

Aus der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie  
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Volk

**Pentanal als möglicher Biomarker für die Abgrenzung von lungenprotektiver  
und lungenschädlicher Beatmung im Tiermodell**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*

**der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2023

vorgelegt von: Jonas Doneit

geb. am 28.07.1995 in Berlin

---

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	III
Abbildungsverzeichnis .....	V
Tabellenverzeichnis .....	VII
1 Zusammenfassung .....	1
1.1 Deutsch .....	1
1.2 Englisch .....	2
2 Einleitung .....	4
2.1 Geschichtlicher Überblick und aktuelle Problematik der maschinellen Beatmung .....	4
2.2 Grundlagen Atemmechanik .....	5
2.3 Die künstliche Beatmung .....	9
2.4 Ventilator-induzierte Lungenschädigung .....	10
2.4.1 Volutrauma .....	10
2.4.2 Barotrauma .....	11
2.4.3 Atelektrauma .....	13
2.4.4 Scherkräfte .....	13
2.4.5 Biotrauma .....	16
2.5 Lipidperoxidation .....	18
2.6 Atemluftanalytik mittels Ionenmobilitätsspektrometer .....	22
2.7 Fragestellung .....	23
3 Material und Methoden .....	24
3.1 Versuchstiere .....	24
3.2 Präparation und Narkoseführung .....	25
3.3 Studiendesign .....	26
3.4 Probengewinnung .....	27
3.4.1 Atemluftproben .....	27
3.4.2 Blutproben .....	28
3.4.3 Bronchoalveoläre Lavage .....	29
3.4.4 Gewebeentnahme und Histologie .....	29
3.5 MCC-IMS Aufbau und Funktion .....	30
3.5.1 Kalibration .....	34
3.6 HPLC .....	39
3.7 ELISA IL-6 und TNF-alpha .....	42
3.8 Leukozytenzählung .....	43
3.9 Western Blot .....	44
3.10 Vitalparameter .....	45

3.11 Statistische Auswertung .....	46
4 Ergebnisse.....	47
4.1 Pentanal in der Ausatemluft.....	47
4.2 Inflammation .....	53
4.2.1 Leukozyten .....	53
4.2.2 IL-6.....	53
4.2.3 TNF-alpha .....	54
4.3 Apoptose (Caspase 3).....	54
4.4 Histologie.....	56
4.5 Vitalparameter und Blutgase .....	57
5 Diskussion .....	60
5.1 Diskussion der Methodik.....	60
5.2 Diskussion der Ergebnisse .....	61
5.2.1 Pentanal als Biomarker.....	61
5.2.2 Hypothese zur Pentanalentstehung.....	63
5.3 Leukozyten und Inflammation.....	64
5.4 Apoptose (Caspase 3).....	66
5.5 Histologie.....	68
5.6 Vitalparameter und Blutgase .....	69
5.7 Schlussfolgerung.....	69
Literaturnachweis/Quellen.....	VIII

# Abkürzungsverzeichnis

ALI	Akute Lungenschädigung (Engl.: Acute Lung Injury)
ARDS	Akutes Lungenversagen (Engl.: Acute Respiratory Distress Syndrome)
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BE	Base Excess
BGA	Blutgasanalyse
bpm	Herzfrequenz (Engl.: beats per minute)
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERV	Expiratorisches Reservevolumen
FiO <sub>2</sub>	Inspiratorische Sauerstofffraktion
FRC	Funktionelle Residualkapazität
GEE	Verallgemeinerte Schätzgleichung (Engl.: Generalized Estimating Equation)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie
IL	Interleukin
IMS	Ionenmobilitätsspektrometer
IRV	Inspiratorisches Reservevolumen
IVC	Vitalkapazität
kgKG	Kilogramm Körpergewicht
KI	Konfidenzintervall
MCC	Multikapillarsäule
MDA	Malondialdehyd
O <sub>2</sub>	Sauerstoff

$P_{\text{Atm}}$	Atmosphärendruck
$P_{\text{Aw}}$	Atemwegsdruck
$p\text{CO}_2$	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PCV	Druckkontrollierte Beatmung (Engl.: Pressure Controlled Ventilation)
PEEP	Positiver endexpiratorischer Druck (Engl.: Positive End-Expiratory Pressure)
PFA	Perfluoralkoxy-Polymere
$p\text{O}_2$	Sauerstoffpartialdruck
ppb	Parts per billion
$P_{\text{pleu}}$	Pleuradruck
$P_{\text{pul}}$	Pulmonaldruck
ppt	Parts per trillion
$P_{\text{tp}}$	Transpulmonaler Druck
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (Engl.: Reactive Oxygen Species)
RV	Residualvolumen
TLC	Totale Lungenkapazität
TNF	Tumornekrosefaktor
$T_v$	Tidalvolumen
VCV	Volumenkontrollierte Beatmung (Engl.: Volume Controlled Ventilation)
VILI	Ventilator-induzierte Lungenschädigung (Engl.: Ventilator-Induced Lung Injury)
VOC	Flüchtige organische Verbindungen (Engl.: Volatile Organic Compounds)

# Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 Lungenvolumina und -kapazitäten anhand eines normalen Atemmusters
- Abbildung 2 Interaktion von Lunge und Brustwand
- Abbildung 3 Grafische Darstellung der verschiedenen Beatmungsdrücke während einer maschinellen Inspiration
- Abbildung 4 Druck-Volumenkurve der Lunge
- Abbildung 5 Transpulmonaler Druck
- Abbildung 6 Einfluss kollabierter oder ödematös veränderter Alveoli auf benachbarte Lungenbereiche
- Abbildung 7 Schematische Darstellung eines gesunden Alveolus verglichen mit denen bei erfolgtem Volu- und Atelek- bzw. Biotrauma
- Abbildung 8 Die verschiedenen Radikaluntergruppen und ihre Synthese
- Abbildung 9 Wirkung der ROS
- Abbildung 10 Übersicht Haber-Weiss- und Fenton-Reaktion
- Abbildung 11 Ablauf der Lipidperoxidation
- Abbildung 12 Vereinfachte Darstellung der Lipidperoxidation
- Abbildung 13 Schematischer Aufbau eines IMS
- Abbildung 14 Übersicht über das Studiendesign
- Abbildung 15 Schematischer Aufbau des Beatmungsplatzes
- Abbildung 16 Schematischer Aufbau eines Ionenmobilitätsspektrometers
- Abbildung 17 Intensitätsmessung mittels IMS
- Abbildung 18 Querschnitt durch eine Multikapillarsäule
- Abbildung 19 Schematische Darstellung eines kombinierten MCC-IMS
- Abbildung 20 PFA-Gefäß im Wasserbad zur Pentanalkalibration
- Abbildung 21 Ansatz der Kalibrationsflüssigkeit
- Abbildung 22 Schematische Darstellung einer geometrischen Verdünnungsreihe
- Abbildung 23 Kalibrationskurven Pentanal für die verwendeten MCC-IMS
- Abbildung 24 Schematische Darstellung der Einzelkomponenten einer HPLC
- Abbildung 25 Schematischer Aufbau einer Säule der HPLC
- Abbildung 26 Funktionsweise eines ELISA
- Abbildung 27 Abgeatmetes Pentanal und Tidalvolumen im Zeitverlauf
- Abbildung 28 Abgeatmetes Pentanal zu Zeitpunkten vor und nach Beatmungsumstellung
- Abbildung 29 Pentanalkonzentration im Plasma

- Abbildung 30 Darstellung der Pentanalkonzentrationen im Blutplasma in Abhängigkeit von denen in der Ausatemluft
- Abbildung 31 Leukozytenzahl pro  $\mu\text{l}$  BAL-Flüssigkeit
- Abbildung 32 IL-6 Konzentration in  $\text{pg/ml}$  in der BAL
- Abbildung 33 TNF- $\alpha$  Konzentration in  $\text{pg/ml}$  in der BAL
- Abbildung 34 Beispielhafte Darstellung eines Western Blots
- Abbildung 35 Prozentualer Anteil der aktivierten Caspase 3 an der Pro-Caspase 3
- Abbildung 36 Repräsentative mikroskopische Bilder der Lunge
- Abbildung 37 Gruppenweiser Verlauf des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP)
- Abbildung 38 Extrinsischer und intrinsischer Weg der Apoptose

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Verwendete Substanzen mit Herstellerbezeichnung und Produktionsort
Tabelle 2	Beatmungsparameter
Tabelle 3	Blutentnahmezeitpunkte
Tabelle 4	Betriebsparameter des IMS
Tabelle 5	Betriebsparameter der Multikapillarsäule
Tabelle 6	Verdünnungsreihe der Pentanalkalibration
Tabelle 7	Messeinstellungen des IMS für die Kalibrationsmessungen
Tabelle 8	Verwendete Substanzen bei der HPLC
Tabelle 9	Kalibrationskonzentrationen der Plasmapentanal-messung
Tabelle 10	Messwerte [ppb] der Pentanal-messungen unmittelbar vor und nach den Umschlagspunkten
Tabelle 11	Durchschnittlicher Pentalanstieg pro Stunde
Tabelle 12	Ergebnisse der Blutgasanalyse



# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Deutsch

Eine maschinelle Beatmung gilt in vielen Bereichen der modernen Medizin als unverzichtbare Notwendigkeit. So wären ohne eine adäquate Narkose mit mechanischer Beatmung und entsprechenden Muskelrelaxation viele chirurgische Eingriffe nicht durchführbar. Ebenso wäre die intensivmedizinische Betreuung vieler Patienten gerade bei respiratorischer Insuffizienz nicht möglich. Jedoch ist bekannt, dass eine mechanische Beatmung zu pulmonalen Schäden führen kann. Eine Methode, diese Lungenschäden in einem Frühstadium zu erkennen und entsprechende protektive Maßnahmen einzuleiten, existiert bis heute nicht.

Pentanal ist ein Produkt der Lipidperoxidation, welches in der Ausatemluft gemessen werden kann und möglicherweise ein Biomarker einer Lungenschädigung darstellen könnte. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob sich die Pentanalkonzentration in der Ausatemluft zur Differenzierung einer schädigenden von einer protektiven Beatmung eignet.

75 männliche Sprague-Dawley Ratten wurden narkotisiert und nach einstündiger protektiver Beatmung mit einem Tidalvolumen von  $6 \text{ ml} \cdot \text{kgKG}^{-1}$ , über verschieden lange Zeiträume (0,5; 1; 2; 3 Stunden) mit einem erhöhten Tidalvolumen von  $16 \text{ ml} \cdot \text{kgKG}^{-1}$  beatmet. Anschließend erfolgte eine erneute Umstellung auf eine protektive Beatmung für weitere sechs Stunden. Zusätzlich wurde eine Kontrollgruppe für einen Zeitraum von zehn Stunden durchgehend mit einem Tidalvolumen von  $6 \text{ ml} \cdot \text{kgKG}^{-1}$  ventiliert.

Die abgeatmete Pentanalkonzentration wurde mittels multikapillarsäulengekoppelter Ionenmobilitätsspektrometrie (MCC-IMS) in 15-minütigen Abständen gemessen. Die Pentanalkonzentrationen an den Umstellungszeitpunkten der Beatmung wurden mittels Varianzanalyse verglichen. Weiterhin wurde der Anstieg der Pentanalkonzentration während protektiver und schädigender Beatmungsphasen mittels verallgemeinerter Schätzgleichung (GEE) berechnet. Um einen systemischen Ursprung des abgeatmeten Pentanals auszuschließen wurde die Konzentration des abgeatmeten Pentanals mit den in der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie bestimmten Pentanalkonzentrationen im Blutplasma verglichen. Zusätzlich wurden Zytokine und Leukozyten in einer bronchoalveolären Lavage sowie das Verhältnis von Caspase 3 zur Procaspase 3 im Lungengewebe bestimmt.

Sowohl bei der protektiven als auch bei der lungenschädlichen Beatmungsform kam es zu einem Anstieg des abgeatmeten Pentanals. Dieser fiel jedoch unterschiedlich stark aus. Eine Umstellung auf schädigende Tidalvolumina ( $16 \text{ ml} \cdot \text{kgKG}^{-1}$ ) führte zu einem deutlich steileren Anstieg der abgeatmeten

Pentanalkonzentration von durchschnittlich 1,0 [95 %-Konfidenzintervall (95 % KI): 0,3 – 1,7] ppb/h bis 2,5 [1,4 – 3,6] ppb/h, wohingegen die Pentanalkonzentration unter protektiven Tidalvolumina ( $6 \text{ ml} \cdot \text{kgKG}^{-1}$ ) nur durchschnittlich um 0,5 [95 % KI: 0,2 – 0,7] ppb/h anstieg. Nach der Umstellung auf protektive Tidalvolumina kam es zu einem medianen Abfall von 2,0 [Interquartilsabstand (IQR): 0,9 – 3,2] ppb bzw. zu einer medianen prozentualen Reduktion von 38 [IQR: 31 – 43] % der abgeatmeten Pentanalkonzentration.

Die abgeatmete Pentanalkonzentration korrelierte nicht mit derer im Blutplasma. Ebenfalls gab es keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der untersuchten Inflammations- und Apoptosemarker. Die Histologie der Lunge zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen unterschiedlich starker Beatmungsaktivität.

Pentanal ist ein potenzieller Biomarker zur Detektion des Beginns und der Beendigung einer lungenschädigenden Beatmung.

## 1.2 Englisch

Mechanical ventilation is considered an indispensable necessity in many areas of modern medicine. Without adequate anaesthesia with mechanical ventilation and appropriate muscle relaxation, many surgical procedures would not be possible. Likewise, the intensive medical care of many patients, especially those with respiratory insufficiency, would not be possible. However, it is known that mechanical ventilation can lead to pulmonary damage. To date, there is no method of recognising this lung damage at an early stage and introducing appropriate protective measures.

Pentanal is a product of lipid peroxidation that can be measured in exhaled air and could possibly represent a biomarker of lung damage. The present study investigated whether the pentanal concentration in exhaled air is suitable for differentiating between damaging and protective ventilation.

75 male Sprague-Dawley rats were anaesthetised and, after one hour of protective ventilation with a tidal volume of  $6 \text{ ml} \cdot \text{kgKG}^{-1}$ , ventilated for different lengths of time (0.5; 1; 2; 3 hours) with an increased tidal volume of  $16 \text{ ml} \cdot \text{kgKG}^{-1}$ . This was followed by another switch to protective ventilation for another six hours. In addition, a control group was continuously ventilated with a tidal volume of  $6 \text{ ml} \cdot \text{kgKG}^{-1}$  for a period of ten hours.

Exhaled pentanal concentrations were measured by multicapillary column coupled ion mobility spectrometry (MCC-IMS) at 15-minute intervals. The pentanal concentrations at the ventilation changeover points of time were compared using analysis of variance. Furthermore, the increase in

pentanal concentration during protective and damaging ventilation phases was calculated using generalised estimating equation (GEE). In order to exclude a systemic origin of the exhaled pentanal, the concentration of the exhaled pentanal was compared with the pentanal concentration in blood plasma determined by high-performance liquid chromatography. In addition, cytokines and leucocytes were determined in a bronchoalveolar lavage, as well as the ratio of caspase 3 to procaspase 3 in lung tissue.

There was an increase in exhaled pentanal in both the protective and the lung-damaging form of ventilation. However, this increase was of different magnitudes. A switch to injurious tidal volumes ( $16 \text{ ml} \cdot \text{kg} \cdot \text{KG}^{-1}$ ) resulted in a significantly steeper increase in exhaled pentanal concentration, averaging  $1.0$  [95 % confidence interval (95 % CI):  $0.3 - 1.7$ ] ppb/h to  $2.5$  [ $1.4 - 3.6$ ] ppb/h, whereas pentanal concentration under protective tidal volumes ( $6 \text{ ml} \cdot \text{kg} \cdot \text{KG}^{-1}$ ) only increased by an average of  $0.5$  [95 % CI:  $0.2 - 0.7$ ] ppb/h. After switching to protective tidal volumes, there was a median decrease of  $2.0$  [interquartile range (IQR):  $0.9 - 3.2$ ] ppb or a median percentage reduction of  $38$  [IQR:  $31 - 43$ ] % in exhaled pentanal concentration.

The exhaled pentanal concentration did not correlate with that in blood plasma. There was also no significant difference with respect to the inflammation and apoptosis markers investigated. The histology of the lungs showed no differences between the groups with different levels of ventilatory activity.

Pentanal is a potential biomarker for detecting the onset and cessation of lung-damaging ventilation.

## 2 Einleitung

### 2.1 Geschichtlicher Überblick und aktuelle Problematik der maschinellen Beatmung

Weltweit finden jährlich etwa 200 Millionen chirurgische Eingriffe statt [112]. Eine mechanische Beatmung ist bei vielen dieser Eingriffe zu einer notwendigen Selbstverständlichkeit geworden. Auch ist diese weder aus der Notfall- noch aus der intensivmedizinischen Versorgung vor allem bei respiratorisch dekompensierten Patienten wegzudenken [89]. Obwohl das Prinzip der mechanischen Beatmung schon seit längerer Zeit bekannt war, dauerte es bis in das 20. Jahrhundert, bis diese eine in der Routine genutzte Therapie wurde [89].

Bereits Mitte des 18. Jahrhunderts beschrieb John Fothergill eine beobachtete Mund-zu-Mund-Beatmung bei einem bewusstlosen Menschen. Hierbei hob er das Vorgehen der Beatmung von Mund zu Mund hervor, da eine Lunge nur so viel Kraft aushielte, wie eine Lunge maximal aufbringen könne. Fothergill machte sich also bereits vor fast 300 Jahren Gedanken über die schädigenden Auswirkungen einer Beatmung [10].

Die Idee, dass die mechanische Beatmung neben ihrer meist lebenserhaltenden Notwendigkeit auch potenziell schädigend wirken kann, kam erneut im Rahmen der Polio Epidemie in den 1950er Jahren auf. In diesem Zusammenhang wurde der Begriff des „Respiratorischen Lungen-Syndroms“ Mitte der 1960er Jahre geprägt und die beobachteten Lungenschäden beschrieben, welche bei der Obduktion von verstorbenen Polio-Patienten festgestellt wurden [91].

Dass hohe Tidalvolumina nicht nur vorgeschädigte Lungen in Mitleidenschaft ziehen, sondern auch intakte Lungen nachhaltig schädigen, wurde bereits 1974 von Webb und Tierney nachgewiesen [111].

Dennoch wurden besonders anfänglich bei respiratorisch schlechten Patienten, z. B. im Rahmen eines akuten Lungenversagens (engl. acute respiratory distress syndrome, ARDS), hohe Tidalvolumina und Beatmungsdrücke zugunsten eines normwertigen arteriellen Kohlenstoffdioxidpartialdrucks und pHs toleriert [59, 89, 103]. So dauerte es bis 1998, als Amato et al. erstmalig mögliche positive Effekte eines niedrigeren Tidalvolumens untersuchten. Die Studie musste frühzeitig beendet werden, da sich in der mit einem niedrigen Tidalvolumen beatmeten Gruppe ein signifikanter Überlebensvorteil gegenüber konventionell behandelten Patienten zeigte [3].

Trotz dieser Ergebnisse dauerte es noch einige Zeit, bis sich eine lungenprotektive Beatmung mit möglichst niedrigen Tidalvolumina durchsetzte [103]. Die von Jaswal et al. in einem Review von 2014 veröffentlichte Umsetzung niedriger Tidalvolumina ( $V_T = 4 - 6$  ml) wird nach den aktuellen Leitlinien mittlerweile als Goldstandard im ARDS-Netzwerk sowie z. B. bei der deutschen Sepsis-Gesellschaft

angesehen [1, 51]. In der Übersichtsarbeit von Jaswal et al. zeigte sich, dass es zwar zu einer Reduzierung der verwendeten Tidalvolumina bei langzeitbeatmeten Patienten kam, die angestrebten  $6 \text{ ml} \cdot \text{kgKG}^{-1}$  aber noch nicht regelhaft erreicht wurden [51]. Der Fokus der verschiedenen Kliniken schien eher auf der Begrenzung des Beatmungsspitzen drucks auf  $30 \text{ cmH}_2\text{O}$  zu liegen [40, 51]. Dies mag einerseits durch eine mangelnde Aufklärung bezüglich der Wichtigkeit eines niedrigen Tidalvolumens begründet sein, andererseits ist die Adaptierung des Tidalvolumens an das ideale Körpergewicht aufgrund einer strukturellen Veränderung beispielsweise im Rahmen eines akuten Lungenversagens (Acute Respiratory Distress Syndrom = ARDS) nicht immer anwendbar [40, 51]. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass es sich bei dem ARDS um eine unterdiagnostizierte Erkrankung handelt, welche aber bei einer nicht protektiven Beatmung eine deutliche Reduzierung des Gesamtüberlebens nach sich zieht und somit eine optimale Adaptierung an den Zustand des Patienten erfordert [3, 12].

Die Ventilator-induzierte Lungenschädigung ist und bleibt ein Problem vor allem im Bereich der intensivmedizinischen Versorgung des akuten Lungenversagens und geht weiterhin mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher [33]. So versterben mehr als 40 % der Patienten, welche an einem ARDS leiden [106]. Ein Verfahren zur schnellen und nicht-invasiven Detektion einer Ventilator-induzierten Lungenschädigung könnte möglicherweise die Behandlung dieser Patienten verbessern [93]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten wir daher einen möglichen Biomarker für eine Ventilator-induzierte Lungenschädigung in der Ausatemluft.

## 2.2 Grundlagen Atemmechanik

Ein regelmäßiger Austausch des Atemgases in der Lunge ist zur Vermeidung einer Hypoxie (Sauerstoffunterversorgung) des Organismus unabdingbar. Trotz eines regelmäßigen Übergangs des Sauerstoffs ( $\text{O}_2$ ) in die Blutbahn und des Abstroms von Kohlenstoffdioxid ( $\text{CO}_2$ ) in den Alveolarraum muss die Sauerstoffkonzentration in dem stoffwechselaktiven Bereich konstant gehalten werden. Hierzu ist ein stetiger Austausch der Alveolarluft mit der Umgebungsluft notwendig. Jedoch wird nicht bei jedem Atemzug das komplette Gasvolumen der Lunge ausgetauscht, sondern lediglich das sog. Atemzugvolumen (auch Tidalvolumen =  $V_T$ ). Dieses Inspirationsvolumen kann bei Bedarf willkürlich gesteigert werden. Das nach normaler Inspiration noch zusätzlich maximal einatembare Volumen bezeichnet man als Inspiratorisches Reservevolumen (IRV). Das Volumen, welches man nach einer normalen Expiration noch zusätzlich ausatmen kann, wird als das expiratorische Reservevolumen (ERV) bezeichnet. Die Kombination der drei Volumina ERV,  $V_T$  und IRV bezeichnet man als die (inspiratorische) Vitalkapazität (IVC). Diese beschreibt das Gasvolumen, welches maximal von einem Menschen aus eigener Kraft heraus bewegt werden kann [110].

