)* 20, 269; 10.1186/s13054-016-1448-5 (2016).
99. **Rau, J. L.** The inhalation of drugs: advantages and problems. *Respiratory care* 50, 367–382 (2005).
100. **Corcoran, T. E., Niven, R., Verret, W., Dilly, S. & Johnson, B. A.** Lung deposition and pharmacokinetics of nebulized cyclosporine in lung transplant patients. *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery* 27, 178–184; 10.1089/jamp.2013.1042 (2014).
101. **Thiringer, G. & Svedmyr, N.** Comparison of infused and inhaled terbutaline in patients with asthma. *Scandinavian journal of respiratory diseases* 57, 17–24 (1976).
102. **Lewis, R. A. & Fleming, J. S.** Fractional deposition from a jet nebulizer: how it differs from a metered dose inhaler. *British journal of diseases of the chest* 79, 361–367 (1985).
103. **Lu, Q. et al.** Nebulized and intravenous colistin in experimental pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Intensive care medicine* 36, 1147–1155; 10.1007/s00134-010-1879-4 (2010).
104. **Hickey, A. J.** Controlled delivery of inhaled therapeutic agents. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 190, 182–188; 10.1016/j.jconrel.2014.05.058 (2014).
105. **Dhand, R.** Inhalation therapy in invasive and noninvasive mechanical ventilation. *Current opinion in critical care* 13, 27–38; 10.1097/MCC.0b013e328012e022 (2007).

## 7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Konzeption und Planung der Studie erfolgte durch Herrn Prof. Dr. med. Jörg Reutershan und Frau Dr. med. Franziska Konrad.

Die Durchführung der Studie erfolgte an der Klinik für Anästhesiologie der Universität Tübingen.

Die Tierversuche wurden von Frau Dr. med. Franziska Konrad vorgenommen. Nach erfolgter Einweisung durch Frau Irene Vollmer wurden die weitere Bearbeitung der Proben sowie deren Analyse von mir durchgeführt.

Die statistische Auswertung der Dosisfindung, der Kontrollgruppen, der posterioren Hämin-Gabe und des Evans Blue-Versuches erfolgte durch mich, die statistische Auswertung der restlichen Versuche erfolgte durch Frau Dr. med. Franziska Konrad.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

## 8. Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden bereits in der unten genannten Publikation veröffentlicht und sind entsprechend gekennzeichnet.

Konrad, F. M., Knausberg, U., Höne, R., Ngamsri, K.-C. & Reutershan, J. Tissue heme oxygenase-1 exerts anti-inflammatory effects on LPS-induced pulmonary inflammation. *Mucosal immunology* (2016).

## 9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, durch deren Unterstützung diese Dissertation erst möglich wurde.

Mein herzlicher Dank gilt zuerst Herrn Prof. Reutershan und Franziska Konrad, die es mir ermöglicht haben, in einer so großartigen Arbeitsgruppe an einem spannenden Thema forschen zu können. Eine bessere Betreuung hätte ich mir nicht wünschen können.

Irenes detaillierte Einarbeitung hat mir die Laborarbeit deutlich erleichtert, und auch bei allen Schwierigkeiten im Laboralltag war sie mir immer eine verlässliche Ansprechpartnerin. Daher gebührt ihr ebenfalls ein herzliches Dankeschön.

Ebenso möchte ich mich bei Stefan und Urs für die hilfreichen Tipps und den Austausch unter Gleichgesinnten bedanken.

Des Weiteren gilt Gianna, ohne die ich vermutlich nicht auf dieses spannende Thema gestoßen wäre, mein großer Dank. Sie hat mich während des ganzen Entstehungsprozesses unterstützt, mir oft weitergeholfen, und war meine Rettung bei Laborproblemen am Wochenende.

Ohne meine wunderbare Familie wäre diese Arbeit nicht möglich geworden.

Für die Hilfe von Andreas, Miriam, meiner Mutter und Jo bin ich unendlich dankbar und ich weiß es sehr zu schätzen, wie viel Freizeit für mich (bzw. die Jungs) geopfert wurde. Insbesondere meiner Schwester, deren Hilfe in sehr vielseitigen Bereichen zum Einsatz kam, kann ich nicht genug danken.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern, die mir das Forschungssemester überhaupt erst ermöglicht haben, für ihre Liebe, Geduld und Unterstützung bedanken.