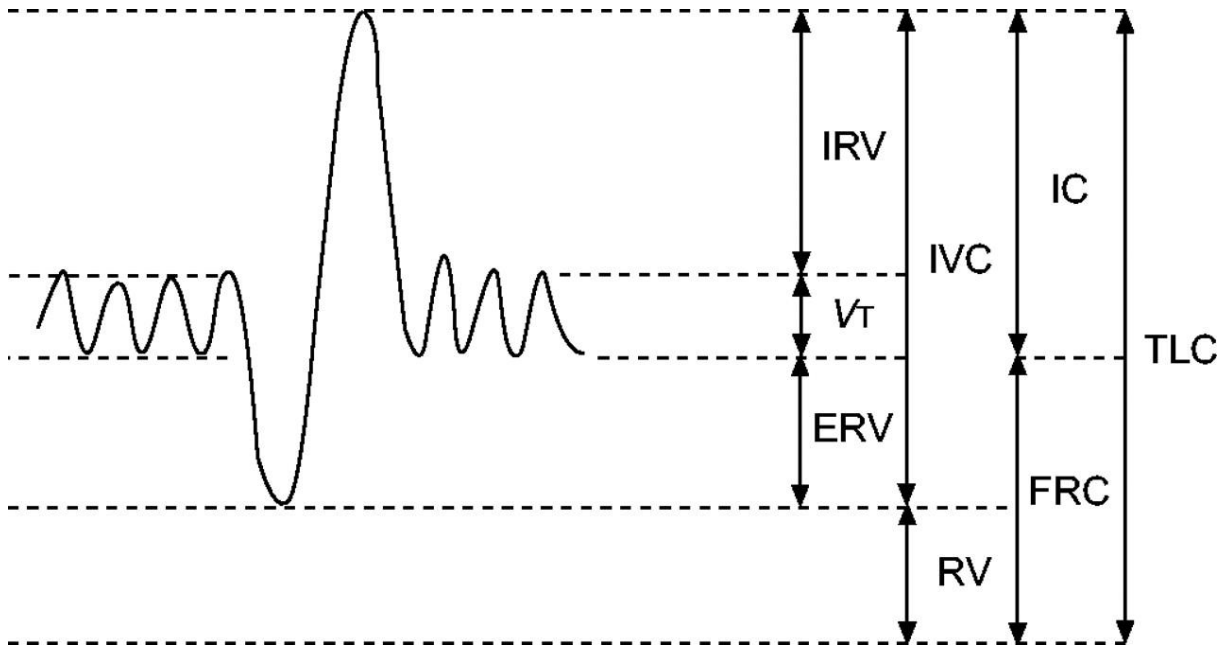


Abbildung 1 Lungenvolumina und -kapazitäten anhand eines normalen Atemmusters. Zunächst Atmung in Ruhe gefolgt von einer maximalen Expiration mit anschließender maximaler Inspiration: IRV = inspiratorisches Reservevolumen,  $V_T$  = Tidalvolumen, ERV = Expiratorisches Reservevolumen, IVC = inspiratorische Vitalkapazität, RV = Residualvolumen, IC = Inspiratorische Kapazität, FRC = Funktionelle Residualkapazität, TLC = Totale Lungenkapazität [112].

Das Volumen, welches nach maximal möglicher Ausatmung noch in der Lunge verbleibt, bezeichnet man als Residualvolumen (RV). Die Kombination aus Residualvolumen und expiratorischem Reservevolumen (ERV) ist die funktionelle Residualkapazität (FRC) eines Menschen. Das gesamte Volumen der Lunge bestehend aus der inspiratorischen Vitalkapazität (IVC) und dem Residualvolumen (RV) bezeichnet man als die totale Lungenkapazität (TLC) [110].

Die Atmung geschieht unter physiologischen Verhältnissen mittels der Erzeugung eines Unterdrucks. Da das Lungengewebe keine quergestreifte Muskulatur besitzt, bedarf es einer passiven Dehnung des Lungengewebes durch eine Vergrößerung des intrathorakalen Volumens [84].

Die folgenden Drücke beziehen sich jeweils auf den atmosphärischen Druck. Dieser wird zur Vereinfachung gleich Null gesetzt. Es ergibt sich also:

Atmosphärischer Druck = Nulldruck

Positiver Druck > atmosphärischer Druck

Negativer Druck < atmosphärischer Druck

Der mit Pleuraflüssigkeit gefüllte Pleuraspalt bildet die Grundlage des Atemvorgangs. Dieser befindet sich zwischen der Pleura parietalis der Brusthöhle sowie der Pleura visceralis der Lunge. Durch die elastischen Rückstellkräfte der Lunge und den starren Thorax kommt es zu entgegengesetzten Kräften

und damit zu einem Unterdruck (Pleuradruck [ $P_{\text{pleu}}$ ]) in diesem Spalt von etwa  $-5 \text{ cmH}_2\text{O}$  bei einem lungengesunden Probanden.

Das Verhältnis von Alveolardruck zu Atmosphärendruck wird als Pulmonaldruck ( $P_{\text{pul}}$ ) bezeichnet.

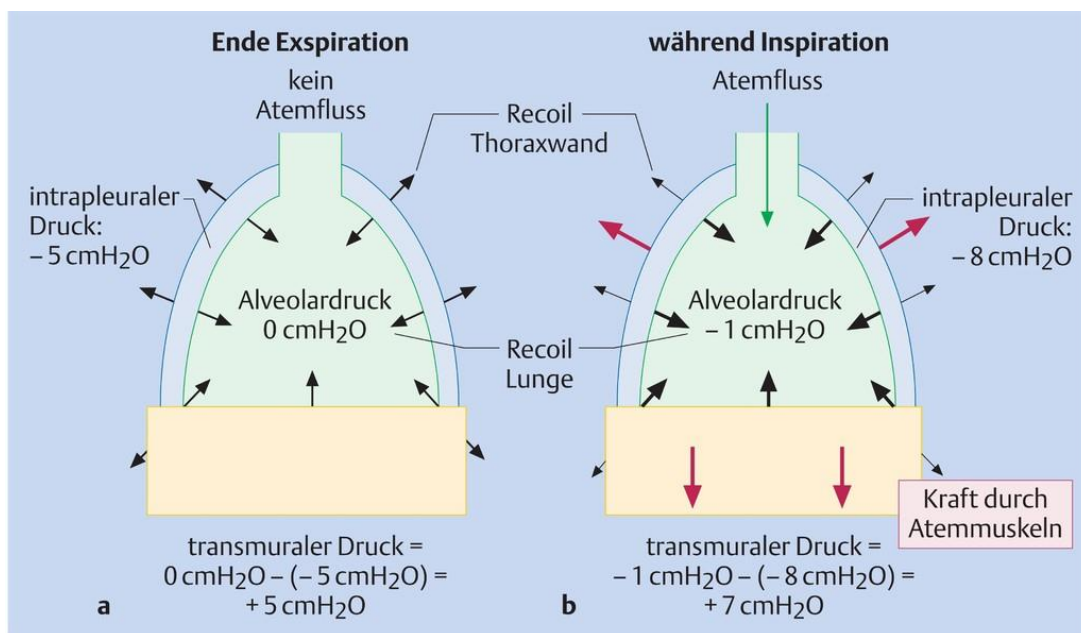
Es gilt:

$$P_{\text{pul}} = [N/m^2]$$

Dieser ist in Ruhe, also am Ende der Expirationsphase gleich dem Atmosphärendruck ( $P_{\text{Atm}}$ ).

$$P_{\text{pul}} = P_{\text{Atm}}$$

Sobald der Atmosphärendruck dem Alveolardruck entspricht, kommt es zu einem Sistieren des Luftstroms.



**Abbildung 2** Interaktion von Lunge und Brustwand. Der Recoil der Lunge entspricht den elastischen Rückstellkräften. Die Druckverhältnisse werden beispielhaft für den Zeitpunkt des Expirationsendes (a) und während der Inspirationsphase (b) dargestellt [6].

Bei der Inspiration kommt es durch verschiedene Muskelgruppen, wie dem Zwerchfell und der Atemhilfsmuskulatur, zu einer Expansion des intrathorakalen Volumens. Aufgrund des negativen Pleuradrucks wird die Lunge passiv mitgedehnt. Dies geschieht gegen die lungeneigenen Rückstellkräfte, womit sich der Pleuradruck weiter negativiert.

Es gilt:

$$P_{\text{Pleu insp}} < P_{\text{Pleu Ruhe}}$$

Da sich die Lungenfläche vergrößert, kommt es zu einer Veränderung des pulmonalen Drucks.

$$P_{\text{Pul insp}} = N/m_1^2 < N/m_2^2 = P_{\text{Pul Ruhe}}$$

Daraus folgt:

$$P_{\text{Atm}} > P_{\text{Pul insp}}$$

Dementsprechend kommt es zu einem Luftestrom in die Lunge.

Im Gegensatz zu der Inspiration läuft die Expiration größtenteils passiv ab. Hierbei sind die elastischen Rückstellkräfte der Lunge die treibende Kraft. Diese verkleinern das Lungenvolumen und somit wird der pulmonale Druck erhöht:

$$P_{\text{Pul insp}} = N/m_1^2 < N/m_2^2 = P_{\text{Pul exp}}$$

Und damit auch:

$$P_{\text{Pul exp}} > P_{\text{Atm}}$$

Infolgedessen kommt es zu einem Ausströmen der Alveolarluft. Im Rahmen einer forcierten Expiration wird zusätzlich die Atemhilfsmuskulatur rekrutiert, um das intrathorakale Volumen aktiv zu verkleinern und somit einen intrapulmonalen Überdruck zu erzeugen [84].

Zusätzlich zu dem Pulmonaldruck ( $P_{\text{pul}}$ ) und dem Pleuradruk ( $P_{\text{pleu}}$ ) gibt es noch den sog. Transpulmonaldruck ( $P_{\text{tp}}$ ) oder auch Transmuraldruck. Dieser bezeichnet die Differenz zwischen dem Pulmonaldruck und dem Pleuradruk.

$$P_{\text{tp}} = P_{\text{pul}} - P_{\text{pleu}}$$

Beim Lungengesunden ist dieser Wert immer positiv. Der Transpulmonale Druck kann sich durch verschiedene Szenarien verändern. Eine in der Medizin häufig beobachtete Verletzung, der sog. Pneumothorax z. B. nach einer Rippenserienfraktur, führt zu einer Angleichung des Pleuradrucks an den Atmosphärendruck. Dies führt bei einem errechneten Transpulmonaldruck  $P_{\text{tp}} \leq 0$  zu einem Kollaps der Lunge [72]. Ebenso gilt ein Wert von  $P_{\text{tp}} \geq 15 \text{ cmH}_2\text{O}$  als ein wichtiger Faktor bezüglich der Entstehung eines Barotraumas (s. u.). Da sich die künstliche Beatmung stark von der physiologischen Atmung unterscheidet, kann es hierbei zu einer Verschiebung des Transpulmonaldrucks in pathologische Bereiche kommen. Eine Optimierung der Beatmungsparameter ist dementsprechend anzustreben [91].



## 2.3 Die künstliche Beatmung

In den meisten Anwendungen einer künstlichen Beatmung steht die Normalisierung der alveolären Ventilation im Vordergrund [89]. Als Grundsatz gilt es, einen effektiven Luftaustausch bei möglichst geringer inspiratorischer Sauerstofffraktion ( $F_{iO_2}$ ) und möglichst niedrigem Beatmungsdruck zu ermöglichen [59].

Im Gegensatz zur Spontanatmung kommt das Druckgefälle für den Luftstrom bei der maschinellen Beatmung nicht durch einen Unterdruck, sondern durch einen Überdruck zustande [72, 80].

Hierbei wird mittels eines sog. Respirators oder Ventilators mit regelbarem Sauerstoffgehalt über einen Endotrachealtubus oder eine ähnliche Vorrichtung ein Überdruck erzeugt, welcher an die oberen Atemwege und schließlich auf die Alveolen übertragen wird, was zu einem Lufteinstrom führt [108].

Dies hat zur Folge, dass sich der intrapulmonale Druck  $P_{pul}$  dauerhaft im positiven Bereich befindet. Auch der Interpleuraldruck verschiebt sich durch den zunehmenden intraalveolären Druck in den positiven Bereich, oder zumindest in den weniger negativen Bereich [80].

In der klinischen Praxis gibt es verschiedene Möglichkeiten einer kontrollierten Beatmung. Diese lassen sich grob in eine druck- (pressure-controlled ventilation = PCV) bzw. volumenkontrollierte Beatmung (volume-controlled ventilation = VCV) aufteilen. Hierbei gibt es jeweils eine unabhängige und eine abhängige Variable. Im Beispiel der volumenkontrollierten Beatmung legt der Anwender ein bestimmtes inspiratorisches Volumen fest. Dieses Volumen wird mit jedem Atemhub vom Respirator angestrebt (unabhängige Variable). Der dafür notwendige Beatmungsdruck ( $P_{insp}$ ) ist abhängig von der Dehnbarkeit (Compliance) der Lunge [80].

Die Dehnbarkeit der Lunge bezeichnet die Volumenänderung pro Druckänderung  $c = \frac{\Delta V}{\Delta p}$ .

Bei einer niedrigen Compliance kann es bei hohen Beatmungsdrücken zur Entstehung von druckbedingten Schädigungen des Lungenparenchyms kommen (Barotrauma).

Im Gegensatz dazu ist bei einer druckkontrollierten Beatmung der Druck die unabhängige und das Volumen die abhängige Variable.

Weitere wichtige Parameter einer Beatmungseinstellung sind der positive endexpiratorische Druck (engl. positive end-expiratory pressure = PEEP), der Spitzendruck (engl. peak pressure =  $P_{peak}$ ) und der Plateaudruck ( $P_{plat}$ ).

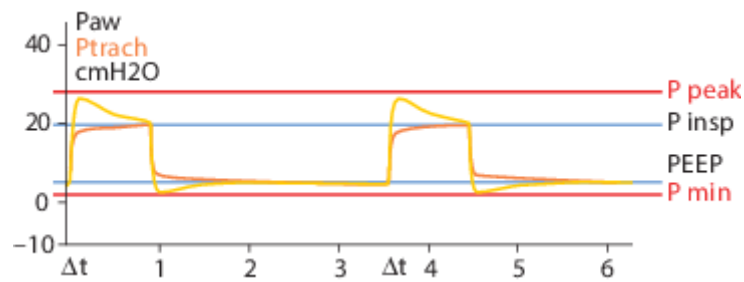


Abbildung 3 Grafische Darstellung der verschiedenen Beatmungsdrücke während einer maschinellen Inspiration [55].

Das Atemzugvolumen hängt hierbei vom erreichten Spitzen- bzw. Plateaudruck (auch Inspirationsdruck) der Beatmung ab.

Mithilfe des positiven endexpiratorischen Drucks (PEEP) kann eine komplette Absenkung des intrapulmonalen Druckes verhindert werden und auch über die vollständige Expiration hinaus ein konstanter intrathorakaler Druck erhalten werden.

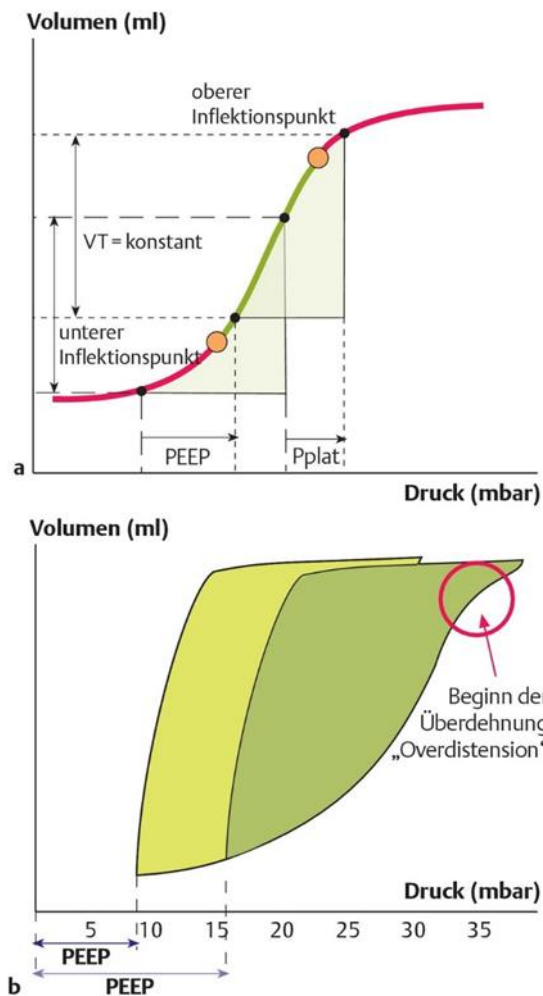
Eine mangelhafte Einstellung dieser Beatmungsdrücke kann zu einer sog. Ventilator-induzierten Lungenschädigung (VILI) führen (s. u.). Hierbei führen z. B. ein zu niedrig gewählter PEEP zu einem Atelektrauma, während ein zu hoch eingestellter PEEP den Inspirationsdruck soweit verschieben kann, dass die Möglichkeit eines Volu- bzw. Barotraumas gegeben ist [72].

## 2.4 Ventilator-induzierte Lungenschädigung

Als Ventilator-induzierte Lungenschädigung (engl. ventilator-induced lung injury, VILI) bezeichnet man die durch falsche oder mangelhafte Beatmung auftretenden Lungenschädigungen [23, 43]. Die Ventilator-induzierte Lungenschädigung kann durch die nachfolgenden Pathomechanismen entstehen.

### 2.4.1 Volutrauma

Als Volutrauma bezeichnet man Schäden des Lungengewebes aufgrund zu hoher Tidalvolumina [72, 88]. Dies geschieht aufgrund einer Überdehnung (dem sog. „Strain“ s. u.) des Lungengewebes. Im Bereich des oberen Inflektionspunktes kommt es zu einer Überdehnung der Alveoli mit resultierenden Lungenschäden [34].



**Abbildung 4 Druck-Volumenkurve der Lunge. (a): Im Bereich zwischen beiden Inflektionspunkten liegt der Bereich der optimalen Compliance. In den Bereichen oberhalb des oberen Inflektionspunktes kann es zu Volu- und Barotraumata kommen (b). Im Bereich unterhalb des unteren Inflektionspunktes kommt es zu Atelektraumata [72].**

Durch diese Überdehnung kommt es zu einer Erhöhung des vaskulären Filtrationsdruckes. Ebenfalls werden Gefäßendothel, Epithel und die Basalmembran der Blut-Luft-Schranke geschädigt. Bei zu starker Überdehnung kann es zur Lungenruptur kommen [23, 74].

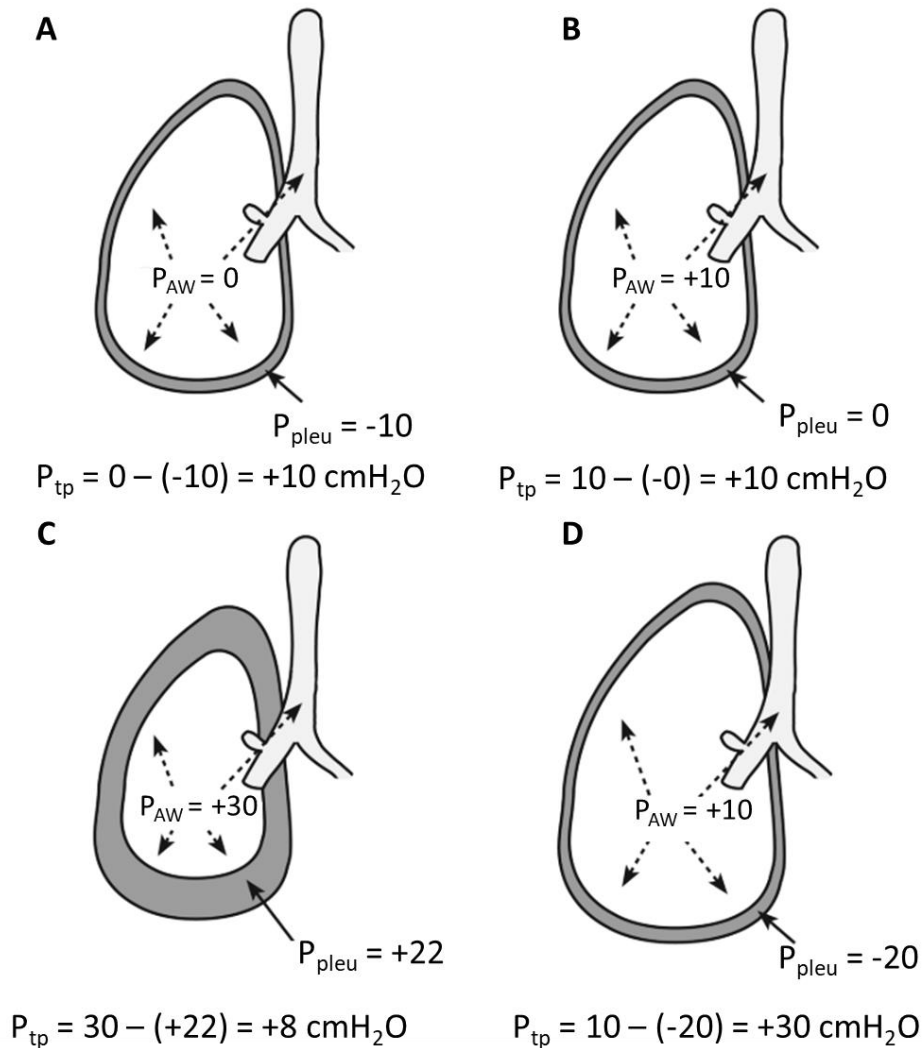
Vergleichbar mit einer Überdehnung der Lunge durch sehr hohe Tidalvolumina kann es ebenso bei einer zu hohen Druckbelastung des Gewebes zu einer Lungenschädigung kommen. Dies bezeichnet man als Barotrauma.

## 2.4.2 Barotrauma

Das Barotrauma bezeichnet die Lungenschädigung aufgrund der unphysiologischen Druckverhältnisse, welche während der Beatmung zur suffizienten Ventilation benötigt werden. Das Lungengewebe ist

hierbei anfälliger für Leckagen und in diesem Sinne auch gefährdet, einen Spannungspneumothorax zu entwickeln [23]. Entgegen der ursprünglichen Annahme, dass hohe Spitzendrücke ursächlich für die Barotraumatata seien, ergaben die Studien von Dreyfuss et al. keine vermehrte Lungenschädigung bei hohen Atemwegsdrücken unter niedrigen Tidalvolumina [31].

Hierbei ist jedoch nicht der alleinige inspiratorische Spitzendruck ( $P_{peak}$ ), sondern vielmehr der sog. Transpulmonale Druck ( $P_{tp} = P_{pul} - P_{pleu}$ ) entscheidend [31, 39, 94].



**Abbildung 5** Transpulmonaler Druck  $P_{tp}$  [cmH<sub>2</sub>O],  $P_{AW}$  = Atemwegsdruck [cmH<sub>2</sub>O],  $P_{pleu}$  = Pleuradruck [cmH<sub>2</sub>O], A = Spontanatmung, B = intubierter Patient ohne respiratorische Vorerkrankungen, C = intubierter Patient mit Steifheit des Thorax, trotz hoher Beatmungsdrücke kommt es zu einem verhältnismäßig niedrigen transpulmonalem Druck, D = Intubierter Patient mit forcierter druckunterstützter Atemexkursion bei negativem Pleuradruck z. B. im Rahmen einer Unterdruckbeatmung (Eiserne Lunge), trotz niedrigen Atemwegsdrücken kommt es zu einem hohen transpulmonalen Druck [11].

In der Klinik sind Volu- und Barotrauma nur schwer voneinander zu differenzieren und laufen meist parallel ab. Sowohl die hohen Tidalvolumina als auch die erhöhten transpulmonalen Drücke können zu einer Überdehnung und damit Schädigung der Lunge führen [34].

Auf der anderen Seite hat ein zu niedrig eingestellter PEEP mitunter ein Kollabieren der Alveolen zur Folge und begünstigt die Entstehung eines Atelektraumas.

### 2.4.3 Atelektrauma

Atelektasen sind kollabierte und demnach nicht mehr ventilierte Lungenabschnitte. In der endexpiratorischen Phase kann ein niedriger transpulmonaler Druck das Entstehen von Atelektasen begünstigen [90]. Diese Lungenabschnitte werden in der nachfolgenden Inspiration wieder eröffnet, um in der Expiration erneut zusammenzufallen.

Durch das Surfactant (engl. surface active agent) wird dieses Kollabieren der Alveolen in der Regel verhindert, jedoch ist die Surfactantbildung in den Typ II Alveolarzellen im Rahmen des wiederholten Alveolarkollapses oder auch einer akuten Lungenschädigung gestört [14, 98].

Hierbei kann es zum Atelektrauma kommen, was eine Zerstörung der Adhäsionsmoleküle des Zytoskeletts bewirkt und zu einer Verstärkung der Lungenschädigung beiträgt [23, 98].

Um die Problematik einer atelektatisch veränderten Lunge darzustellen, möchte ich das LaPlace-Gesetz erläutern.

$$P = 2\gamma/r$$

Hierbei steht  $\gamma$  für die Oberflächenspannung des Alveolus und  $r$  für dessen Radius. Bei einer kollabierten Lunge entspricht der Radius einem Wert von nahezu  $r = 0$ . Dies führt zu einer starken Erhöhung des Öffnungsdrucks der nicht ventilierten Areale und kann zu schweren Schäden führen [53].

Eine inhomogen belüftete Lunge ist empfänglich für Scherkräfte. Gerade an der Übergangszone zwischen ventilierten und nicht ventilierten, also atelektatischen Lungenabschnitten sind diese besonders ausgeprägt [72], was im folgenden Kapitel weiter ausgeführt wird.

### 2.4.4 Scherkräfte

Das Zusammenspiel der einzelnen Schädigungsmuster von Volu-, Baro- und Atelektrauma lässt sich mit Hilfe der Scherkräfte erklären. Hierbei haben sich die Begriffe (Scher-)Stress und Beanspruchung (engl. stress and strain) etabliert.

Hierbei bezeichnet Stress als physikalische Größe die Kraft (F) pro Flächeneinheit (A). Dies entspricht in der Medizin dem Transpulmonaldruck [15, 39]. Strain bezeichnet hierbei die Aufdehnung der Lunge, genauer: die Veränderung des Lungenvolumens V zum Ausgangsvolumen  $V_0$ . Es kann zwischen dem statischen Strain durch die Applikation eines PEEP und dem dynamischen Strain bei der Beatmung mit einem Tidalvolumen  $V_T$  unterschieden werden [15].

$$(1) \text{Strain}_{\text{stat}} = V_{\text{PEEP}} / \text{FRC}$$

$$(2) \text{Strain}_{\text{dyn}} = V_T / \text{FRC}$$

$V_{\text{PEEP}}$  bezeichnet hierbei die Differenz zwischen dem endexpiratorischen Lungenvolumens (EELV) und der funktionellen Residualkapazität (FRC).

$$(3) V_{\text{PEEP}} = \text{EELV} - \text{FRC}$$

Setzt man „Stress“ und „Strain“ in Abhängigkeit voneinander ergibt sich [42]:

$$(4) \text{Stress} = k * \text{Strain}$$

Hierbei steht k für die spezifische Elastance der Lunge (elastischer Lungenwiderstand =  $E_L$ ). Somit kann man folgern:

$$(5) P_{\text{TP}} = E_L * V_T / \text{FRC}$$

Der elastische Lungenwiderstand (Elastance) berechnet sich als Division des PEEP und der durch ihn hervorgerufenen Volumenänderung  $V_{\text{PEEP}}$ . Der spezifische Lungenwiderstand ist das Produkt aus Elastance und der funktionellen Residualkapazität.

$$(6) \text{Elastance} = \text{PEEP} / V_{\text{PEEP}}$$

$$(7) E_L = \text{Elastance} * \text{FRC}$$

Dementsprechend kann man folgern:

Je kleiner die funktionelle Residualkapazität, desto kleiner die Elastance der Lunge.

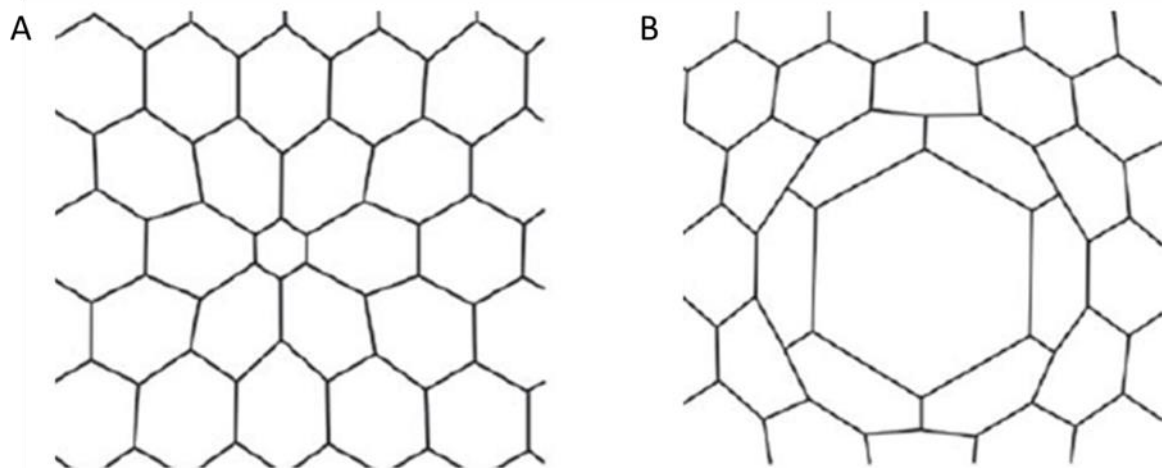
Ein kleines Restvolumen nach normaler Expiration, z. B. infolge eines „Alveolar Respiratory Distress Syndroms“ (ARDS), führt somit zu einer geringeren Dehnbarkeit der Lunge und benötigt dementsprechend eine Anpassung des Tidalvolumens [41].

Als weiterer Risikofaktor einer Ventilator-induzierten Lungenschädigung gilt ein zu großer Unterschied zwischen expiratorischem und inspiratorischem Beatmungsdruck. Dieser sog. „Driving Pressure“

berechnet sich aus der Differenz von Plateaudruck und PEEP und sollte während einer mechanischen Beatmung möglichst gering gehalten werden [4, 22, 43].

$$(8) \text{ Driving Pressure } \Delta P = P_{\text{plateau}} - \text{PEEP}$$

Werden die Öffnungsdrücke für atelektatische Lungenabschnitte nicht erreicht oder kam es zu ödematösen Veränderungen des Lungenparenchyms, kommt es durch die Verknüpfung der Lungenbläschen zu einer Ausbreitung der Scherkräfte auf benachbarte Alveoli [11, 43] (vgl. Abb. 6).



**Abbildung 6 Einfluss kollabierter oder ödematös veränderter Alveoli auf benachbarte Lungenbereiche A = Atelektase des zentralen Alveolus sorgt für Scherkräfte auf benachbarte Alveoli; B = Aufdehnung des zentralen Alveolus sorgt für Scherkräfte auf benachbarte Alveoli; nach [63].**

Dies hat eine Migration von neutrophilen Granulozyten in inhomogen belüftete Bereiche zur Folge, einhergehend mit den entsprechenden Inflammationsprozessen [113].

Begleitend können durch mikroskopische oder makroskopische Schäden Flüssigkeiten und Proteine in das Lungengewebe gelangen. Einerseits wird dies vom Körper durch eine entzündliche Reaktion beantwortet, andererseits kommt es durch das Ödem zu einer Verdickung der Blut-Luft-Schranke, was sich durch Diffusionsstörungen und anschließend im Sinne einer Hypoxie auf den Körper auswirken kann [31, 74].

Eine Verbesserung der Belüftungs-Homogenität durch erhöhte endexpiratorische Drücke (PEEP) oder das Etablieren einer Bauchlagerung könnte die Schwere von Ventilator-induzierten Lungenschäden bei akutem Lungenversagen senken [11].

Sowohl das Ausmaß des Strains als auch die applizierte Beatmungsfrequenz spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Ventilator-induzierten Lungenschäden [24, 107]. So haben einzelne Rekrutierungsmanöver keinen klinisch feststellbaren Einfluss auf die entstehende Lungenschädigung,

eine wiederholte Anwendung führt jedoch zu der Entstehung von Ventilator-induzierten Lungenschäden [18].

Durch das Zusammenspiel von Volu-, Baro und Atelektrauma kommt es in Folge des mechanischen Stresses durch die Scherkräfte und die zyklischen Dehnbewegungen der Beatmung zu einer Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und proinflammatorischer Mediatoren [73].

#### 2.4.5 Biotrauma

Während es bei Volu-, Baro- und Atelektrauma durch eine direkte Kraftübertragung zu einer mechanischen Schädigung der Lunge kommt, steht bei dem sog. Biotrauma die folgende Entzündungsreaktion im Fokus. Diese kennzeichnet sich primär durch ödematöse Veränderungen, Leukozyten-Extravasation und Endo- bzw. Epithelschäden [13].

Hierbei ist die Immunantwort des Lungengewebes die treibende Kraft [28]. Verschiedene Entzündungsmediatoren wandern in das Lungenparenchym ein, so werden z. B. Leukozyten rekrutiert und lokale Entzündungsprozesse in Gang gesetzt [28].

Es konnte gezeigt werden, dass eine Beatmung mit hohen Tidalvolumina zu einer erhöhten Konzentration von IL-1 $\beta$ , IL-6, vom Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) oder dem Macrophage Inflammatory Protein (MIP-2) in der bronchoalveolären Lavage führt [49, 100]. Dem liegt eine mechanische Stimulation der Integrine zugrunde, welche eine Ausschüttung von Entzündungsmediatoren bewirkt [42]. Durch einen Übergang von Entzündungsmediatoren in den systemischen Kreislauf kann es auch zu extrapulmonalen Manifestationen z. B. in der Niere oder Leber kommen [11, 28, 33].

Auch das Komplementsystem scheint einen Einfluss auf eine Ventilator-induzierte Lungenschädigung zu haben. So konnten Takahashi et al. 2011 nachweisen, dass eine Aktivierung des Komplementfaktors C3 die Aktivität von Thrombin, Kollagenase und MMPs (Matrix-Metalloproteasen) steigerte. Zurückzuführen ist dies auf den C5b-9 Komplex, welcher die mikrovaskuläre Permeabilität der Lunge erhöht [96].

Ebenso wurde ein direkter Einfluss mechanischer Reize auf die Entstehung einer Ventilator-induzierten Lungenschädigung nachgewiesen. So wurde eine erhöhte Aktivität von TRPV-Kanälen (engl. transient receptor potential vanilloid channels), v.a. TRPV-4 festgestellt, welche die Entstehung einer vaskulären Hyperpermeabilität begünstigen [85].



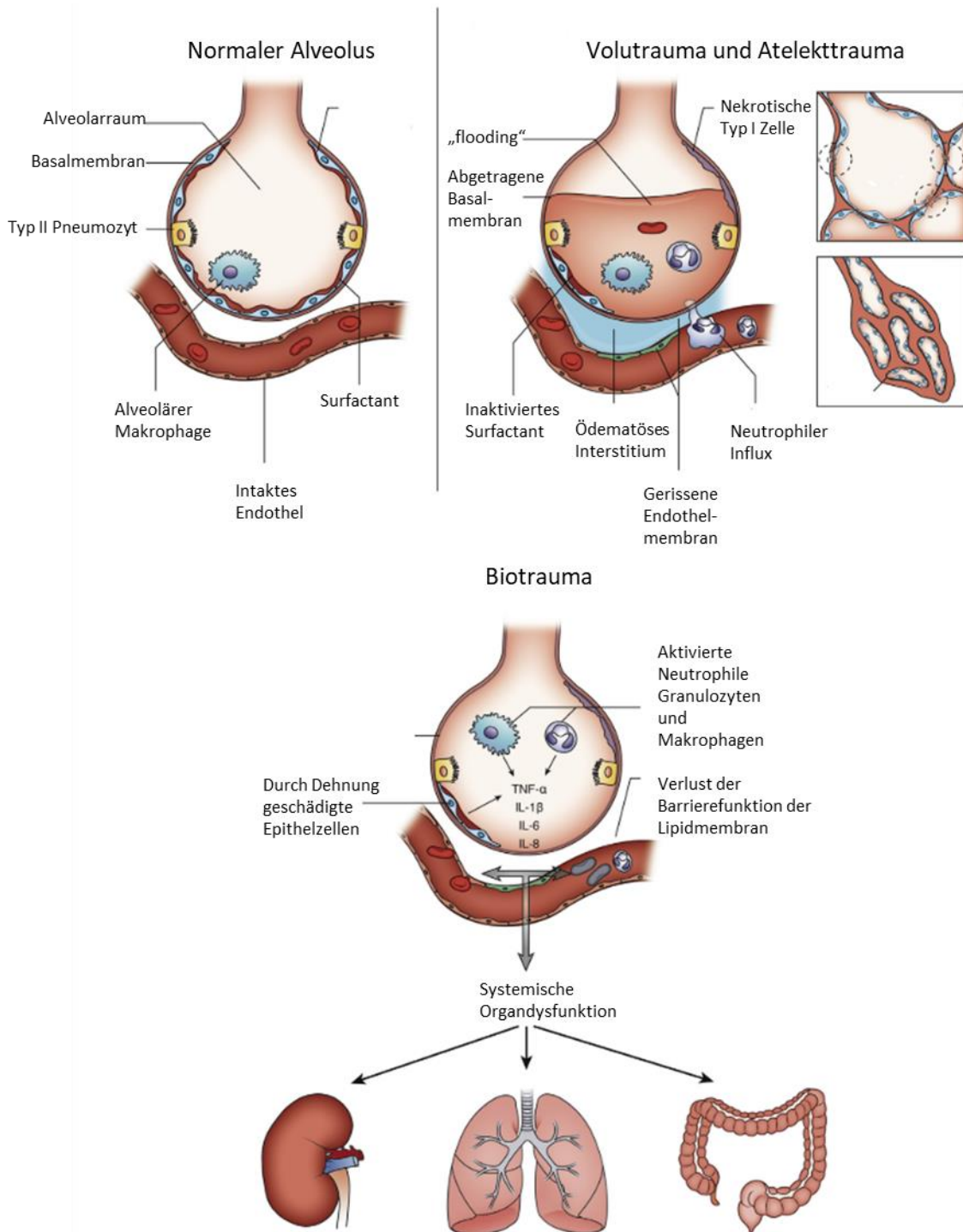
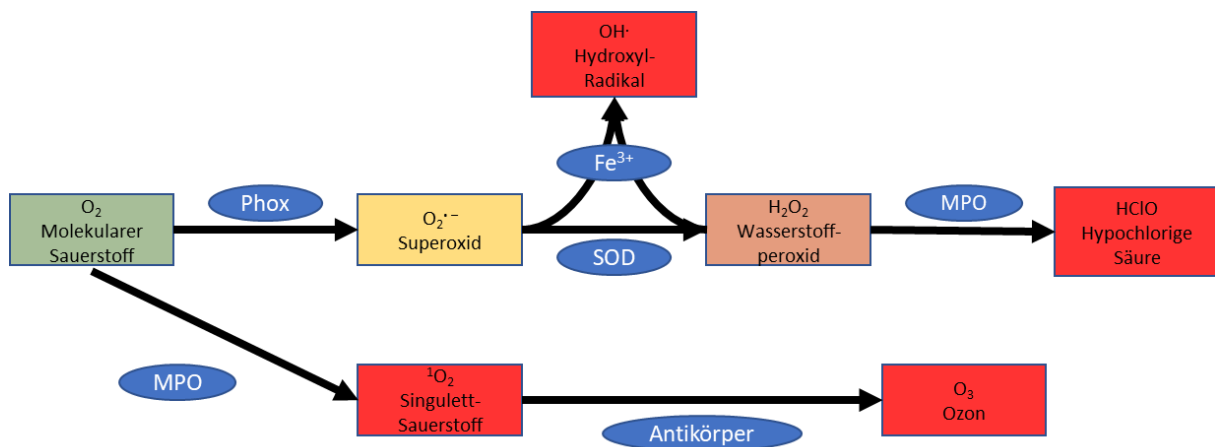


Abbildung 7 nach [28] Schematische Darstellung eines gesunden Alveolus verglichen mit denen bei erfolgtem Volu- und Atelek- bzw. Biotrauma. Die direkte Ventilation führt zu Schäden des Lungenendothels und -epithels. Dies führt zu ödematösen Veränderungen bis hin zum Übergang von interstitieller Flüssigkeit in den Alveolarraum mit gleichzeitiger Einschwemmung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. Ebenso kommt es zu einer Hyperpermeabilität am alveolar-kapillärem Übergang. Dies führt zu einer Einschwemmung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$ . Durch eine Schädigung der Blut-Luftschranke ist ein Übergang in den systemischen Kreislauf möglich.

## 2.5 Lipidperoxidation

Im Folgenden wird der Mechanismus der Lipidperoxidation detailliert erläutert, da dieser die Grundlage für die Entstehung des im Rahmen der vorliegenden Studie untersuchten Biomarkers Pentanal darstellt.

Dem Mechanismus der Lipidperoxidation liegen reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species = ROS) insbesondere Hydroxylradikale ( $\text{OH}\cdot$ ) zugrunde. Diese entstehen bei Reaktion von Elektronen mit molekularem Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ) und besitzen ungepaarte Valenzelektronen und somit eine verstärkte Reaktivität [17, 29].



**Abbildung 8** Die verschiedenen Radikaluntergruppen und ihre Synthese. Die Farben erlauben Rückschlüsse auf die Reaktivität: Grün: niedrig-, gelb: begrenzt-, orange: mittel- und rot: hochreaktiv. Phox.: Phagozytenoxydase, MPO: Myeloperoxidase, SOD: Superoxid Dismutase, modifiziert nach [118].

Die Gruppe der ROS wurde lange Zeit als ausschließlich schädigende Verbindungen gesehen, welche primär als Abfallprodukte im mitochondrialen Stoffwechsel entstehen. In der Mitte des 20. Jahrhunderts wurde die Theorie aufgestellt, die Hydroxyl- und Hydroperoxyl-Radikale würden zu einer Irritierung des Gleichgewichts des Körpers (Homöostase) und somit zur Entstehung von Mutationen, Tumoren und der Induktion von Alterungsprozessen beitragen. Diese Theorie wurde 1998 mit weiteren Studien von Beckham et al. und Ames et al. untermauert, wenngleich zwar ein Zusammenhang mit der Zellseneszenz als bewiesen gilt, eine eingeschränkte maximale Lebensdauer (MLSP = maximal life span) bisher nicht schlüssig bewiesen werden konnte [9, 47].

In den vergangenen Jahren wurden die reaktiven Sauerstoffspezies jedoch zunehmend aus einem anderen Blickwinkel betrachtet. Anstatt die reine Toxizität der Sauerstoffradikale in den Vordergrund zu stellen, wurden nun vielmehr die dem Körper nützlichen Eigenschaften betrachtet. Zu diesen gehören Funktionen hinsichtlich der Signalübertragung, der Biosynthese und der Immunabwehr. Auch

werden nun primär Störungen der ROS-Homöostase als Ursache verschiedener Erkrankungen angesehen [17, 29].

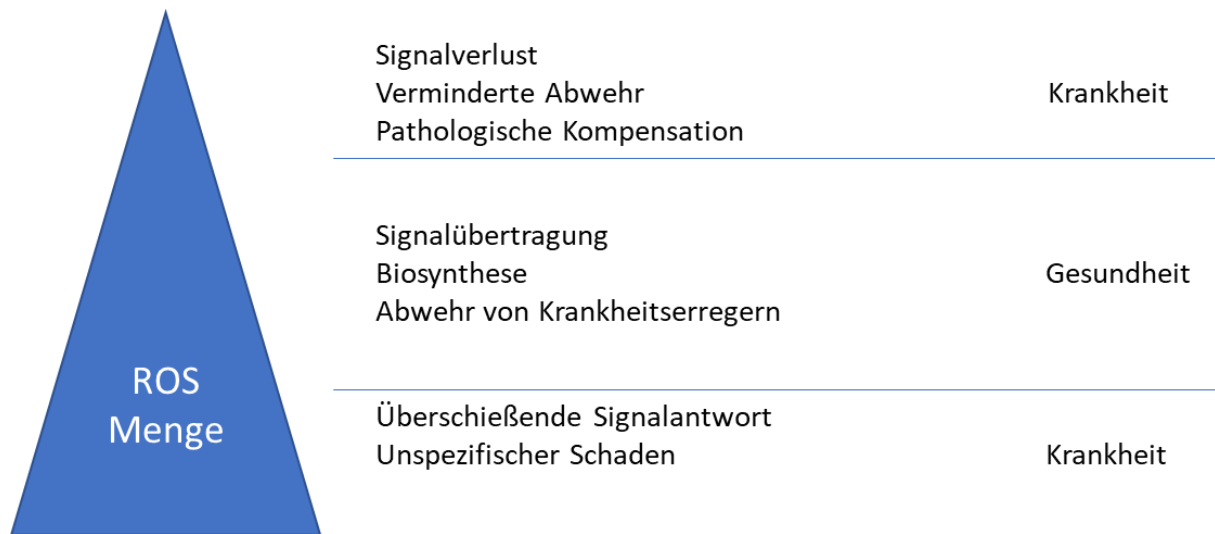


Abbildung 9 Wirkung der ROS in Bezug auf die vorhandene Menge. Es gibt einen „Optimalbereich“, in dem die ROS eine wichtige Rolle in Bezug auf die Signalweiterleitung, Biosynthese und Abwehrmechanismen des Körpers haben, modifiziert nach [17].

In vivo entstehen die meisten reaktiven Sauerstoffspezies in den Mitochondrien, der Plasmamembran, sowie im endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi-Apparat und in den Peroxisomen und Lysosomen. Neben diesen endogenen gibt es auch exogene Faktoren, welche eine ROS-Bildung bewirken. Zu diesen gehören unter anderem Tabakrauch, Umweltgifte und verschiedene Insektizide [66].

Im Allgemeinen geht man davon aus, dass hauptsächlich zwei Reaktionen für die Bildung von Hydroxylradikalen verantwortlich sind: Die Fenton-Reaktion und die Haber-Weiss-Reaktion [5].

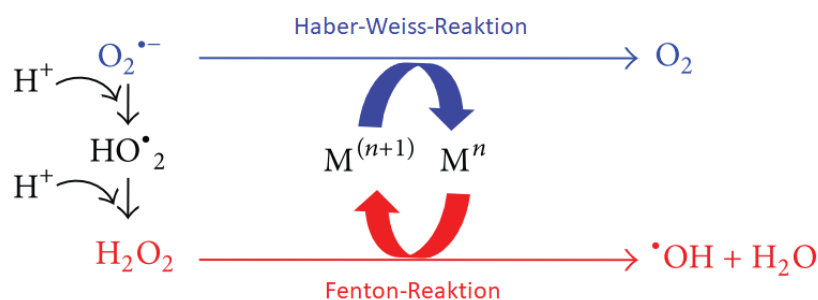
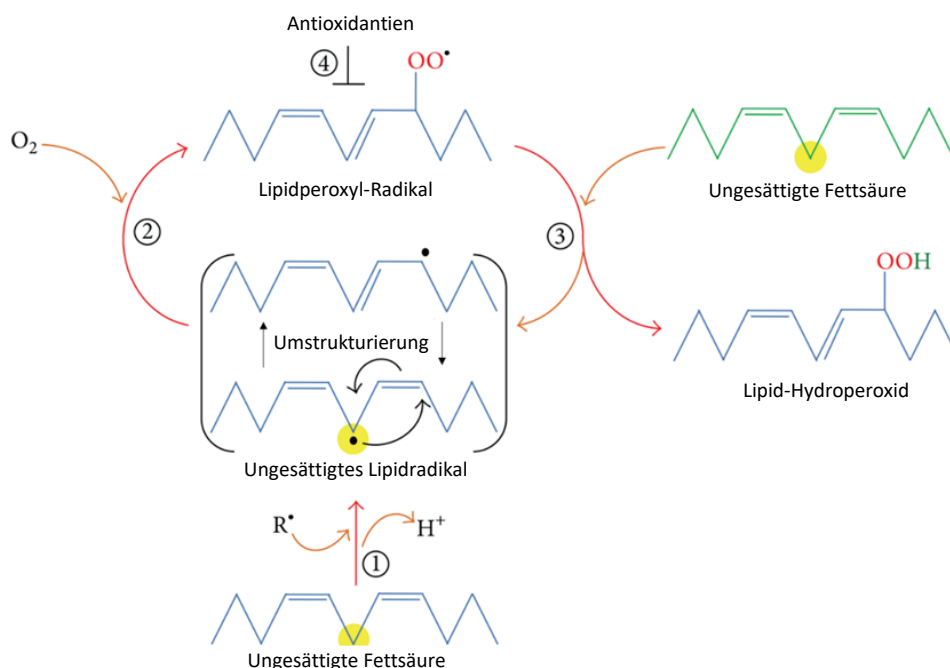


Abbildung 10: Übersicht Haber-Weiss- und Fenton-Reaktion. Bei der Fenton-Reaktion reagiert ein reduziertes Übergangsmetall ( $M^n$ ) mit Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), wohingegen bei der Haber-Weiss-Reaktion eine Reaktion von Superoxid ( $O_2^{\bullet-}$ ) mit der oxidierten Form des Übergangsmetalls erfolgt ( $M^{(n+1)}$ ). Als Übergangsmetalle kommen unter anderem Eisen (Fe), Kupfer (Cu), Nickel (Ni) und Cobalt (Co) vor. Modifiziert nach [5].

Die molekularchemischen Schädigungsmechanismen, welche durch oxidative Degradation von Lipiden entstehen, nennt man Lipidperoxidation, die in drei Phasen unterteilt werden kann. Hierbei handelt es sich um die Initiations-, Vermehrungs- (Propagations-) und Terminationsphase [5, 38, 122]. Im Folgenden werden die drei Phasen der Lipidperoxidation genauer dargestellt.

Bei der Initiation wird zunächst ein Radikal, meist aus einer reaktive Sauerstoffspezies (ROS), auf eine ungesättigte Fettsäure (vgl. Abb. 11) umgelagert. Das hierdurch entstandene Fettsäure-Radikal reagiert in der Propagationsphase mit molekularem Sauerstoff zu einem Fettsäure-Peroxyl-Radikal. Dieses Fettsäure-Peroxyl-Radikal ist hochreaktiv und wird mittels Wasserstoff zu einem Lipidhydroperoxid reduziert. Dieses Wasserstoffatom entstammt i. d. R. einer weiteren ungesättigten Fettsäure, welche nun ihrerseits eine freie Radikalbindung aufweist. Es beginnt eine Kettenreaktion, welche durch eine Terminationsreaktion beendet werden kann [5].

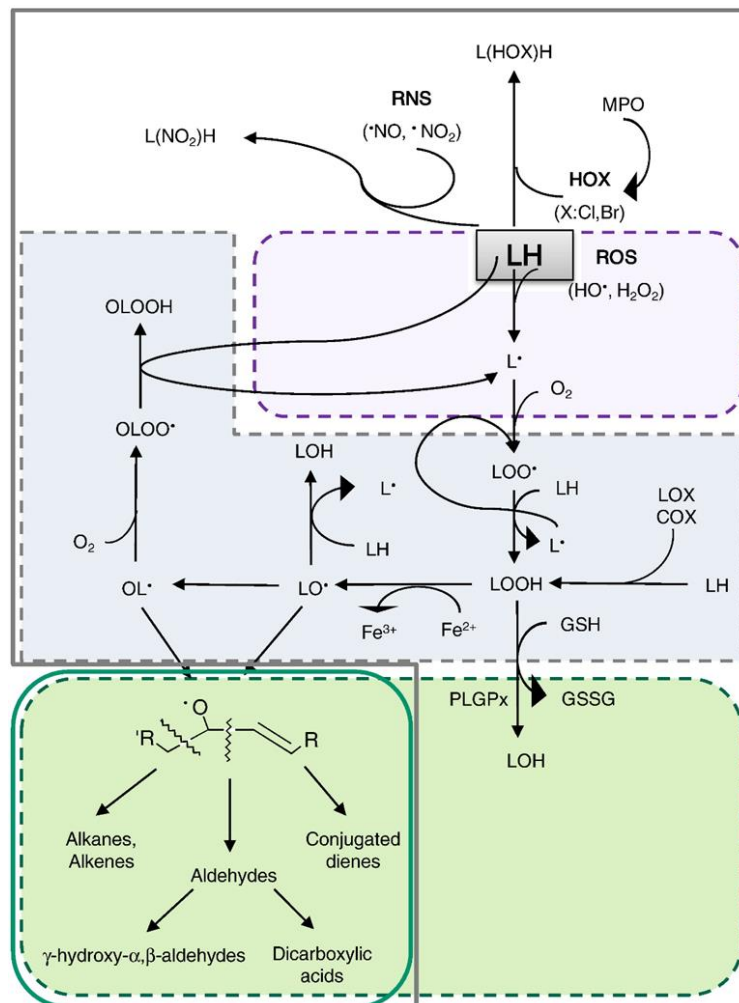
Bei der Termination stammt das Wasserstoffatom nicht von einer weiteren Fettsäure, sondern u. a. von Antioxidantien wie Vitamin E. Dass entstehende Vitamin E-Radikal kann anschließend mit einem weiteren Fettsäure-Peroxyl-Radikal reagieren und die Kettenreaktion so zum Erliegen bringen. Alternativ wird die Kettenreaktion ebenfalls durch eine Reaktion zweier Radikale miteinander terminiert [5, 122].



**Abbildung 11** Ablauf der Lipidperoxidation, mod. nach [5]. (1) Im Rahmen der Initiationsphase trifft ein Radikal auf eine ungesättigte Fettsäure und bildet ein Lipidradikal. (2) Durch eine molekulare Umlagerung stabilisiert sich das Kohlenstoffradikal. In der Vermehrungsphase kommt es durch molekularen Sauerstoff zu der Bildung eines Lipidperoxyl-Radikals. (3) Dieses ist ebenfalls hochreaktiv und kann Wasserstoff anderer ungesättigten Fettsäuren abspalten und diese dadurch ebenfalls radikalisieren. (4) Dieser Zyklus kann bspw. durch Antioxidantien unterbrochen und die Kettenreaktion somit beendet werden.

Schäden, welche durch die primären Produkte der Lipidperoxidation entstehen können, sind vielfältig. So kann es zu Veränderungen der DNA oder Proteinen kommen, welche Ursprung verschiedener degenerativer Erkrankungen wie M. Alzheimer, Atherosklerose und Karzinomen sein können [122].

Neben einer Radikalisierung von ungesättigten Fettsäuren kann auch eine mechanische Beatmung Auslöser einer Lipidperoxidation sein [67, 95]. Dies ist insbesondere bei der Untersuchung lungenschädigender Beatmungsmuster interessant.



**Abbildung 12 Vereinfachte Darstellung der Lipidperoxidation. Der violette Kasten stellt den Angriff eines freien Radikals auf eine Fettsäure dar, der graue Kasten zeigt die Ausbreitungsphase (Propagation) und der grüne Kasten bildet die Sekundärreaktionen ab [79].**

Im Rahmen der Lipidperoxidation kommt es zu einer Bildung zahlreicher Abbauprodukte. Dies kann sowohl enzymatisch, als auch nicht enzymatisch geschehen. Dabei lassen sich Fragmentierungsprodukte, die durch eine β-Spaltung entstehen, wie Alkane, Alkene und das Aldehyd Pentanal in der Ausatemluft nachweisen [5, 79, 119].

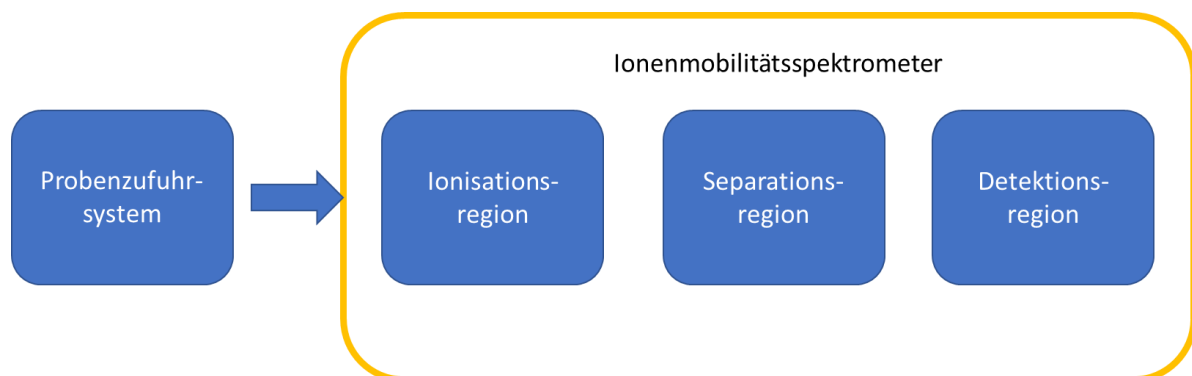
## 2.6 Atemluftanalytik mittels Ionenmobilitätsspektrometer

Die Erkenntnis, dass sich verschiedene Stoffe in der Ausatemluft nachweisen lassen, geht zurück auf das Ende des 19. Jahrhunderts. Hier gelang es erstmals, Alkohol über die Ausatemluft nachzuweisen [114].

Im frühen 20. Jahrhundert konnte der Physiker Paul Langevin das Vorhandensein verschiedener Ionen in der Atemluft nachweisen. Er schaffte es, diese mithilfe eines elektronischen Feldes zu trennen und legte damit den Grundstein der modernen Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS) [26].

Das grundlegende Prinzip ist hierbei die Bestimmung flüchtiger Verbindungen in Mischgasen mittels spezifischer Flugzeiten durch ein definiertes elektrisches Feld.

Die Auftrennung der einzelnen Analyten erfolgt in einem konstanten Gasstrom mithilfe eines externen elektrischen Feldes [87]. Hierfür wird die Probe ionisiert, direkt nachdem sie in das IMS gelangt.



**Abbildung 13** Schematischer Aufbau eines IMS: Der Ionisationsbereich, der Separationsbereich und der Detektionsbereich [26].

In der Regel wird die Ionisierung mittels eines  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Strahlers, in den meisten Fällen durch das radioaktive Nickel 63 ( $^{63}\text{Ni}$ ), durchgeführt. Dies geschieht in der Ionisationsregion. In der nachfolgenden Drift- oder Separationsregion werden die Ionen durch ihre elektrische Ladung und durch den Zusammenstoß mit anderen Molekülen aufgetrennt (vgl. Abb. 13). Es entsteht ein konstanter Driftstrom. Hierbei verhält sich die sog. Driftzeit direkt proportional zu der Mobilität und erlaubt damit eine Auftrennung der einzelnen Analyten [35].

Als letztes Bauteil des IMS fungiert der sog. Detektor. Bei diesem handelt es sich um eine Faraday-Platte. Diese Methode erlaubt nicht nur quantitative Aussagen bezüglich des jeweiligen Analyten („peak area“ ist abhängig zu Analytkonzentration), sondern ebenfalls eine qualitative Aussage (die „peak position“ ist abhängig von Ladung und Form des Analyten) [26].

Das Ionenmobilitätsspektrometer wird seit den 1970er Jahren zur Spurenanalyse angewendet. Gebräuchliche Messwerte liegen hierbei im ppb- oder ppt-Bereich (parts per billion; parts per trillion).

Das Besondere bei dieser Methode ist, dass diese auch in der Umgebungsluft mit möglichen Störfaktoren verwendet werden kann [34]. So wurde diese Technologie durch ein Forschungsteam des US-Militärs verwendet, um kontaminierte Erde zu detektieren [26, 32]. Die hier verwendeten Substanzen wie Dimethylsulfoxid oder Triethylphosphat bildeten organische Dämpfe aus und konnten trotz potenzieller atmosphärischer Schadstoffe sicher durch das IMS detektiert werden [32].

Durch die Erweiterung der Anwendungsgebiete kam es auch zu einer Erweiterung der verschiedenen Modifikationen, welche in den jeweiligen Fachdisziplinen eine genauere Auswertung der einzelnen Analyten ermöglichen. So können additive Bauteile verwendet werden, um mit erschwerten Umgebungsbedingungen wie z. B. erhöhter Luftfeuchtigkeit in volatilen Proben in der Medizin umgehen zu können [27]. Insbesondere bei komplexen Atemproben kann diese Präselektion, z. B. durch die Vorschaltung einer Multikapillarsäule, eine Überlagerung der einzelnen IMS Messwerte und eine folgende Verzerrung des Messspektrums verhindern [76, 115]. Hierbei werden die Analyten zusätzlich nach ihren physikalischen Eigenschaften aufgetrennt [8].

## 2.7 Fragestellung

Eine lungenschädliche Beatmung ist Ursache vieler Komplikationen, welche das Überleben der Patienten gefährden. Eine frühe Erkennung könnte somit maßgeblich zu einer Verbesserung der Behandlung führen.

Da es bisher keine Möglichkeit gibt, eine potenziell lungenschädigende Beatmung sicher nachzuweisen, bevor bereits Organschäden aufgetreten sind, stellte sich in der vorherigen Studie die Frage nach der Eignung des volatilen Aldehyds Pentanal zur Detektion eines Volutraumas.

Daher sollen folgende Fragen in der vorliegenden Studie beantwortet werden:

- Steigt die abgeatmete Pentanalkonzentration zuverlässig und schnell nach Beginn einer schädigenden Beatmung mit überhöhten Tidalvolumina an?
- Fällt die abgeatmete Pentanalkonzentration nach der Umstellung auf eine protektive Beatmung wieder ab?
- Korreliert die Ausatemluft- mit der Plasmakonzentration von Pentanal?
- Führen bereits kurze Phasen einer schädigenden Beatmung zu einem Anstieg von Markern für Inflammation und Apoptose?

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Versuchstiere

Mit der Genehmigung der saarländischen Tierschutzkommission (Landesamt für Gesundheit und Verbraucherschutz, Saarbrücken, Deutschland, Antragsnummer 19/2017) wurden 75 männliche Sprague-Dawley Ratten narkotisiert und mechanisch ventiliert. Die Tiere wogen jeweils zwischen 300 g und 400 g (entspricht einem Alter von 8 - 10 Wochen). Die Tiere befanden sich bis zum Versuchstag unter standardisierten Bedingungen (Lufttemperatur  $20 \pm 2$  °C, relative Luftfeuchtigkeit  $50 \pm 5$  %). Die Fütterung erfolgte mit Standardlaborfutter, Wasser wurde ad libitum bereitgestellt. Zwölf Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Tiere nüchtern gesetzt, Wasser stand weiterhin zur Verfügung.

<b>Medikamente/Substanzen</b>	
Rocuronium	Organon, Oss, Niederlande
Formaldehyd	Fischar, Saarbrücken, Deutschland
Heparin-Natrium	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Ketamin	Rotexmedica, Trittau, Deutschland
Natrium Chlorid-Lösung	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Pentanal (Valeraldehyd) Analytical Standard	SIGMA-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Propofol	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Sevofluran	AbbVie, Ludwigshafen, Deutschland
Sterofundin	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Synthetische Luft	ALPHAGAZTM 1 LUFT, AIR LIQUIDE, Ludwigshafen, Deutschland (O <sub>2</sub> 20,5 Vol-%, N <sub>2</sub> 79,5 %, CO <sub>2</sub> < 100 ppb, CO < 100 ppb, Kohlenwasserstoffe < 50 ppb, Stickoxide < 10 ppb, SO <sub>2</sub> < 5 ppb, H <sub>2</sub> S < 5 ppb, H <sub>2</sub> O < 2 ppm)

**Tabelle 1** Verwendete Substanzen mit Herstellerbezeichnung und Produktionsort



## 3.2 Präparation und Narkoseführung

Die Präparation erfolgte stets unter Spontanatmung. Zunächst wurden die Tiere in einem Behälter unter Zufluss von 5 Vol.-% Sevofluran und 1 l/min Sauerstoff in Narkose versetzt, bis sie nicht mehr auf Schmerzreize reagierten. Danach wurden sie gewogen, um eine gewichtsadaptierte Narkose zu ermöglichen. Anschließend wurden sie auf einer Wärmeplatte fixiert und Standlampen als weitere Maßnahme zum Wärmeerhalt auf den Körper gerichtet und eingeschaltet. Die Körpertemperatur wurde während der Präparation und während des Versuchs dauerhaft rektal gemessen und bei Bedarf wurde entsprechend gegengesteuert.

Der Kopf der Ratte wurde rekliniert und die Zunge seitlich aus dem Mund gezogen, um ein Zurückfallen des Zungengrunds mit dem Risiko einer Atemwegsverlegung zu verhindern. Währenddessen wurde die Narkose mittels inhalativer Maskennarkose aus 3,5 Vol.-% Sevofluran und 1 l/min Sauerstoff aufrechterhalten.

Vor Präparationsbeginn wurde mittels Zwischenzehenreflex die Narkosetiefe überprüft. Sobald das Versuchstier keine Reaktion mehr zeigte, begann die Präparation. Hierfür wurde mit einer Schere ein etwa 2 cm<sup>2</sup> großer Bereich zwischen der Mandibula und dem Manubrium sterni der Ratte freigelegt. Die linke V. jugularis wurde stumpf freipräpariert und anschließend kanüliert. Es erfolgte eine Lagekontrolle mittels Aspiration von Blut und anschließender Spülung des Katheters.

Nach erfolgter Anlage des Venenkatheters wurde die inhalative Narkose auf eine intravenöse Narkose mittels eines Propofol-Ketamin-Sterofundin-Gemischs umgestellt.

Als nächstes folgten die stumpfe Präparation und Inzision der Trachea mit anschließender Anlage einer Trachealkanüle. Die Kanülierung der rechten A. carotis erfolgte zwecks einer kontinuierlichen invasiven Blutdruckmessung sowie wiederholter Blutentnahmen.

Die Laufrate der Gesamtinfusion wurde auf 10 ml/kg/h festgelegt. Während der Präparation betrug die Laufrate des Ketamin-Propofol-Gemischs 30 mg/kg/h und wurde zu Beginn der Ventilation auf 25 mg/kg/h reduziert. Zusätzlich erfolgte die einmalige Bolusgabe von 10 mg/kg Rocuronium mit einer anschließenden kontinuierlichen Laufrate von 12,5 mg/kg/h. Nach Etablierung der intravenösen Anästhesie erfolgte die schrittweise Reduktion der inhalativen Anästhesie mit Sevofluran.

Über den gesamten Versuchszeitraum erfolgte eine kontinuierliche Reduktion des Ketamin-Propofol-Gemischs um 0,5 mg/h bis zu einer minimalen Flussrate von 15 mg/kg/h. Das Rocuronium wurde stündlich in der Laufrate um 0,25 mg reduziert bis zu einer minimalen Laufrate von 7,5 mg/kg/h.

Die rektale Temperatur wurde bei  $37,0 \pm 1$  °C gehalten. Eine Aufzeichnung der einzelnen Vitalparameter erfolgte mittels LabChart 8 PowerLab 8/35 (ADInstruments, Oxford, Großbritannien).

Am Versuchsende wurden die Tiere mit einem Bolus aus dem Propofol-, Ketamin-, Rocuronium-Perfusor getötet.

### 3.3 Studiendesign

Das Atemminutenvolumen der Tiere wurde auf  $500 \text{ ml} \cdot (\text{kgKG} \cdot \text{min})^{-1}$  festgelegt. Hierzu wurde mit 83 Atemzügen / Minute bei einem  $V_T$  von  $6 \text{ ml} \cdot \text{kgKG}^{-1}$  begonnen. Die lungenschädigende Beatmung wurde mit einem  $V_T$  von  $16 \text{ ml} \cdot \text{kgKG}^{-1}$  durchgeführt. Um auf das gleiche Atemminutenvolumen zu kommen, ergab sich eine Atemfrequenz von 31 Atemhüben/min. Kam es zu einer respiratorisch bedingten Abweichung des Blut-pH wurde die Atemfrequenz um 10 % erniedrigt (bei  $p\text{CO}_2 < 28 \text{ mmHg}$ ) oder um 10 % erhöht (bei  $p\text{CO}_2 > 45 \text{ mmHg}$ ).

Beatmungsparameter	
Atemminutenvolumen	$500 \text{ ml} \cdot (\text{kgKG} \cdot \text{min})^{-1}$
PEEP	2 cmH <sub>2</sub> O
FiO <sub>2</sub>	$0,5 \pm 0,05$

Tabelle 2 Beatmungsparameter

Es gab insgesamt fünf Versuchsgruppen mit jeweils 15 Versuchstieren. Davon wurde eine Gruppe als Kontrollgruppe (Gruppe 1) protektiv für einen Zeitraum von zehn Stunden mit einem Tidalvolumen von  $6 \text{ ml} \cdot \text{kgKG}^{-1}$  ventiliert. Die vier Interventionsgruppen (Gruppen 2 - 5) wurden nach einer Stunde protektiver Beatmung mit  $6 \text{ ml} \cdot \text{kgKG}^{-1}$  auf eine Beatmung mit einem lungenschädigendem Tidalvolumen von  $16 \text{ ml} \cdot \text{kgKG}^{-1}$  umgestellt.

Diese Tidalvolumina wurden bei den vier Interventionsgruppen über unterschiedlich lange Zeiträume aufrechterhalten (Gruppe 2 für 0,5 Std., Gruppe 3 für 1 Std., Gruppe 4 für 2 Std. und Gruppe 5 für 3 Std.). Anschließend wurden alle Interventionsgruppen erneut für sechs Stunden protektive mit einem Tidalvolumen von  $6 \text{ ml} \cdot \text{kgKG}^{-1}$  beatmet (vgl. Abb. 14).



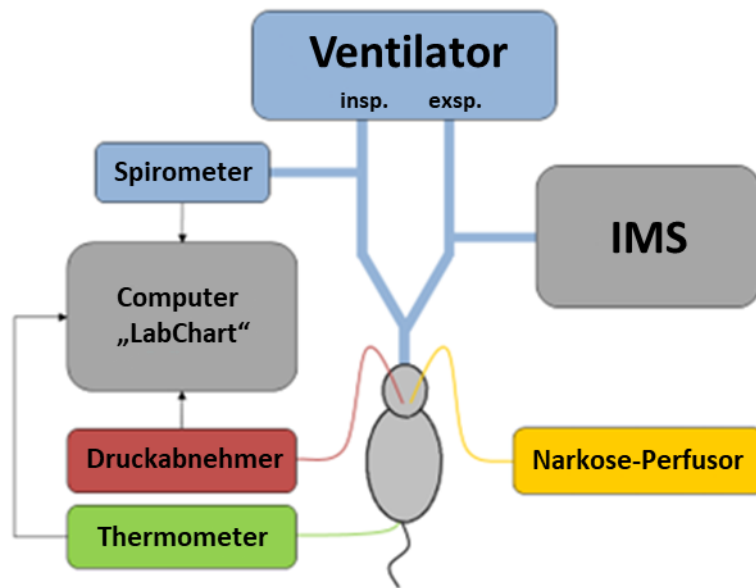


Abbildung 15 Schematischer Aufbau des Beatmungsplatzes

Die Steuerung der MCC-IMS-Geräte erfolgte mittels der Software VoCan 3.7 (B&B Analytik Dortmund, Deutschland). Die Pentanalintensitäten wurden mittels Visual Now 3.6 (B&B Analytik Dortmund, Deutschland) quantifiziert. Die Kalibrierung erfolgte im Bereich 0,5 – 50 ppb (vgl. 3.5.1 Kalibrierung Pentanal). Die inspiratorischen Gasproben wurden mittels Kohlefilter aufbereitet und durch interne Perfluoralkoxyalkan-Schläuche geleitet, um eventuelle Rückstände und Verschmutzungen innerhalb des Beatmungs- und Probenentnahmesystems zu minimieren. Zusätzlich wurde vor jedem neuen Versuch ein Nullabgleich durchgeführt. Dieser bestand aus einer einmaligen Raumluftmessung gefolgt von wiederholten Ventilatormessungen bis Beatmungsbeginn zur Detektion systembedingter Artefakte.

### 3.4.2 Blutproben

Während der Versuche wurde zu definierten Zeitpunkten Blut entnommen. Hierbei wurde die Blutentnahme zur Kontrolle der Blutgase (BGA) und des Pentanals unterschieden. Diese unterschieden sich sowohl in der Menge des abgenommenen Bluts als auch in den jeweiligen Zeitpunkten.

Vor jeder Blutentnahme wurden 0,2 ml Blut entnommen und nach Abnahme der eigentlichen Blutprobe wieder zurückgeführt, um eine Verfälschung durch Flüssigkeitsrückstände im Abnahmeschlauch zu verhindern.

Entnahmezeitpunkte	T0	T1	T2	T3
Parameter (600 µl)	keine	Pentanal	keine	Pentanal/Leukozyten
BGA (150 µl)	X	keine	X	X

**Tabelle 3 Blutentnahmezeitpunkte**

Die Pentanal-Plasmakonzentrationen wurden mittels Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie bestimmt (vgl. Kapitel 3.6).

### 3.4.3 Bronchoalveoläre Lavage

Nach dem Exitus wurden sieben Tiere pro Gruppe einer Bronchoalveolären Lavage (BAL) unterzogen. Diese diente der Bestimmung der Konzentrationen von IL-6, TNF-alpha und Leukozyten im Pulmonaltrakt. Hierzu wurde eine Spritze an der Trachealkanüle angesetzt und dreimal 10 ml phosphatgepufferte Kochsalzlösung in den Respirationstrakt der Ratte injiziert und erneut aspiriert. Die Menge des Überstandes wurde dokumentiert und die BAL wurde bei 3000 Umdrehungen/min für zehn Minuten bei 4 °C zentrifugiert.

Aus dem Überstand wurden nun zweimal 2 ml Flüssigkeit entnommen und bei -75 °C eingefroren und später für die Messung von IL-6 und Albumin verwendet. Die Messung erfolgte jeweils mittels ELISA nach der beiliegenden Verfahrensweisung.

### 3.4.4 Gewebeentnahme und Histologie

Bei der anderen Hälfte der Versuchstiere wurde eine histologische und molekularchemische Untersuchung des Gewebes vorgenommen. Dieses wurde nach einem standardisierten Schema entnommen, um eine möglichst gute Vergleichbarkeit zu erzielen. Hierbei wurde der Brustkorb entlang der Trachea eröffnet und Lunge sowie Herz mobilisiert und in einem Komplex entfernt.

Von der Lunge wurde der rechte Mittellappen in 4%igem Formalin (Fischer GmbH&Co. KG, Saarbrücken, Deutschland) eingebettet und mittels Hämatoxylin und Eosin eingefärbt. Die Schnittbilder wurden bei 200-facher Vergrößerung hinsichtlich mikroskopischer Schäden untersucht.

Die linke Lunge wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -75 °C gelagert. Dies diente der Procaspase 3- und Caspase 3-Messung mittels Western Blot Technik.

### 3.5 MCC-IMS Aufbau und Funktion

Die Probengewinnung in der Ausatemluft mittels Ionenmobilitätsspektrometrie bildete das Kernstück der vorliegenden Untersuchung. Die Hauptkomponenten sind die Ionisationskammer, die Driftröhre und die Faraday-Platte als Detektor (vgl. Abb. 16).

Mithilfe eines Trägergases, hier synthetische Luft (ALPHAGAZTM 1 LUFT, AIR LIQUIDE, Ludwigshafen, Deutschland), wurden die zu untersuchenden Analyten durch das Einlasssystem in die Ionisationskammer eingebracht. Dort wurden die Analyten mittels einer Strahlenquelle, im Rahmen dieses Versuchs mittels  $^{63}\text{Ni}$  (Bioscout 2011, 550 MBq, B&S Analytik, Dortmund, Deutschland), indirekt ionisiert. Das bedeutet, dass zunächst die Moleküle des Trägergases ionisiert werden, welche dann wiederum die eigentlichen Metabolite ionisieren.

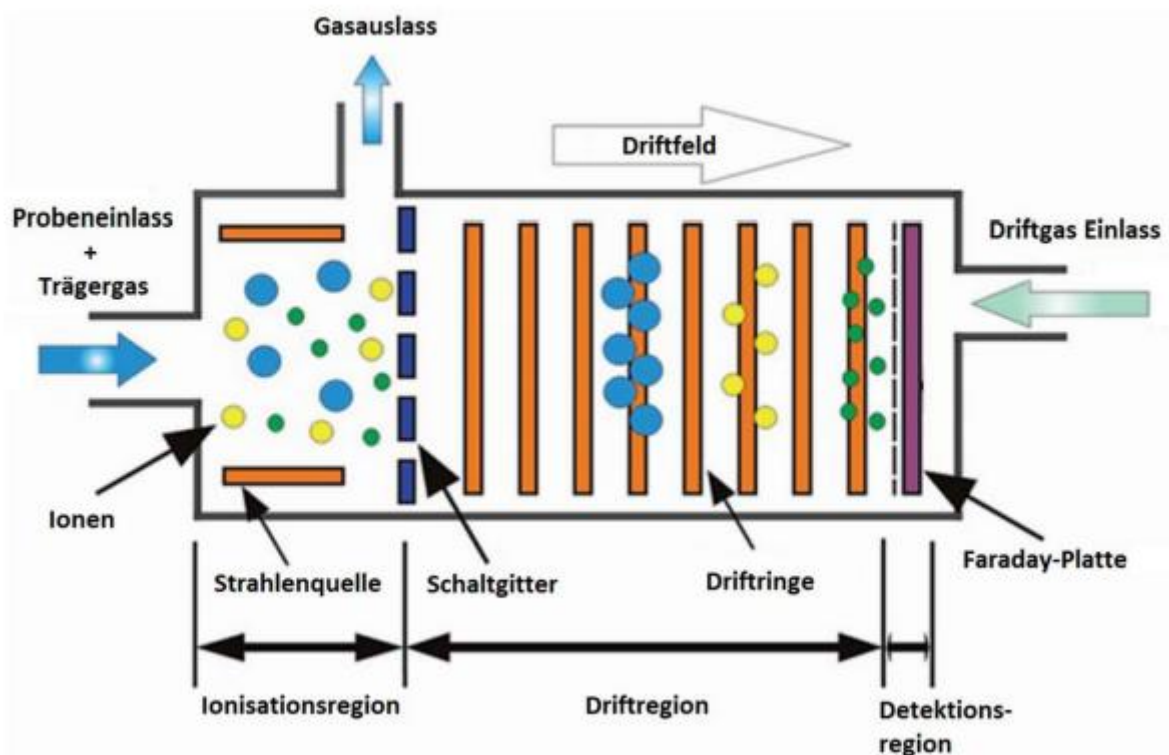


Abbildung 16 Schematischer Aufbau eines Ionenmobilitätsspektrometers. Dargestellt sind die einzelnen Komponenten, Regionen und Flussrichtungen; modifiziert nach [26, 27].

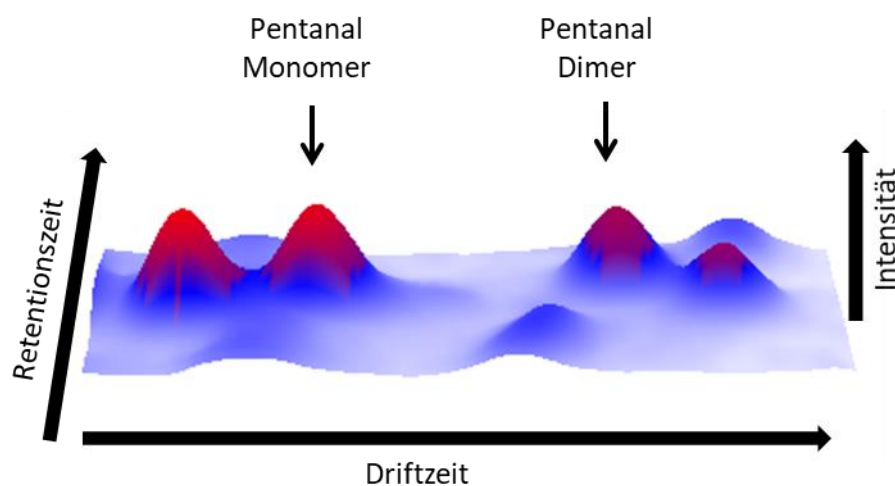
Bei steigender Konzentration eines bestimmten Analyten, in diesem Fall von Pentanal, werden nicht nur Monomere, sondern ebenso Dimere gebildet. Dies geschieht durch die Bindung zweier Analyten an ein Proton. Dies hat Auswirkungen auf die Berechnung der Gesamtintensitäten des Pentanals (vgl. unten).

Die ionisierten Analytionen passieren anschließend ein sog. Querfeld (Schaltgitter). Dies ist ein aus zwei Einzelgittern bestehendes Gebilde aus Drähten, welches ein elektrisches Feld quer zum elektrischen Feld der Driftkammer aufbaut. Solange dieses Feld aktiv ist, wird ein Molekülübergang in die Driftkammer verhindert.

Eine Reduktion dieses Querfeldes bewirkt einen Einstrom der Ionen in die Driftkammer. Die Driftringe erzeugen innerhalb der Driftkammer ein elektrisches Feld. Unter diesem Einfluss strömt den Ionen ein Driftgas entgegen, mit dessen Molekülen sie zusammenstoßen. So entstehen die ionenspezifischen Driftzeiten. Am Ende der Kammer fungiert eine Faraday-Platte als Detektor, wo die auftreffenden Ionen ein elektrisches Signal erzeugen. Dieses Signal fungiert als Messwert.

Die Intensität wird gegenüber der Driftzeit aufgetragen und bildet so das IMS-Spektrum. Hierbei wird die Gesamtintensität des Pentanals unter Berücksichtigung der Dimer-Bildung wie folgt berechnet:

$$\text{Gesamtintensität [V]} = \text{Intensität Pentanal-Monomer [V]} + 2 * \text{Intensität Pentanal-Dimer [V]}$$



**Abbildung 17** Intensitätsmessung mittels IMS. Die dargestellten PEAKS entsprechen dem Pentanal-Monomer bzw. -Dimer. Die charakteristische Position wird durch die Retentions-, die Driftzeit und durch die Intensität festgelegt.

Besonders bei sehr komplexen Atemproben mit ähnlichen Driftzeiten kann es zu einer Überlagerung der IMS-Signale kommen. Im Rahmen der Atemluftanalytik trägt die hohe Luftfeuchtigkeit zu einer Verfälschung bzw. Verzerrung der Messwerte bei [76, 115].

Um dies zu verhindern, wurde dem IMS eine Multikapillarsäule (multi capillary column = MCC) vorgeschaltet. Diese stammte von der Firma Multichrom (aus Moskau und Novosibirsk) und besteht aus ca. 1000 Einzelkapillaren mit einem Durchmesser von jeweils 43 µm. Mithilfe dieser Säule ist eine Vorauftrennung nach physikalischen Eigenschaften der Analyten möglich [8]. Die Funktionsweise

ähnelt dabei der der Gaschromatographie. Jedoch erlauben Multikapillarsäulen eine höhere und damit für die IMS-Technologie gebräuchlichere Flussrate [8].

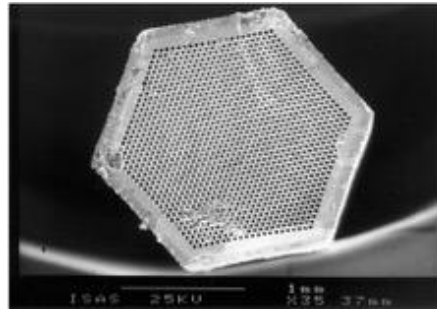


Abbildung 18 Querschnitt durch eine Multikapillarsäule [8]

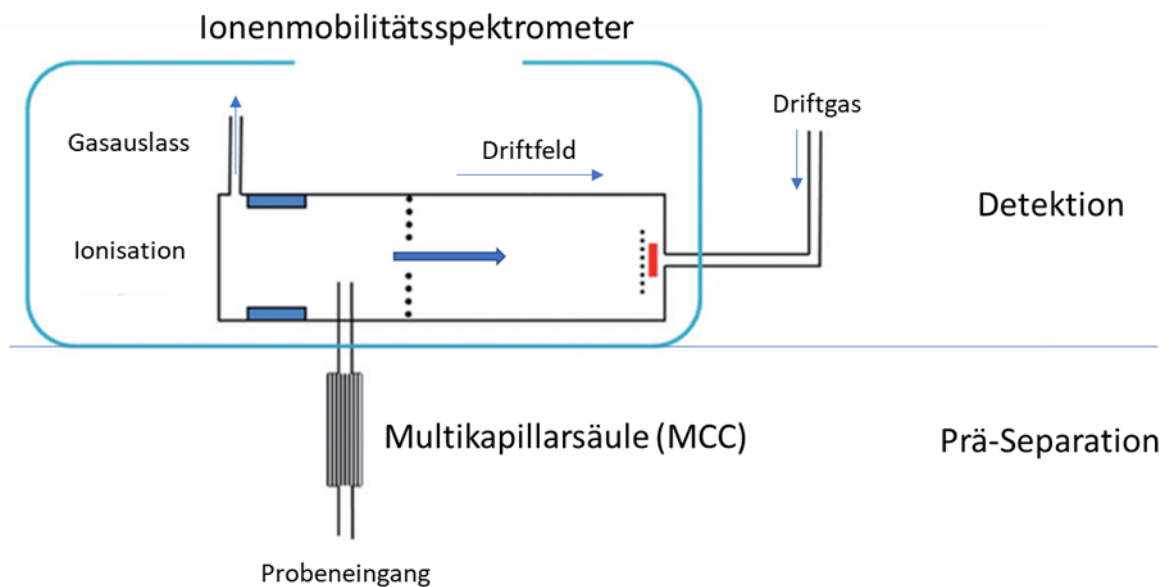


Abbildung 19 Schematische Darstellung eines kombinierten MCC-IMS. Die Multikapillarsäule erlaubt bereits eine vorgeschaltete Auftrennung von Mischgasen und erlaubt so eine präzisierete Auswertung, modifiziert nach [27].

Die verwendete MCC enthält zusätzlich eine sog. stationäre Phase. Diese beschreibt einen leicht polaren Film im Lumen, welcher mit den Analyten des Atemgemischs interagiert. Dies führt zu analytspezifischen Retentionszeiten. Auch sorgt die MCC für ein kontinuierliches Reservoir an Wassermolekülen, die über den gesamten Analysezeitraum nach und nach abgegeben werden. Eine Verzerrung der PEAK-Positionen wurde so minimiert.

Für die Auswertung der Daten wurde zunächst eine sog. Grundlinienkorrektur zur Reduktion von Artefakten durchgeführt. Die Betriebsdaten des Ionenmobilitätsspektrometers und der Multikapillarsäule sind in den Tabellen 4 und 5 dargestellt.



<b>Betriebsparameter des IMS "Breath Discovery"</b>	
Ionisationsquelle	β-Strahler ( <sup>63</sup> Ni, 550 MBq)
Elektrische Feldstärke	300 V/cm
Driftstrecke	12 cm
Durchmesser der Driftkammer	15 mm
Öffnungszeit des Schaltgitters	5000 ms
Trägergasfluss Multikapillarsäule	150 ml/min
Driftgasfluss	100 ml/min
Betriebstemperatur	40 °C
Druck	Umgebungsdruck (ca. 1 bar)
Probenschleifenvolumen	10 ml
Probenfluss	50 ml/min
Messdauer	750 Sekunden
Driftgas	Synthetische Luft (Zusammensetzung s. unten)

**Tabelle 4 Betriebsparameter IMS**

<b>Betriebsparameter der MCC-OV5</b>	
Temperatur	40 °C (bis 250 °C möglich)
Trägergasfluss	150 ml/min
Säulenlänge	Bis 100 cm
Kapillaranzahl	Ca. 1000
Innendurchmesser (Kapillaren)	43 µm
Polarität	Unpolar / polar
Filmdicke	200 nm

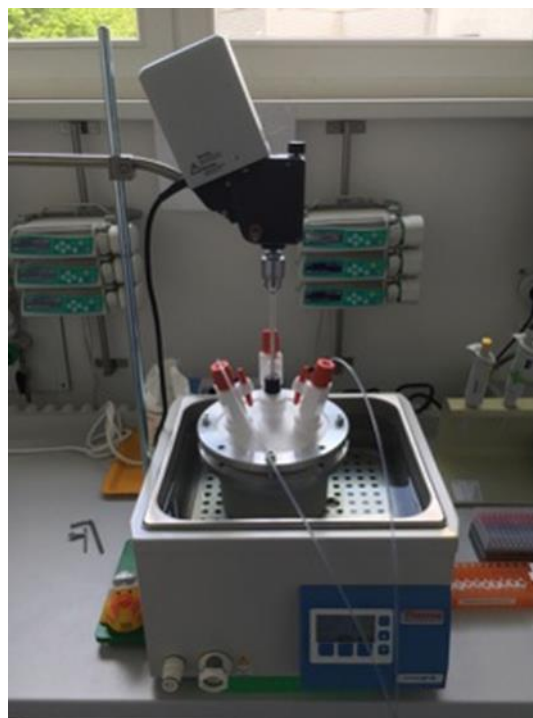
**Tabelle 5 Betriebsparameter Multikapillarsäule**

### 3.5.1 Kalibration

Um die gemessene Spannung in einen quantitativen Pentanalwert umzuwandeln, war eine Kalibration des jeweiligen Messgeräts zu der gesuchten Substanz notwendig [8, 105].

Dafür wurde Pentanal (Valeraldehyd) als Reinsubstanz verwendet und mit hochreinem (> 99 %) Hexan verdünnt. Ziel der Prozedur war es, eine Lösung mit definierter Pentanalmenge zu erhalten, welche dann durch das IMS gemessen wurde. Dies ermöglichte eine Umrechnung der gemessenen Spannung [Volt] in die definitive Konzentration [ppbv] (parts per billion pro Volumeneinheit).

Die Kalibration wurde mithilfe eines Perfluoralkoxy-Gefäßes durchgeführt (PFA-Gefäß) welches in einem auf 37 °C temperierten Wasserbad stand. Dies diente einer möglichst großen Annäherung an den eigentlichen Versuchsaufbau mit einer Körpertemperatur der Ratten von ca. 37 °C. In diesem PFA-Gefäß befand sich ein Rührer, welcher eine homogene Verteilung des entstehenden Gasgemisches sicherstellen sollte (vgl. Abb. 20).



**Abbildung 20 PFA-Gefäß im Wasserbad zur Pentanalkalibration**

Für die Kalibration wurde eine Stammlösung angesetzt, welche eine definierte Konzentration im ppb-Bereich im PFA-Gefäß erzeugt. Für die Stammlösung wählten wir eine Startkonzentration von 50 ppbv (vgl. Abb. 21).

## Kalibration 2.6782 | Behälter

Untersuchter Stoff:	Pentanal	Molare Masse:	86,13 g/mol
Volumen:	1 µl	Stoffmenge:	9,2163E-06 mol
Konzentration:	98 %	Volumen:	0,234555628 mL
Dichte:	810 µg/µl		
Menge:	793,8 µg		
Flaschen Volumen:	2678,2 ml		für 37°C = 310,15 K
Startkonzentration:	87579,58 ppb (v/v)		

Verdünnen mit 87,57857888 ml Lösungsmittel, damit 1 µl = 1 ppb(v/v)

### Weitere Verdünungen

Hexan (ml)	Pentanal (µl)
87,55957888	20 damit 1 µl = 20 ppb(v/v)
87,52957888	50 damit 1 µl = 50 ppb(v/v)
87,47957888	100 damit 1 µl = 100 ppb(v/v)

Abbildung 21 Ansatz der Kalibrationsflüssigkeit

Um das Mischverhältnis der Pentanal-Reinsubstanz und des Hexans zu berechnen, wurde die Konzentration berechnet, welche nach Einbringen eines µl Reinsubstanz Pentanal erzeugt werden würde.

Hierzu wurden zunächst die molare Masse (M), die Masse (m), sowie die Stoffmenge (n) benötigt.

Die Masse m berechnet sich durch die Dichte des Pentanals ( $\rho = 810 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) und die Konzentration in der Reinsubstanz ( $c = 0,98$ ).

$$m = \rho * c$$

Hieraus errechnet sich eine Masse von  $m = 793,8 \mu\text{g}$  pro µl Pentanal-Reinsubstanz.

Die molare Masse M ist mit 86,12 g/mol angegeben. Es gilt:

$$M = \frac{m}{n} \Leftrightarrow n = \frac{m}{M}$$

Hieraus errechnet sich:

$$n = \frac{793,8 \mu\text{g}}{86,12 \text{ g/mol}} = 9,2163 \times 10^{-6} \text{ mol}$$

Es befanden sich also  $9,2163 \times 10^{-6}$  mol Teilchen in einem  $\mu\text{l}$  Pentanal. Um nun herauszufinden, welches Volumen (V) von diesem  $\mu\text{l}$  Pentanal in Gasform eingenommen wurde, benötigen wir die ideale Gasgleichung:

$$V = \frac{nRT}{p}$$

V ist hierbei das Volumen in  $\text{m}^3$ , n bezeichnet die Stoffmenge in mol, R ist die allgemeine Gaskonstante  $R = 8,3144598 \frac{\text{J}}{\text{kg} \times \text{K}}$ , T die Temperatur in Kelvin (310,15 K) und p der Druck in Pa, welcher dem Atmosphärendruck (101325 Pa) entspricht.

Eingesetzt in die obige Formel ergibt sich:

$$V = \left( \frac{9,2163 \times 10^{-6} \text{ mol} \times 8,3144598 \frac{\text{J}}{\text{kg} \times \text{K}} \times 310,15 \text{ K}}{101325 \text{ Pa}} \right) \times 10^6 = 0,234555628 \text{ ml}$$

Dieses Volumen wurde nun mit dem Flaschenvolumen ins Verhältnis gesetzt und da wir die ppb-Konzentration suchten (parts per billion = Teilchen pro Milliarden) mit  $10^{-9}$  multipliziert. Dies ergab eine Konzentration von 87579,58 ppbv.

Als letzter Schritt erfolgte die Berechnung der Hexanmenge, durch welche wir pro  $\mu\text{l}$  Stammlösung eine Konzentration von 50 ppbv im Kalibrationsgefäß erhalten. Diese belief sich auf 87,52957888 ml Hexan pro 1  $\mu\text{l}$  Pentanal.

Ausgehend von dieser Stammlösung mit 50 ppbv Pentanal wurde eine geometrische Verdünnungsreihe gestartet. Diese halbierte pro Schritt die Konzentration der ursprünglichen Lösung (vgl. Abb. 22). Diese Verdünnungsreihe wurde fortgeführt bis zu einer Konzentration von 0,09765625 ppbv (vgl. Tab. 6).

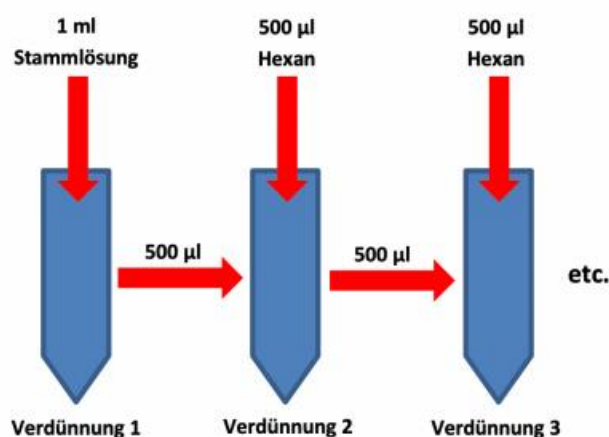


Abbildung 22 Schematische Darstellung einer geometrischen Verdünnungsreihe

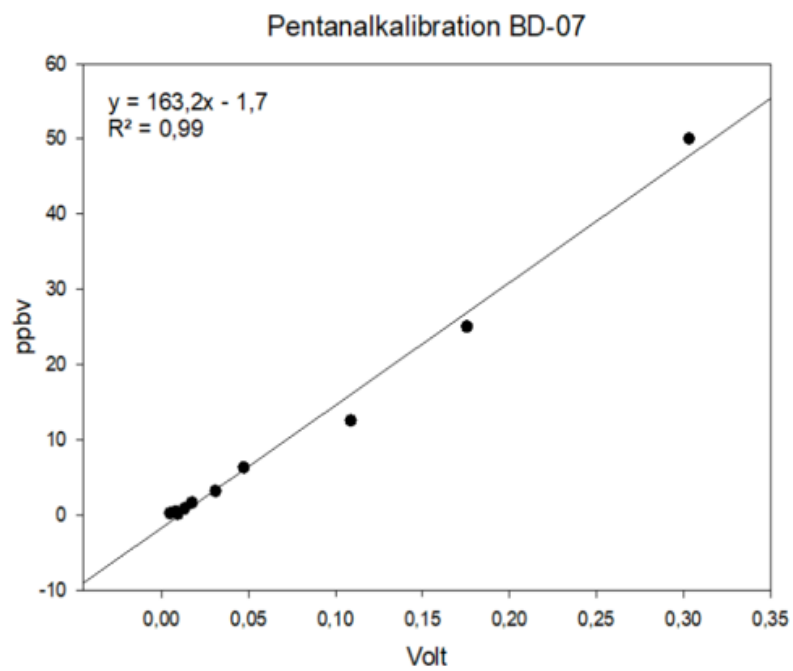
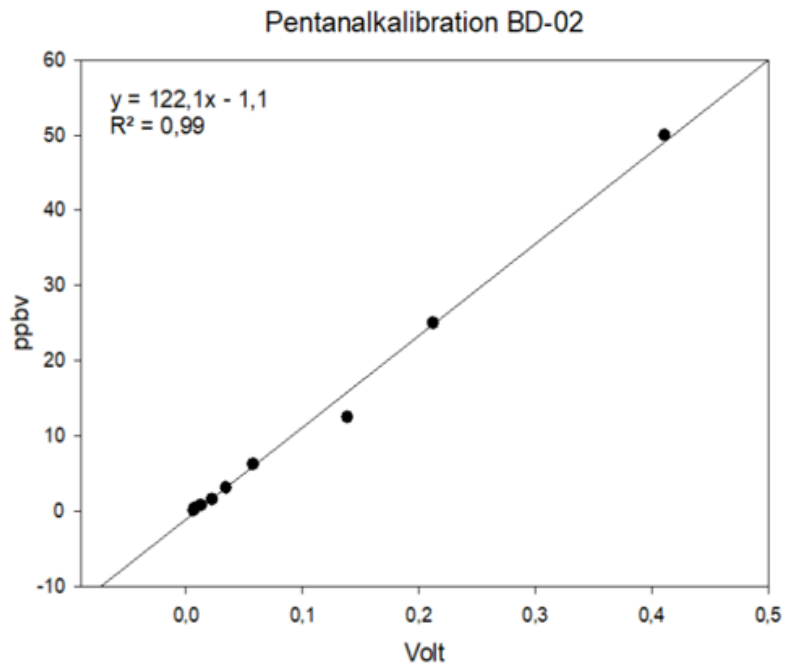
Verdünnungsnummer	ppbv
1	50
2	25
3	12,5
4	6,25
5	3,125
6	1,5625
7	0,78125
8	0,390625
9	0,1953125
10	0,09765625

**Tabelle 6 Verdünnungsreihe der Pentanalkalibration**

Vor jeder Kalibrationsmessung wurde das PFA-Gefäß zehn Minuten lang mit gefiltertem Stickstoff und anschließend für weitere zwei Minuten mit hochreiner synthetischer Luft gespült. Nach jeder Spülung erfolgte eine Leermessung, um eventuelle Rückstände zu detektieren.

Hierauf erfolgte die Probenmessung. Dafür wurde 1 µl der jeweiligen Verdünnung in das PFA-Gefäß pipettiert (die Pipettenspitze wurde dabei mit abgeworfen), der Deckel umgehend geschlossen und für zwei Minuten durch den Rührer homogen verteilt. Nach den jeweiligen Messungen wurden je nach eingebrachter Konzentration ein bis zwei Reinigungsfrequenzen laufen gelassen.

Die Messungen durch das MCC-IMS (in Volt) wurden mit den berechneten Pentanalkonzentrationen (in ppbv) grafisch aufgetragen. Es entstanden Kalibrationskurven mit einem  $R^2$  von 0,99 (vgl. Abb. 23).



**Abbildung 23 Kalibrationskurven Pentanal für die verwendeten MCC-IMS**

Die IMS-Parameter unterschieden sich von denen der Tierversuche hinsichtlich der Messdauer und der Probenentnahmedauer (vgl. Tabelle 7).

<b>Messeinstellungen des MCC-IMS für die Kalibration</b>	
IMS-Gerät	Breath-Discovery
Sampling Dauer	10 s
Analysedauer	60 s
Betriebstemperatur	40 °C
Druck	Umgebungsdruck
Driftgasfluss	100 ml/min

**Tabelle 7** Messeinstellungen des IMS für die Kalibrationsmessungen

### 3.6 HPLC

In den 1960er Jahren fand eine neue Trenntechnik vermehrt Anwendung, die sog. Hochdruckflüssigkeitschromatographie (engl. High Pressure Liquid Chromatography = HPLC). Im Verlauf der nächsten Jahre erfolgte eine Umbenennung zu der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (engl. High Performance Liquid Chromatography = HPLC). Diese Umbenennung erfolgte durch eine Verbesserung der Materialien und der Geräte, was zu einer verbesserten Leistung führte.

Eine HPLC besteht aus mindestens fünf Einzelkomponenten: Pumpe, Injektor, Säule, Detektor und Schreiber bzw. Rechner (vgl. Abb. 24).

Im vorliegenden Versuch verwendeten wir eine Pumpe der Marke Agilent 1260 Infinity (Waldbronn, Deutschland). Hierbei handelt es sich um eine Doppelkolbenpumpe. Diese zeichnet sich dadurch aus, dass durch einen der Kolben das Eluent (Laufmittel) ansaugt wird, während der andere Kolben das angesaugte Laufmittel durch das Auslassventil in die HPLC-Anlage drückt. Durch dieses Verfahren kann eine konstante Laufrate erzeugt werden [64].

Das Funktionsprinzip einer HPLC basiert auf einer Trennung der Probe durch das Lösen des Gasmischs in einer flüssigen Phase (dem sog. Eluent) und dem anschließenden Durchlaufen einer Säule, wo eine Auftrennung nach verschiedenen Parametern erfolgt. Hierbei wird die Probe mittels Autoinjektion dem Eluent zugeführt. Dies geschieht im Injektor (vgl. Abb. 24).

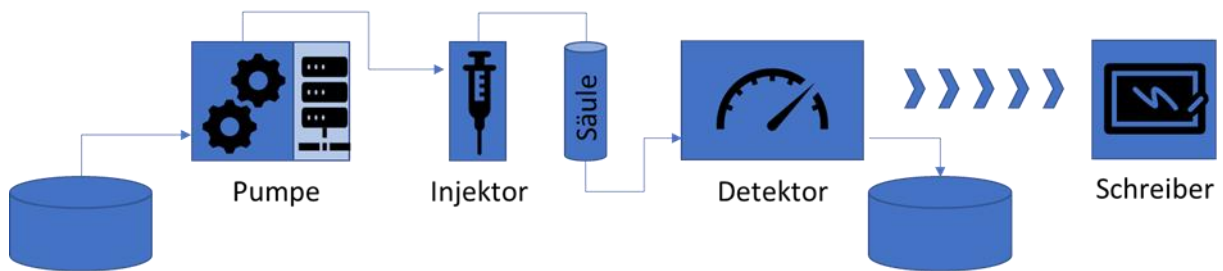


Abbildung 24 Schematische Darstellung der Einzelkomponenten einer HPLC: Pumpe, Injektor, Säule, Detektor und Rechner/Schreiber (angelehnt an [64]).

Der mobilen Phase steht die sog. stationäre Phase entgegen. Diese befindet sich in der Säule der HPLC (vgl. Abb. 25). Bei dieser handelt es sich um Kieselgel, welches an der Oberfläche bestimmte chemische Gruppen gebunden hat. Diese sog. Borsten interagieren mit den unterschiedlichen Komponenten der mobilen Phase. Diese Interaktionen beruhen auf verschiedenen Prinzipien, vorrangig dabei sind die Wirkungen der Van-der-Waals-Kräfte und der Wasserstoffbrückenbindungen [64].

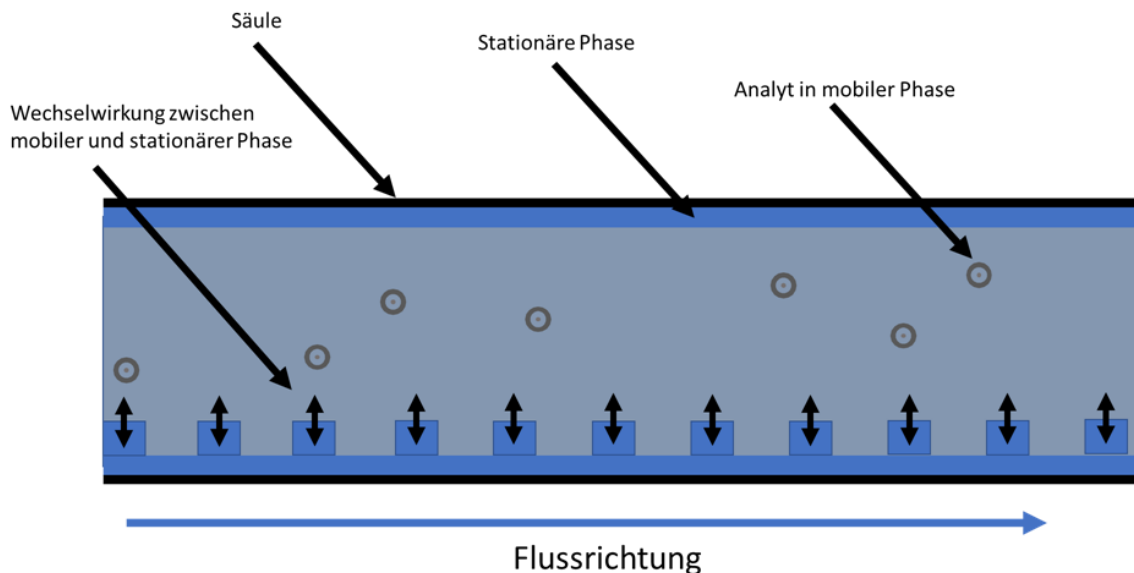


Abbildung 25 Schematischer Aufbau einer Säule der HPLC. Erkennbar sind die stationäre Phase mit den sog. „Borsten“ und die mobile Phase mit den Analyten.

Hierdurch lässt sich im günstigsten Fall eine komplette Auftrennung aller Komponenten erreichen.



Das aufgetrennte Gemisch bzw. dessen Komponenten werden anschließend vom Detektor erfasst. Aus diesen Informationen generiert die Auswerteeinheit ein Chromatogramm. Hierbei ist die Fläche unterhalb des jeweiligen PEAKs gleichzeitig die Menge der vorhandenen Komponente. Die Anzahl der PEAKs entspricht dabei der Anzahl der aufgetrennten Komponenten.

Eine Veränderung des Spektrums lässt sich durch verschiedene Modifikationen herbeiführen. Hierzu gehört der Austausch der einzelnen Bauteile, insbesondere der Säule bzw. der darin enthaltenen stationären Phase, des Eluents oder der Temperatur.

Die verwendeten Substanzen sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Substanzen	
Pentanal-2,4-Dinitrophenylhydrazin (> 95 %)	Sigma Aldrich (München, Deutschland)
2,4-Dinitrophenylhydrazin (> 95 %)	Sigma Aldrich (München, Deutschland)
Perchlorsäure (> 95 %)	Sigma Aldrich (München, Deutschland)
Acetonitril	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Wasser	VWR (Darmstadt, Deutschland)
n-Hexan	VWR (Darmstadt, Deutschland)

**Tabelle 8** Verwendete Substanzen bei der HPLC

Das 2,4-Dinitrophenylhydrazin wurde als 10 mM Lösung in 35%iger Perchlorsäure angesetzt.

Für die Probenanalyse wurden 200 µl Blutplasma mit 200 µl 10 mM 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung angesetzt und für 10 Minuten inkubiert. Die flüssige Phase wurde zweimalig mit jeweils 1 ml Hexan für 5 Minuten vermengt. Die organischen Extrakte wurden zusammengefügt, mittels einer Trockenzentrifuge getrocknet und anschließend bei -20 °C eingefroren.

Die Messungen wurden mit einem Agilent (Santa Clara, CA) 1260 Infinity Liquid Chromatographie-System durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte mittels einer EC 150/3 Nucleodur PolarTec (150x3 mm, 3 µm) Säule. Die mobile Phase bestand aus Wasser (A) und Acetonitril (B). Der Gradient des Verhältnisses von Wasser zu Acetonitril (A:B) wurde in Abhängigkeit von der Zeit wie folgt zugeteilt:

0 min (55:45) → 10 min (55:45) → 20 min (10:90) → 30 min (10:90) → 31 min (55:45) → 36 min (55:45).

Die Flussrate betrug 0,5 ml/min. Die Trennungstemperatur wurde auf 65 °C und die Detektionswellenlänge auf 360 nm eingestellt. Das Injektionsvolumen der einzelnen Proben betrug 40 µl.

Die Kalibrationskurve wurde mit Standardlösungen in den Konzentrationen für 0,31, 0,155, 0,077, 0,038, 0,019 µg/ml Pentanal-2,4-Dinitrophenylhydrazin angesetzt und folgte einer linearen Regression (vergleiche Tab. 9).

Konzentration (µg/ml)	Herstellung
0,31	30 µl Stammlösung von Sigma Aldrich 500 µl mobile Phase
0,155	250 µl Probe 1 in 250 µl mobile Phase
0,077	250 µl Probe 2 in 250 µl mobile Phase
0,038	250 µl Probe 3 in 250 µl mobile Phase
0,019	250 µl Probe 4 in 250 µl mobile Phase

**Tabelle 9 Kalibrationskonzentrationen der Plasmapentanal-messung**

### 3.7 ELISA IL-6 und TNF-alpha

Das Interleukin-6 (IL-6) und der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-α) sind Zytokine, welche bei Entzündungsreaktionen im Gewebe, zum Beispiel im Rahmen eines Biotraumas, entstehen (vgl. Kapitel 2.4.5).

Um diese Signalstoffe zu bestimmen wurden sog. ELISAs verwendet. Die Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) dienen dem Nachweis eines Antigens. Dies geschieht mittels einer Antigen-Antikörper-Reaktion (vgl. Abb. 26).

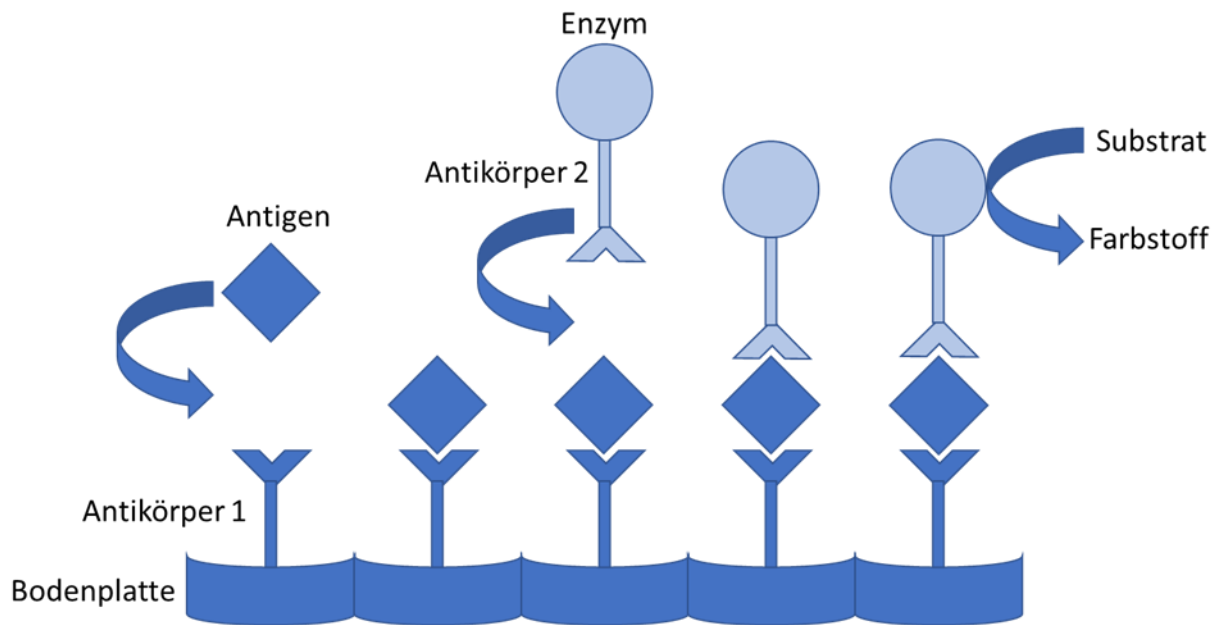


Abbildung 26 Funktionsweise eines ELISA

Hierbei wurde eine Serumprobe aufbereitet und auf eine Bodenplatte mit vorhandenen Antikörpern für das gesuchte Antigen aufgebracht. Anschließend wurde ein Enzym-gekoppelter Antikörper dazu gegeben. Durch Hinzugabe eines Substrats wurde durch jenes Enzym eine Farbreaktion ausgelöst, welche bei einer bestimmten Wellenlänge (hier 450 nm) detektiert werden konnte.

Um die beiden Zytokine TNF- $\alpha$  und Interleukin-6 (IL-6) zu quantifizieren, wurden zwei separate ELISAs gewählt. Die ELISA-Kits für IL-6 (Cat. No. 550319) und TNF- $\alpha$  (Cat. No. 558535) stammten hierbei von der Firma BD OptEIA. Diese wurden nach der beigefügten Verfahrensanweisung aufbereitet und mittels TECAN Infinite M200 Pro ausgewertet.

### 3.8 Leukozytenzählung

Die Leukozytenzählung erfolgte sowohl im Vollblut als auch in der Bronchoalveolären Lavage (BAL). Bei der finalen Blutentnahme zum Zeitpunkt T3 wurden 100  $\mu$ l Vollblut auf 0 °C heruntergekühlt und am Folgetag ausgewertet.

Zur Auswertung der Leukozytenzahl in der BAL wurde diese zentrifugiert und die Flüssigkeit abpipettiert. Die übrigen Festbestandteile, das sog. Pellet wurde anschließend mit 100  $\mu$ l phosphatgepufferter Kochsalzlösung resuspendiert.

Für die Zählung wurden 10 µl des Vollbluts bzw. der BAL mit 190 µl 3%iger Essigsäure vermischt. Anschließend wurden nach 2-minütiger Wartezeit 10 µl des jeweiligen Gemisches bei 10-facher Vergrößerung in vier Eckquadraten einer Zählkammer nach Neubauer ausgezählt (N = gezählte Leukozyten).

Eine Hochrechnung erfolgte mit der Formel:  $N \cdot 50 \hat{=} \text{Leukozyten}/\mu\text{l}$

### 3.9 Western Blot

Der Western Blot ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen mit Hilfe einer Gelelektrophorese. Durch eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion verhilft er, eine qualitative oder semiquantitative Aussage bezüglich des Vorhandenseins spezifischer Proteine zu treffen [48].

Die Anfertigung der Western Blots erfolgte nach einem Labor-internen Standard, welcher durch die Kollegen Bauer et al. etabliert wurde [7].

Um dieses Verfahren auf die Erstellung eines Western Blots zur Messung der Caspase 3 im Lungengewebe anzuwenden, wurde die Methodik modifiziert. Es wurden 100 bis 150 mg Lungengewebe in 10 ml Lysepuffer homogenisiert (Ultra Turrax T25, Janke & Kunkel). Der Lysepuffer bestand aus 10 mmol/l TRIS (pH 7,5), 10 mmol/l NaCl, 0,1 mmol/l Ethylendiamintetraessigsäure, 0,5 % Triton X-100, 0,02 % Natriumazid und 2 mmol/l Phenylmethylsulfonylfluorid. Im Anschluss folgte die Klärung des Homogenisats in einer Zentrifuge bei 18.000 g. Die gelöste Proteinkonzentration wurde in dem Verfahren nach Bradford ermittelt [16]. Hierfür wurde Roti-Quant (Karlsruhe, Deutschland) mit einem Albuminstandard aus Rinderserum verwendet. Die Aliquots wurden mit 100 µg pro Probe mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und einem Laemmli-Puffersystem in einem 12%igem TRIS-Glycin-Gel frakturiert [54]. Die Gele wurden mit dem Caspase 3-Standard (Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main, Deutschland) auf Polyvinylidendifluorid-Membranen (Westran, Schleicher&Schuell, Dassel, Deutschland) übertragen, auf 4 °C heruntergekühlt und bis zum Antigennachweis mindestens über Nacht bis maximal 48 Stunden gelagert. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren und somit verfälschten Testergebnissen vorzubeugen, wurde eine Vorinkubation mit 5%iger Trockenmilch (Magermilchpulver von Saliter, Deutschland) in 12%iger TRIS gepufferter Kochsalzlösung/Tween (20 mmol/l TRIS [pH 7,5], 0,5 mol/l NaCl, 0,1 % Tween 20) durchgeführt. Anschließend folgte die eigentliche Inkubation mit spezifischen Antikörpern gegen Caspase 3 (Verdünnung 1:1000, Kaninchen-Ak, 8G10, Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main, Deutschland). Nicht gebundene primäre Antikörper wurden in mehrmaligen Waschvorgängen mit der TRIS-gepufferten Kochsalzlösung/Tween entfernt. Ein mit Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase = HRP) gekoppeltes Anti-Kaninchen-IgG (Verdünnung 1:3000, A6154; Sigma-Aldrich,

Darmstadt, Deutschland) diene als sekundärer Antikörper. Während der gesamten Durchführung waren die Proben und Lösungen durchgehend bei niedriger Temperatur gelagert, um eine mögliche Proteasen-Aktivität so gering wie möglich zu halten. Der Inkubationsvorgang erfolgte bei Raumtemperatur. Nach erneuten Waschvorgängen wurden die Antigen-Antikörper-Konjugate durch eine Chemilumineszenz-Reaktion (ECL Western Blot Analysis System, Amersham Buchler, Braunschweig, Deutschland) nachgewiesen. Die Durchführung erfolgte nach den Verfahrensanweisungen des Herstellers. Die Erfassung der Signale erfolgte mit Hilfe des Chemiluminescence-Imaging-System 4.2 (Biostep, Jahnsdorf, Deutschland), die Auswertung mittels Densitometer und der Software totalLab quant (v11). Das Hintergrundrauschen wurde durch einen „Rolling-Ball“-Algorithmus reduziert. Eine Normalisierung der einzelnen Intensitäten wurde erreicht, indem jede Probe gegen ein Gel-spezifisches Marker-/Kontrollprotein und gegen die entsprechende Bande auf dem Gel (Coomassie-Blau-Färbung) gerechnet wurde.

Zusätzlich wurde zur Auswertung der Proben der Quotient aus Procaspase 3 und der geschnittenen Caspase 3 gebildet. Dieser Quotient, der apoptotische Index, diene dazu, eine Proben-interne Vergleichbarkeit bei unterschiedlichen Proteinmengen zu vereinfachen.

$$\text{Apoptotischer Index} = \frac{\text{Caspase 3}}{\text{Procaspase 3}} * 100$$

### 3.10 Vitalparameter

Nach Anlage des arteriellen Zugangs bei der Präparation fand eine durchgehende Überwachung der Vitalparameter durch die Software LabChart 8 mittels PowerLab 8/35 (ADInstruments, Oxford, Großbritannien) statt. Die gemessenen Parameter waren der arterielle systolische -, diastolische - und mittlere Blutdruck, welche über ein Druckabnehmersystem am arteriellen Schenkel gemessen wurden. Das aktuelle Tidalvolumen, welches über ein im inspiratorischen Schenkel eingebautes Spirometer ermittelt wurde, kam im Schlaflabor als weiterer Parameter hinzu. Eine dauerhaft angelegte rektale Temperatursonde zeigte die Körperkerntemperatur zu jedem Versuchszeitpunkt. Die rektale Temperatur wurde bei  $37 \pm 1$  °C gehalten.

### 3.11 Statistische Auswertung

Die Daten wurden hauptsächlich mit der Software SigmaPlot 12.5 (Systat Software, Erkrath, Deutschland) ausgewertet. Generalisierte Schätzgleichungen wurden mit SPSS 26 (IBM, Armonk, NY, USA) berechnet.

Zunächst erfolgte die Prüfung auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Da die meisten Daten nicht normalverteilt waren, wurden diese einheitlich als Mediane mit ihren Interquartilsabständen (engl. interquartile ranges = IQR) angegeben. Die Ergebnisse der Regressionsanalysen wurden anhand der Regressionskoeffizienten mit dem entsprechenden 95 %-Konfidenzintervall dargestellt. Das zweiseitige Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt.

Wir testeten den Effekt der Beatmungsumstellung durch den Vergleich der unmittelbar angrenzenden abgeatmeten Pentanalkonzentrationen vor und nach Umstellung der Tidalvolumina mit Hilfe einer repeated-measures ANOVA on ranks. Der anschließende paarweise Vergleich erfolgte mittels Dunn-Methode.

Die durchschnittlichen Anstiegsraten des ausgeatmeten Pentanals und dessen Zuordnung zu den jeweiligen Beatmungsparametern wurde mittels einer linearen verallgemeinerten Schätzgleichung (engl. „Generalized Estimating Equation“ = GEE) durchgeführt, um Messwiederholungen und die nicht-normale Verteilung des abgeatmeten Pentanals zu berücksichtigen.

Bei einer Kolinearität von Tidalvolumen, inspiratorischem Druck und mechanischer Kraft (Pearson's  $r > 0,7$ ) wurden univariable Modelle zur Beurteilung eines Zusammenhangs von Beatmungsparametern und der abgeatmeten Pentanalkonzentration verwendet.

Austauschbare oder autoregressive Korrelationsstrukturen wurden unter Berücksichtigung der Plausibilität der Modellparameter und des QI-Kriteriums (engl. Quasi-likelihood under independence model criterion) verwendet.

Die weiteren Vergleiche zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe einer one-way ANOVA on ranks gefolgt von paarweisen Vergleichen nach der Dunn-Methode durchgeführt. Die lineare Korrelation zwischen der Pentanalkonzentration in der Ausatemluft und derer im Blutplasma wurde mit dem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman ermittelt.

## 4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 80 Sprague-Dawley Ratten untersucht, davon konnten 75 Tiere in die Auswertung eingeschlossen werden. Ausschlussgründe waren ein vorzeitiges Versterben oder technische Fehler bei den Aufzeichnungen oder der Probenverarbeitung. Alle ausgewerteten Versuchstiere überlebten den Versuchszeitraum.

### 4.1 Pentanal in der Ausatemluft

Es gab keine signifikanten Unterschiede der abgeatmeten Pentanalkonzentration zwischen den einzelnen Gruppen zum Versuchsbeginn.

Unmittelbar nach der Beatmungsumstellung von  $6 \text{ ml*kgKG}^{-1}$  auf  $16 \text{ ml*kgKG}^{-1}$  zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Pentanals in den Interventionsgruppen und nach der Umstellung auf ein protektives Tidalvolumen kam es wiederum zu einem signifikanten Abfall des abgeatmeten Pentanals (vgl. Tab. 10).

Schädigende Beatmung						Protektive Beatmung
Protektive Beatmung (1 h)	Erster Wert	3,2 1,7 – 4,2	2,4 1,8 – 3,1	2,2 1,4 – 3,1	2,2 1,3 – 2,7	1,7 0,8 – 3,0
	Letzter Wert	3,0 1,9 – 3,7	2,0 1,5 – 2,8	2,1 1,5 – 2,9	2,1 1,5 – 2,9	1,8 0,9 – 2,8
	Erster Wert	5,2 3,3 – 6,9	3,3 2,1 – 4,3	3,4 2,4 – 4,4	3,6 2,3 – 5,6	1,9 1,0 – 2,3
Schädigende Beatmung	Dauer	0,5 h	1 h	2 h	3 h	0 h (10 h protektiv)
	Letzter Wert	5,3 3,3 – 8,0	3,7 2,1 – 5,1	5,2 3,5 – 8,1	8,9 2,7 – 12,9	3,2 1,3 – 4,6
	Erster Wert	3,3 2,0 – 4,8	2,5 1,2 – 3,7	4,1 2,3 – 5,9	5,5 2,0 – 7,4	3,2 1,3 – 5,2
Protektive Beatmung (6 h)	Letzter Wert	9,7 6,2 – 15,2	5,3 2,4 – 10,3	7,7 3,7 – 13,1	9,3 3,2 – 13,4	6,3 1,8 – 9,3

**Tabelle 10** Messwerte [ppb] der Pentanalmessungen unmittelbar vor und nach den Umschlagpunkten. Als abhängige Variable wurde hierbei das abgeatmete Pentanal [ppb] und als unabhängige Variable das Tidalvolumen [ $6 \text{ ml*kgKG}^{-1}$  oder  $16 \text{ ml*kgKG}^{-1}$ ] festgelegt. Für alle Regressionskoeffizienten ergab sich hierbei  $p < 0,001$ .

Der Anstieg bzw. Abfall des Pentanals konnte bereits bei der ersten Messung nach Umstellung des Tidalvolumens festgestellt werden. Anschließend stieg das abgeatmete Pentanal über den restlichen Versuchszeitraum kontinuierlich an.

Zur Berechnung des durchschnittlichen Pentalananstiegs während der schädigenden und protektiven Beatmung wurden lineare Regressionsmodelle verwendet (vgl. Tab. 11).

Dauer der schädigenden Beatmung [h]	Durchschnittlicher Anstieg des Pentanals [ppb/h]	
	$V_T= 16\text{ml/h}$	$V_T= 6\text{ml/h}$
<b>0</b>	<b>0,6</b> (0,3 – 1,0)	<b>0,5</b> (0,2 – 0,7)
<b>0,5</b>	<b>2,5</b> (1,4 – 3,6)	<b>1,2</b> (0,8 – 1,6)
<b>1</b>	<b>1,0</b> (0,3 – 1,7)	<b>0,6</b> (0,4 – 0,9)
<b>2</b>	<b>1,2</b> (0,8 – 1,7)	<b>0,8</b> (0,6 – 1,1)
<b>3</b>	<b>1,9</b> (1,1 – 2,6)	<b>0,9</b> (0,5 – 1,3)

Tabelle 11 Durchschnittlicher Pentalananstieg pro Stunde ( $n_{\text{ges}} = 75$  Tiere). Die linke Spalte zeigt hierbei den Pentalananstieg während der schädigenden Beatmungsperiode mit einem Tidalvolumen ( $V_T$ ) von  $16 \text{ ml} \cdot \text{kgKG}^{-1}$ . Bei der protektiv ventilerten Gruppe wurde die Beatmungsperiode vor den finalen 6 Stunden verwertet. So wurden bei der Kontrollgruppe  $n = 180$ , bei der Interventionsgruppe mit 0,5 Stunden schädigender Beatmung  $n = 30$ , bei 1 Stunde schädigender Beatmung  $n = 60$ , bei 2 Stunden schädigender Beatmung  $n = 120$  und bei 3 Stunden schädigender Beatmung mit einem Tidalvolumen von  $16 \text{ ml} \cdot \text{kgKG}^{-1}$   $n = 180$  Datenpaare eingeschlossen ( $n_{\text{ges}} = 570$ ). In der rechten Spalte wurden die finalen 6 Stunden der protektiven Beatmung mit  $6 \text{ ml} \cdot \text{kgKG}^{-1}$  mit  $n = 345$  Datenpaaren pro Gruppe aufgetragen ( $n_{\text{ges}} = 1725$ ).

Das abgeatmete Pentanal stieg während der Beatmung mit einem schädigenden Tidalvolumen im Mittel um  $1,0 - 2,5 \text{ ppb/h}$  an, wohingegen unter lungenprotektiver Beatmung der Anstieg nur  $0,6 \text{ ppb/h}$  betrug.



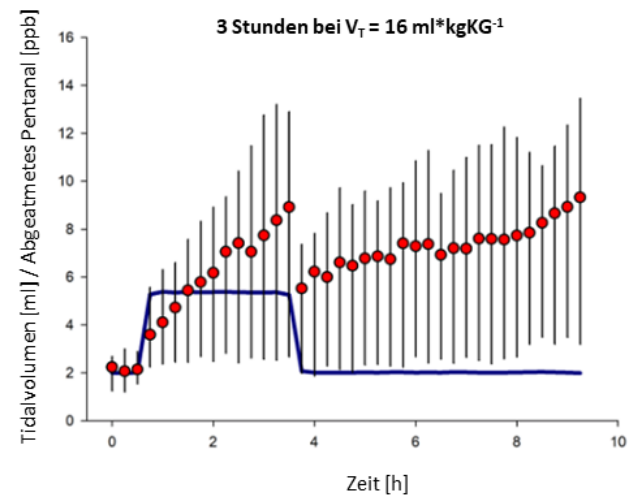
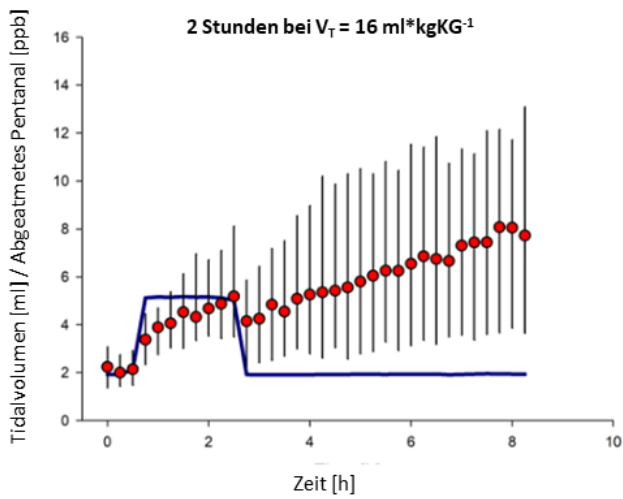
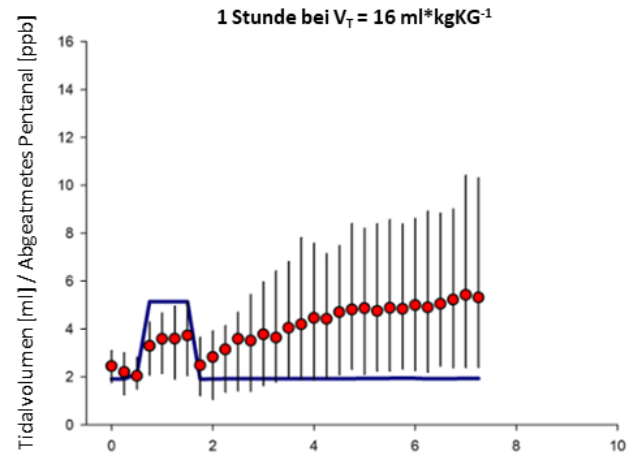
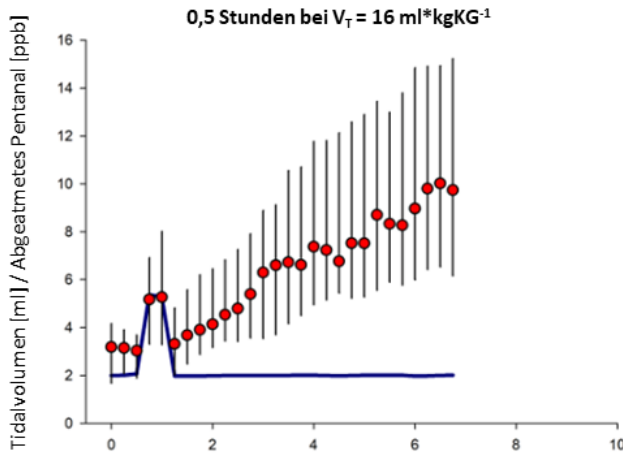
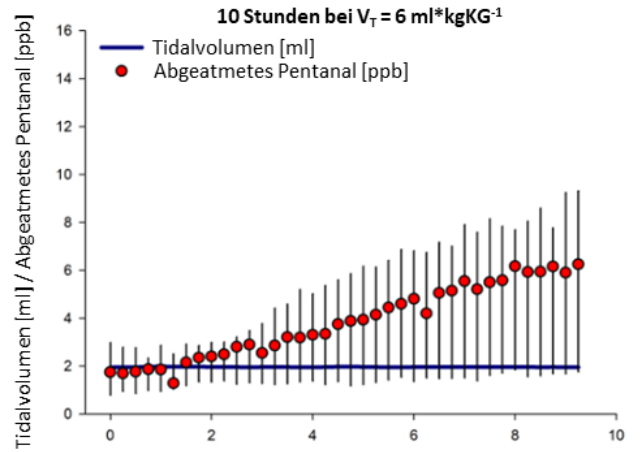
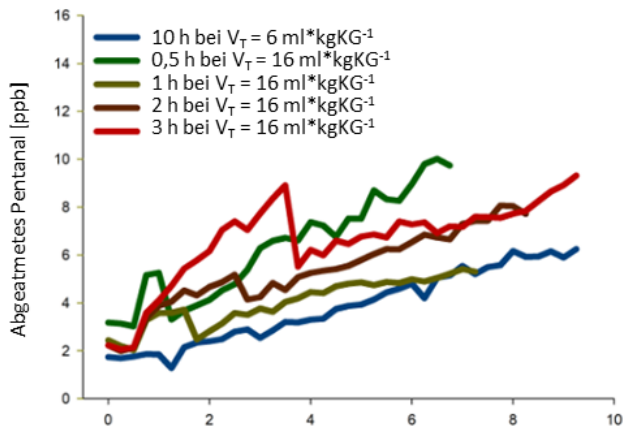
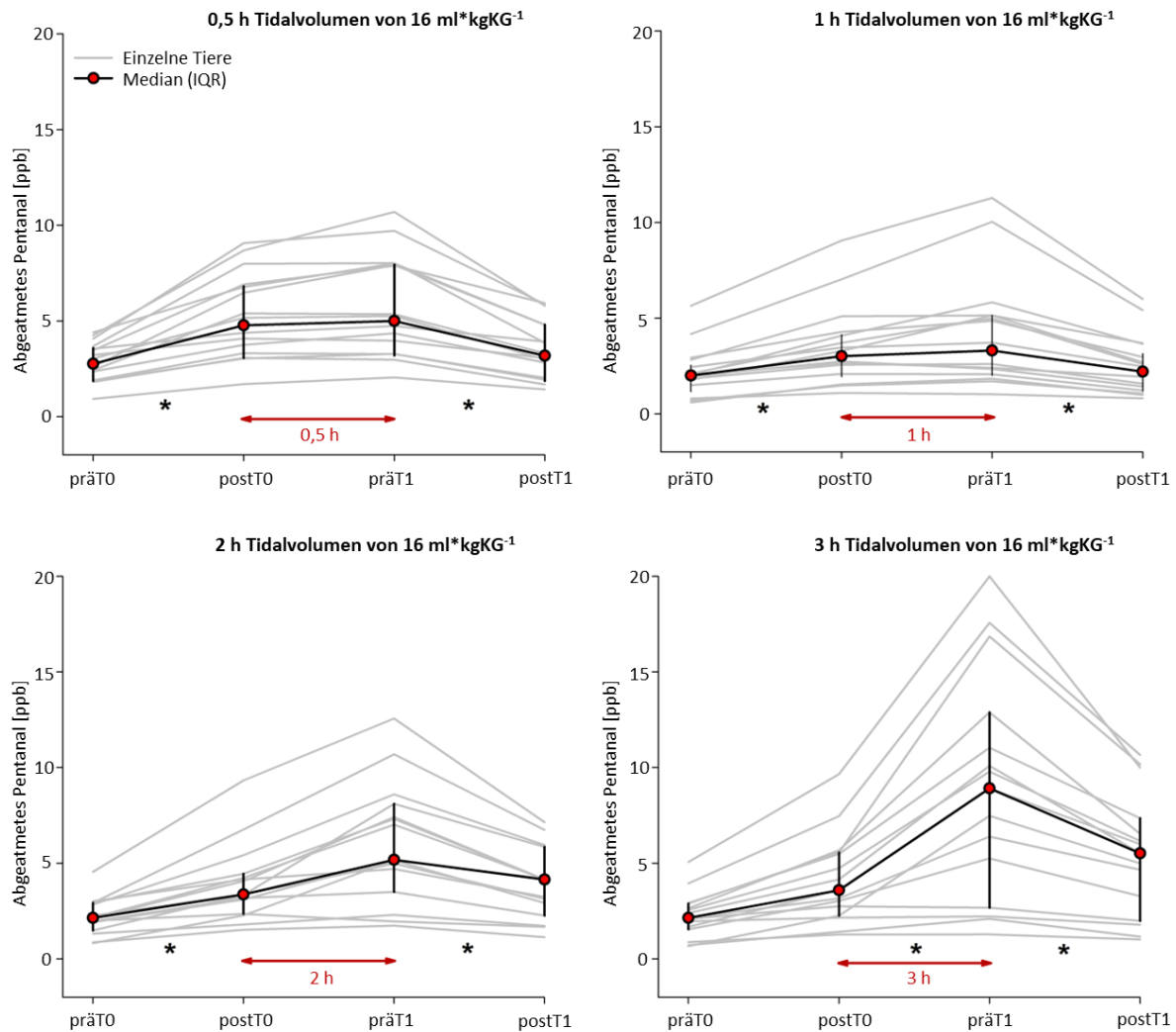


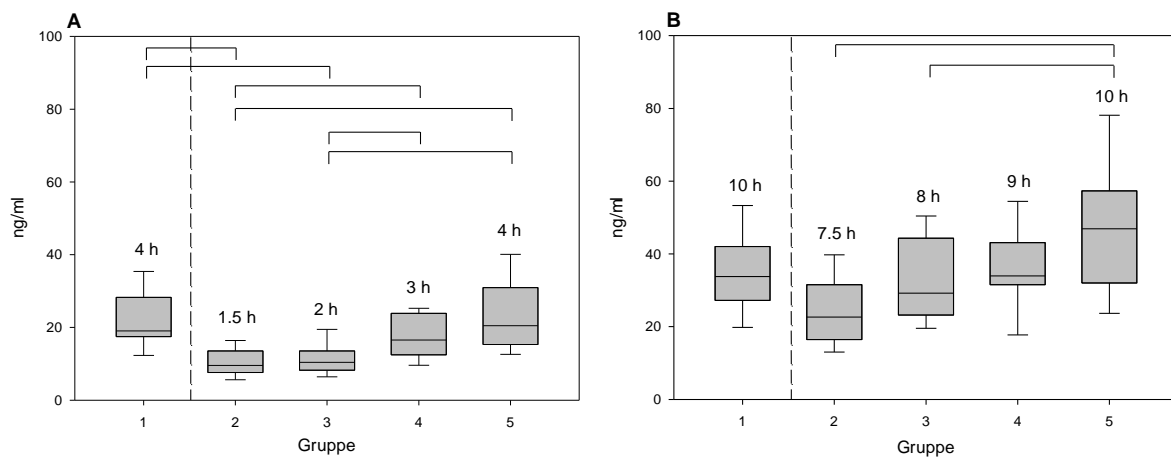
Abbildung 27 Abgeatmetes Pentanal und Tidalvolumen im Zeitverlauf. Dargestellt sind jeweils die Mediane und der IQR.



**Abbildung 28** Abgeatmetes Pentanal zu Zeitpunkten vor und nach Beatmungsumstellung. Über einen Zeitraum von 0,5; 1; 2 oder 3 Stunden wurden die Tiere mit einem Tidalvolumen von  $16 \text{ ml} \cdot \text{kgKG}^{-1}$  beatmet. Die dargestellten Diagramme zeigen den Pentanalverlauf in ppbv der einzelnen Versuchstiere (grau) und die Mediane mit dem Interquartilsabstand (engl. inter quartile range (IQR)) der einzelnen Gruppen (schwarz).  $N = 15$  Ratten pro Gruppe. \* =  $p < 0,05$  bei Anwendung des Dunn-Tests zum paarigen Vergleich. präT<sub>0</sub> = letzter Wert vor Beatmungsumstellung auf ein schädigendes Tidalvolumen, postT<sub>0</sub> = erster Wert nach Beatmungsumstellung auf ein schädigendes Tidalvolumen, präT<sub>1</sub> = letzter Wert vor Beatmungsumstellung auf ein protektives Tidalvolumen, postT<sub>1</sub> = erster Wert nach Beatmungsumstellung auf ein protektives Tidalvolumen.

In den Gruppen 2 - 4 zeigte sich ein signifikanter Anstieg der abgeatmeten Pentanalkonzentration direkt nach der Umstellung von protektiven auf schädliche Tidalvolumina sowie ein signifikanter Abfall bei der Umstellung auf protektive Tidalvolumina (vgl. Abb. 28). In Gruppe 5 zeigte sich kein signifikanter Anstieg des abgeatmeten Pentanals nach der Umstellung von der protektiven auf die schädigende Beatmung, jedoch wurde während der schädigenden Beatmungsperiode ein signifikanter Anstieg und bei Umstellung auf ein protektives Tidalvolumen ein signifikanter Abfall des Pentanals verzeichnet.

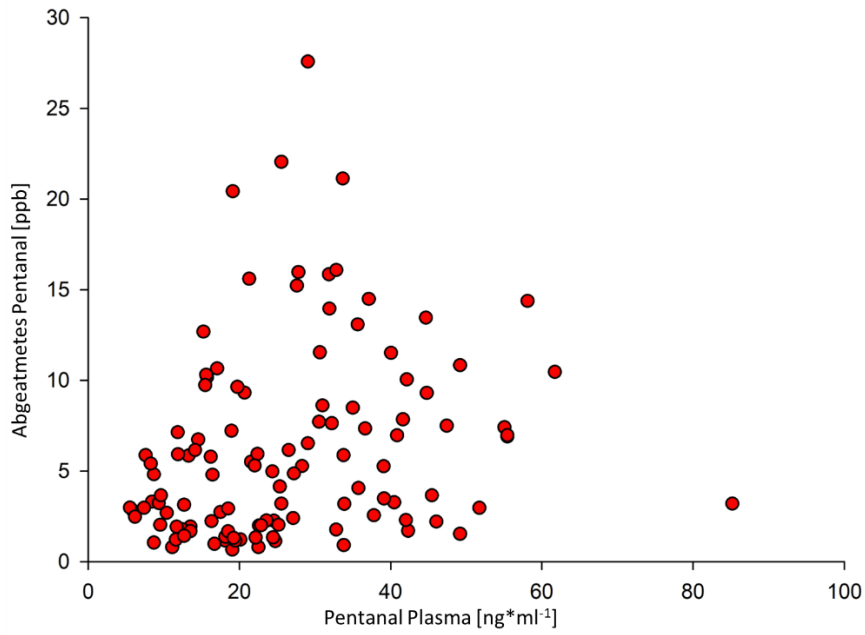
Die Messung des Serumpentanal erfolgte mittels HPLC (vgl. Kapitel 3.6). Die Ergebnisse wurden in einem BoxPlot grafisch dargestellt und auf signifikante Unterschiede überprüft (vgl. Abb. 29).



**Abbildung 29** Pentanalkonzentration im Plasma. A = nach Umstellung auf schädigende Beatmung (postT<sub>1</sub>); B = Versuchsende (T<sub>3</sub>); Klammern = p < 0,05.

Nach der Umstellung auf ein schädigendes Tidalvolumen zeigten sich signifikante Unterschiede der Messwerte von jeweils Gruppe 2 und 3 zu den anderen Gruppen. Ansonsten wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Am Versuchsende zeigten sich lediglich signifikante Unterschiede der Pentanalplasmakonzentration zwischen der Gruppe 5 mit jeweils den Gruppen 2 und 3.

Im Anschluss wurde eine Korrelationsanalyse der Ausatemluft- und der Plasmakonzentrationen durchgeführt. Die Korrelation ist im folgenden Punktdiagramm graphisch dargestellt (vgl. Abb. 30). Hierzu wurden die Werte zu Beginn (R<sub>T1</sub>) und am Ende (R<sub>T3</sub>) der letzten sechsstündigen protektiven Beatmungsphase mit einem Tidalvolumen  $V_T = 6 \text{ ml} \cdot \text{kgKG}^{-1}$  verglichen. Es zeigte sich keine wesentliche Korrelation der Pentanalwerte in der Ausatemluft und des Blutplasmas (R<sub>T1</sub> = 0,04, R<sub>T3</sub> = -0,01, p = < 0,05).

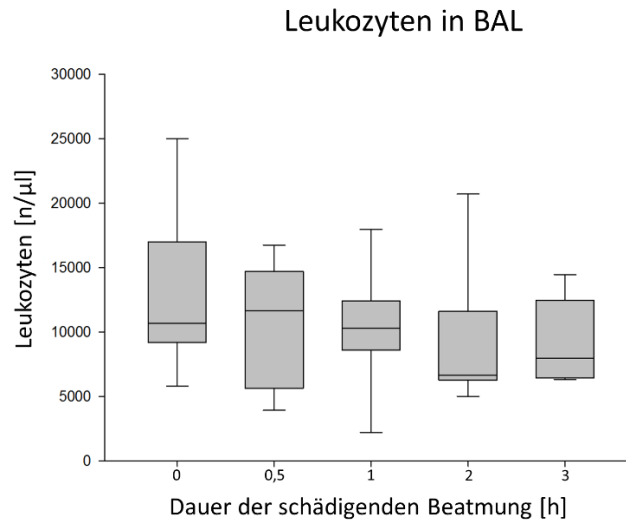


**Abbildung 30** Darstellung der Pentanalkonzentrationen im Blutplasma in Abhängigkeit von denen in der Ausatemluft. Es lässt sich kein linearer Zusammenhang zwischen beiden Werten feststellen. Zwei Datenpaare einer Ratte wurden aufgrund ihrer Unglaubwürdigkeit (ausgeatmet/Plasma: 1,8 ppb / 187 ng\*ml<sup>-1</sup>, 1,4 ppb / 148 ng\*ml<sup>-1</sup>) nicht in diese Auswertung eingeschlossen (n= 74 Tiere).

## 4.2 Inflammation

### 4.2.1 Leukozyten

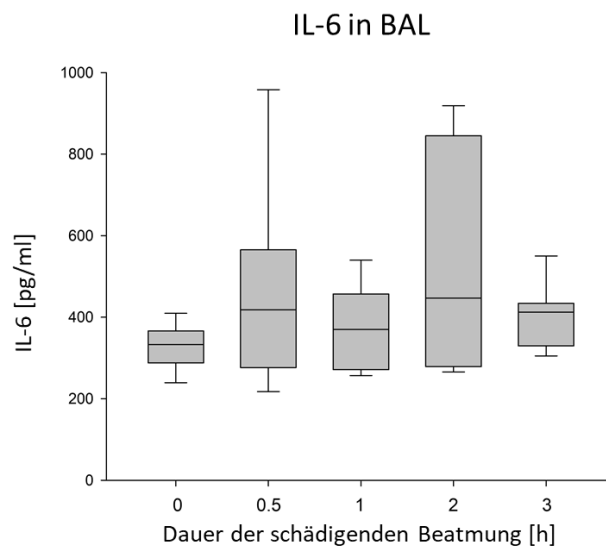
Zwischen den verschiedenen Untersuchungsgruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Leukozytenzahlen in der bronchoalveolären Lavage (BAL;  $p = 0,76$ ; vgl. Abb. 31).



**Abbildung 31 Leukozytenzahl pro  $\mu\text{l}$  BAL-Flüssigkeit (n = 7 pro Gruppe)**

### 4.2.2 IL-6

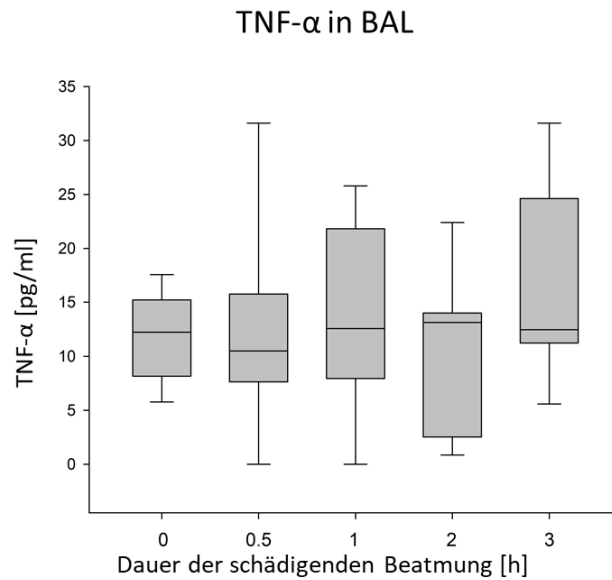
Die Auswertung der IL-6 Konzentration pro ml in der bronchoalveolären Lavage zeigte zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,52$ ; vgl. Abb. 32).



**Abbildung 32 IL-6 Konzentration in  $\text{pg/ml}$  in der BAL (n = 7 pro Gruppe)**

### 4.2.3 TNF-alpha

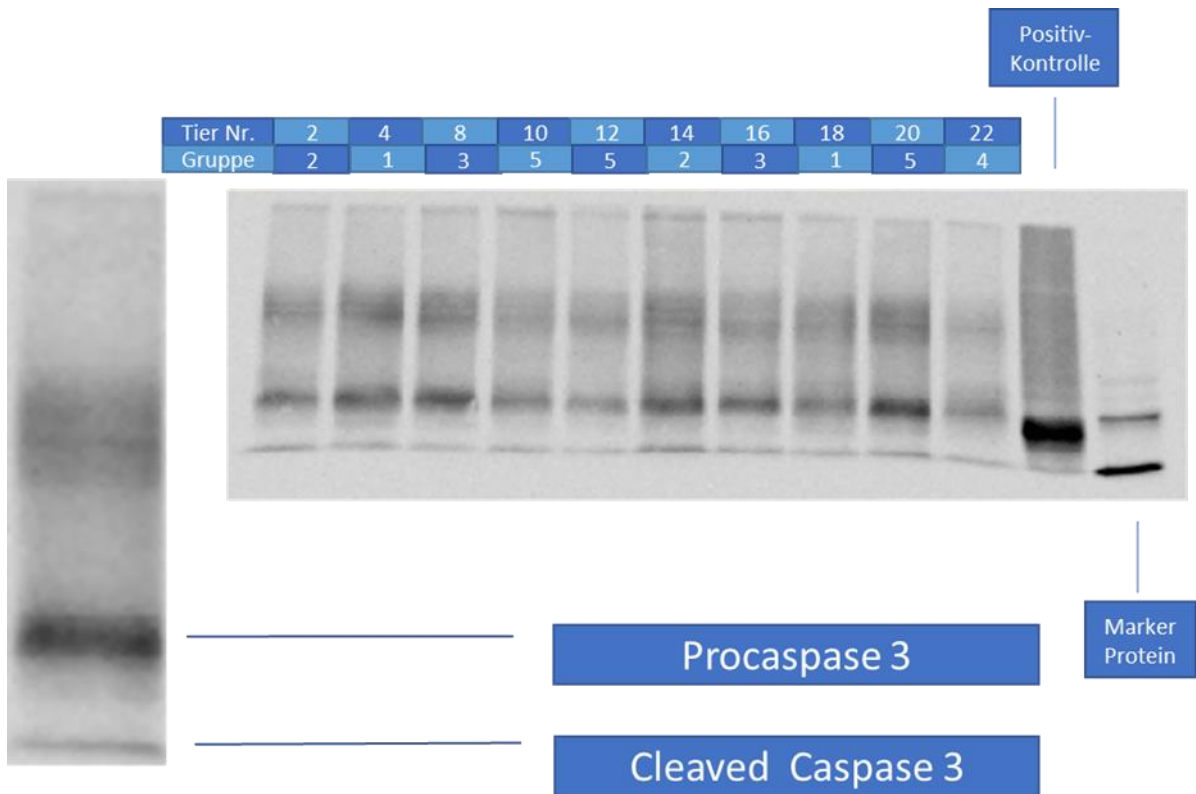
Die Auswertung des Tumornekrosefaktors-alpha ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ( $p = 0,85$ ; vgl. Abb. 33).



**Abbildung 33 TNF- $\alpha$  Konzentration in pg/ml in der BAL (n = 7 pro Gruppe)**

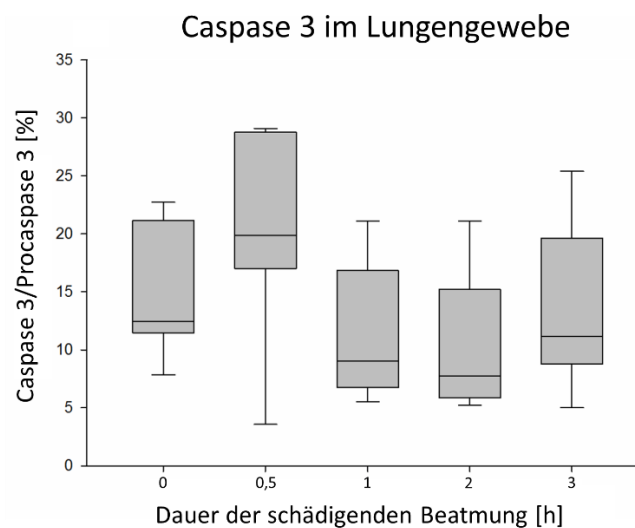
### 4.3 Apoptose (Caspase 3)

Bei etwa der Hälfte der Tiere ( $n = 40$ ) wurde nach dem Exitus die linke Lunge entnommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend mittels Western Blot Technik auf den Apoptosemarker Caspase 3 und deren Vorstufe die Procaspase 3 untersucht. Die einzelnen Banden sind bei jedem Western Blot zu erkennen und gut abzugrenzen (vgl. Abb. 34).



**Abbildung 34** Beispielhafte Darstellung eines Western Blots zur Bestimmung des Verhältnisses von aktivierter Caspase 3 (Cleaved Caspase 3) zur inaktiven Vorstufe (Procaspase 3).

Die einzelnen Intensitäten der aktivierten Caspase 3 wurden durch die der inaktiven Vorstufe dividiert und anschließend mit dem Faktor 100 multipliziert. So wurde das prozentuale Verhältnis von aktivierter zu inaktiver Caspase 3 berechnet.

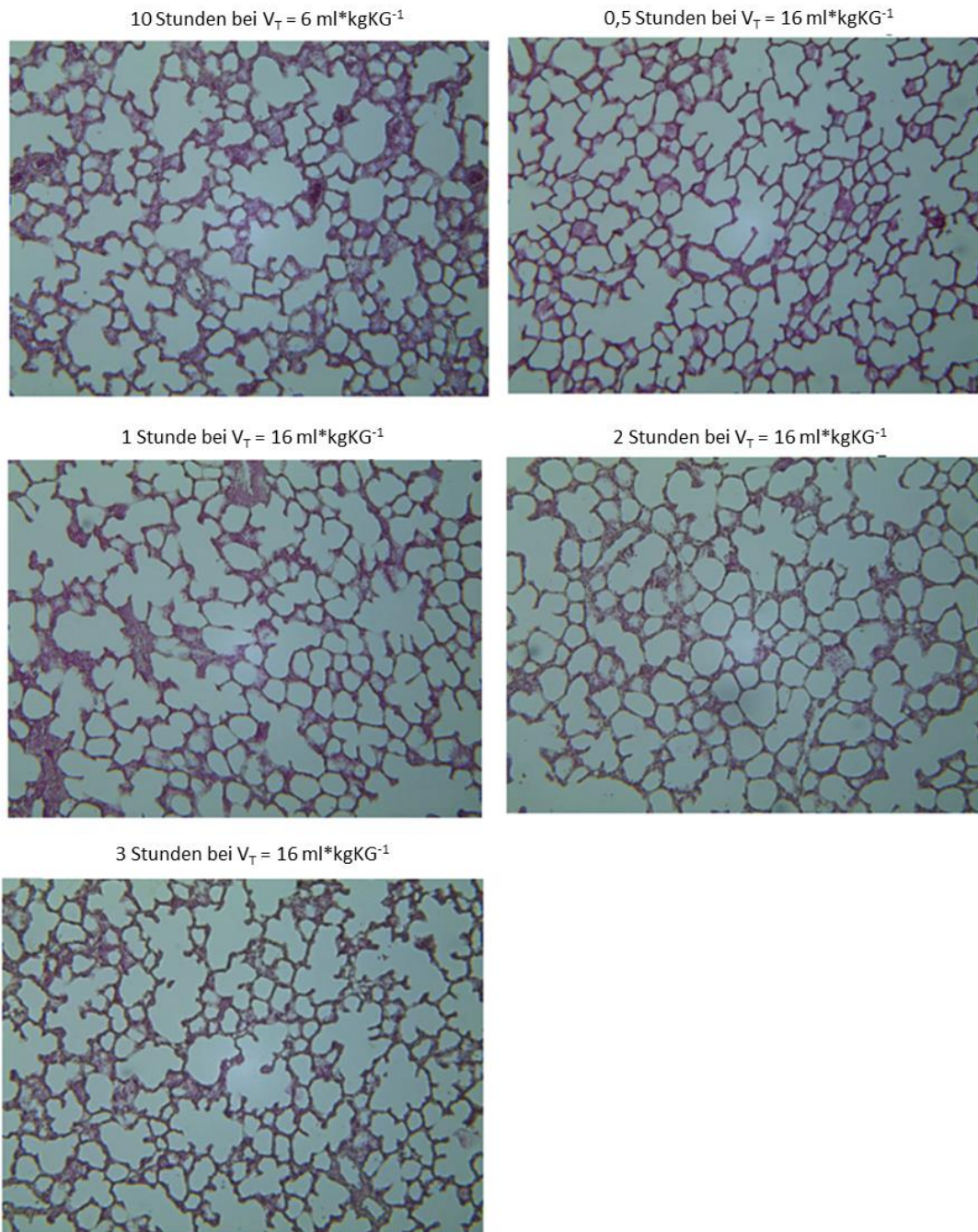


**Abbildung 35** Prozentualer Anteil der aktivierten Caspase 3 an der Procaspase 3 (n = 8 pro Gruppe).

Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (p = 0,09; vgl. Abb. 35).

## 4.4 Histologie

Die histologische Sichtung des Lungengewebes erfolgte an repräsentativen mikroskopischen Schnittbildern der linken Lunge in Hämatoxylin-Eosin-Färbung (vgl. Abb. 36).



**Abbildung 36 HE-Färbung, 200-fache Vergrößerung. Repräsentative histologische Bilder der Lunge**

Bei der mikroskopischen Beurteilung der repräsentativen Schnittbilder konnten keine gruppenspezifischen Unterschiede festgestellt werden, so dass auf eine weitere Auswertung verzichtet wurde.



## 4.5 Vitalparameter und Blutgase

Die Vitalparameter blieben während des Versuchszeitraums im physiologischen Bereich. Beim mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) wurde gruppenunspecifisch ein konstanter Abfall verzeichnet (vgl. Abb. 37).

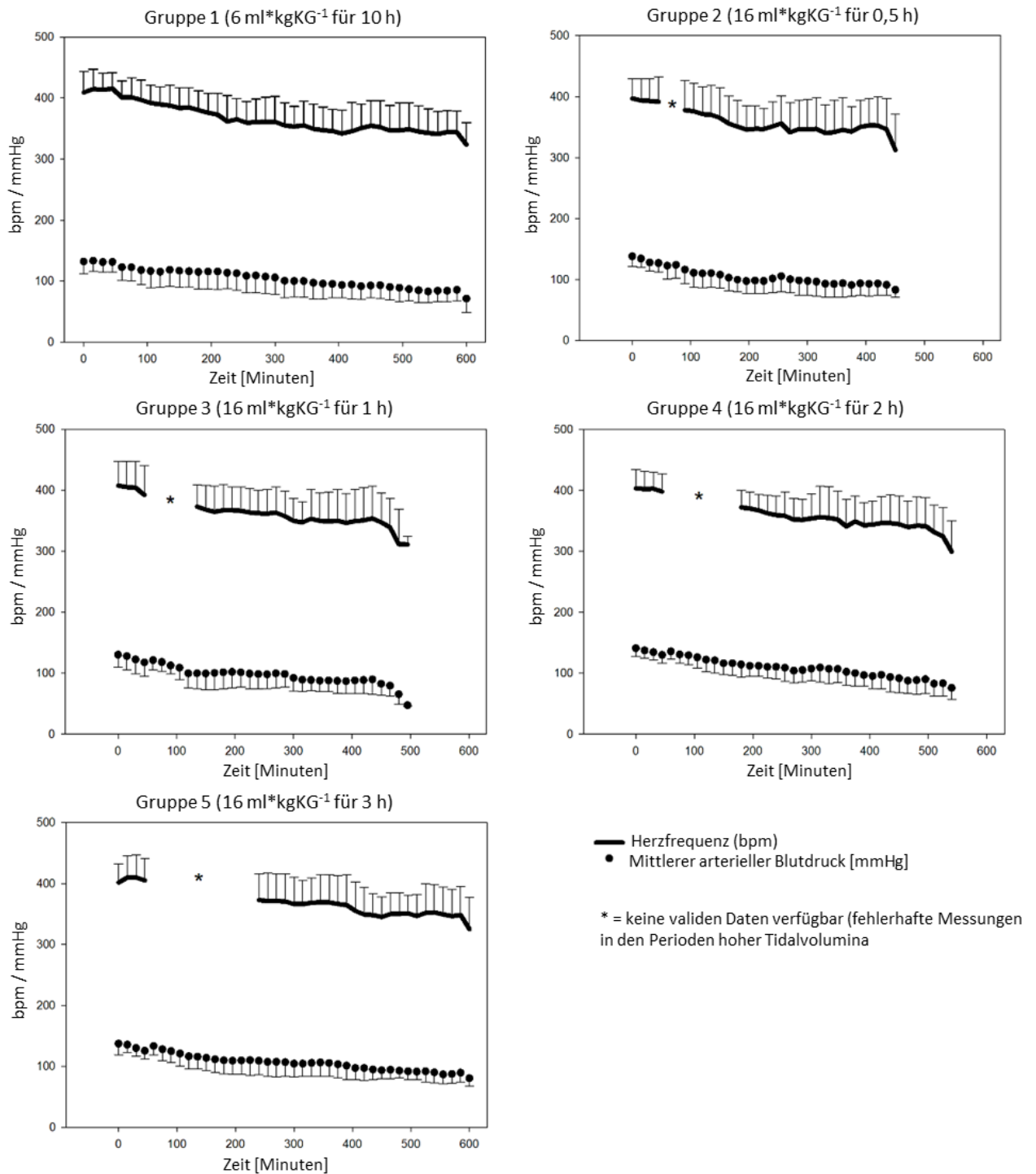


Abbildung 37 Gruppenweiser Verlauf des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) über den Versuchszeitraum. \* = im Bereich hoher Tidalvolumina kam es zu einer Verfälschung der Einzelmessungen und dementsprechend zu einem Ausschluss der Werte.

Im Bereich der Intervention kam es durch die hohen Tidalvolumina ( $V_T = 16 \text{ ml} \cdot \text{kgKG}^{-1}$ ) zu einer Verfälschung der gemessenen Blutdruckwerte. Diese Werte wurden nicht in die Auswertung eingeschlossen.

Die Blutgasanalysen zeigten weitgehend konstante respiratorische Werte ( $pO_2$ ,  $pCO_2$ ,  $SaO_2$ ) ohne relevante Verschiebungen des Blut-pHs.

Gruppe	Zeitpunkt	pH	pCO <sub>2</sub> [mmHg]	pO <sub>2</sub> [mmHg]	Sättigung [%]	Hb [g/dl]	Laktat [mmol/l]	BE [mmol/l]
1	T0	7.37 (7.36-7.42)	44 (41-47)	218 (201-236)	98 (98-99)	13.8 (13.3-15)	0.5 (0.4-0.6)	1.1 (-0.3-3.2)
	T2	7.37 (7.31-7.42)	42 (35-45)	221 (178-229)	98 (98-99)	11.9 (11.6-12.5)	0.5 (0.4-0.7)	-1.7 (-3.8-0.8)
	T3	7.36 (7.33-7.42)	39 (37-42)	190 (175-239)	99 (98-99)	10.8 (10.1-11.6)	0.5 (0.4-0.6)	-2.7 (-5.3-1.5)
2	T0	7.42 (7.40-7.45)	38 (35-39)	234 (214-250)	99 (98-100)	14.3 (13.4-15)	0.6 (0.5-0.7)	0.9 (0.2-1.4)
	T2	7.40 (7.35-7.41)	38 (36-41)	220 (199-240)	100 (99-100)	12.9 (12.3-13.8)	0.5 (0.4-0.6)	-2.1 (-4.5-0.3)
	T3	7.38 (7.35-7.41)	37 (34-39)	215 (186-245)	99 (99-100)	11 (10.3-11.5)	0.5 (0.4-0.6)	-3.8 (-4.7-2)
3	T0	7.42 (7.41-7.44)	38 (38-40)	222 (213-234)	99 (98-99)	14 (13.6-14.5)	0.5 (0.4-0.5)	0.9 (-0.2-1.4)
	T2	7.39 (7.36-7.42)	40 (37-42)	232 (211-243)	99 (99-100)	12.2 (11.3-12.7)	0.5 (0.4-0.6)	-1.4 (-2.1-0.1)
	T3	7.36 (7.32-7.38)	40 (39-43)	216 (164-240)	98 (98-99)	10.5 (10.4-11.3)	0.4 (0.4-0.4)	-2.6 (-4.1-1.9)
4	T0	7.41 (7.40-7.43)	40 (38-42)	236 (225-248)	99 (98-99)	14.1 (13.7-15.5)	0.5 (0.4-0.6)	0.9 (0.3-1.4)
	T2	7.37 (7.35-7.40)	40 (37-43)	218 (194-250)	99 (99-100)	12.5 (11.6-14)	0.4 (0.4-0.5)	-2.5 (-3.8-(-0.7))
	T3	7.37 (7.34-7.39)	38 (37-41)	218 (189-244)	99 (98-99)	10.7 (9.8-11.8)	0.4 (0.3-0.5)	-3.6 (-5.5-(-1.7))
5	T0	7.42 (7.40-7.44)	39 (36-44)	219 (196-238)	99 (98-99)	14 (13.1-14.6)	0.5 (0.5-0.5)	1.1 (-0.9-2.5)
	T2	7.36 (7.33-7.4)	40 (38-45)	226 (190-250)	99 (98-100)	11.6 (11.2-13)	0.5 (0.4-0.6)	-2.7 (-4-(-0.7))
	T3	7.37 (7.32-7.42)	39 (37-40)	193 (159-234)	99 (98-99)	10.3 (9.7-11.5)	0.4 (0.4-0.5)	-3 (-5.9-(-0.9))

**Tabelle 12** Ergebnisse der Blutgasanalyse als Mediane und dem jeweiligen Interquartilsabstand (IQR). Eine Gruppe (n = 15 Tiere) wurde über einen Gesamtzeitraum von 10 Stunden mit  $6 \text{ ml} \cdot \text{kgKG}^{-1}$  beatmet, bei vier Gruppen wurden die Tiere intermittierend für 0,5; 1; 2 oder 3 Stunden mit einem Tidalvolumen von  $16 \text{ ml} \cdot \text{kgKG}^{-1}$  ventiliert.

Das Laktat blieb gruppenübergreifend nahezu konstant über den gesamten Versuchszeitraum. Der Hb-Wert verzeichnet in allen Gruppen einen stetigen Abfall. Der Base Excess negativierte sich zunehmend über den Versuchszeitraum.

## 5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob ein durch erhöhte Tidalvolumina verursachter Anstieg der abgeatmeten Pentanalkonzentration nach der Umstellung auf eine lungenprotektive Beatmung wieder abfällt.

Hierzu wurden 75 Ratten in fünf Gruppen randomisiert. Eine Gruppe diente hierbei als Kontrollgruppe und wurde über den gesamten Versuchszeitraum von 10 Stunden mit einem Tidalvolumen von  $6 \text{ ml} \cdot \text{kgKG}^{-1}$  ventiliert. Die übrigen 60 Ratten wurden für unterschiedliche Zeiträume (0,5; 1; 2 oder 3 Stunden) mit erhöhten Tidalvolumina von  $16 \text{ ml} \cdot \text{kgKG}^{-1}$  beatmet und anschließend auf ein niedrigeres lungenprotektives Tidalvolumen von  $6 \text{ ml} \cdot \text{kgKG}^{-1}$  umgestellt. Währenddessen wurde die abgeatmete Pentanalkonzentration mittels MCC-IMS gemessen und das Blut sowie verschiedene Gewebe histologisch und molekularbiologisch auf Schädigungsmarker untersucht.

### 5.1 Diskussion der Methodik

Um eine Veränderung der flüchtigen organischen Stoffe (engl. volatile organic compounds = VOCs) wie dem Pentanal festzustellen, gilt die Gaschromatographie als Goldstandard. Dieses Verfahren ist jedoch zu unpraktikabel für eine bettseitige Messung. Das MCC-IMS hingegen trennt die einzelnen VOCs nach Retentionszeit und Driftzeit auf und erlaubt über die Intensität eine Bestimmung der Konzentration, ohne die Probe aufbereiten zu müssen [115].

Die Anwendbarkeit unter Umgebungsluft und die Möglichkeit einer bettseitigen Messung macht daher eine klinische Erprobung denkbar. Dennoch müssen in diesem Fall weitere Störfaktoren, wie die Zusammensetzung der Raumluft, einberechnet werden. Das Ausblenden dieser Störgrößen könnte einen Einfluss auf das Messergebnis haben und dieses verfälschen [20]. So wurde in unserem Versuchsaufbau auf besondere Reinigungsmittel verzichtet sowie die Aufenthaltsdauer von Personen im Versuchsraum so gering wie möglich gehalten. Diese Anpassungen würden sich in einem klinischen Setting als schwierig gestalten.

Der Versuchsaufbau, sowohl zur Probenentnahme der Atemluft als auch zu Teilen der Probenverarbeitung, wurde bereits im Vorfeld in unserem Forschungslabor standardisiert und validiert [116]. Notwendige Modifikationen wurden im Bereich Material und Methodik dargestellt [7].

Die Auswahl des Materials der Probenschläuche fiel auf Leitungen aus Perfluoralkoxyalkan (PFA). Bei diesem besonders inerten Material wurde eine geringere Anhaftung, z. B. von Propofol, gegenüber herkömmlichen Silikonschläuchen nachgewiesen [61]. Studien bezüglich der Adhäsion von Pentanal an

den Probenschläuchen existieren derzeit nicht. Ob die Wahl der Probenleitung einen Einfluss auf diese Messung hatte, bleibt unklar, ist aber bei einer guten Vergleichbarkeit der Werte unwahrscheinlich.

Eine mögliche Fehlerquelle unseres Studiendesigns könnte die unterschiedlich lange Versuchsdauer der Gruppen sein. Die einzelnen Beatmungsphasen waren mit einer zunächst einstündigen protektiven Ventilation, folgend mit einer lungenschädigenden Beatmung mit unterschiedlicher Dauer und einer erneuten 6-stündigen protektiven Beatmung geplant (vgl. Abb. 14).

Die Ratten der Gruppen 1 und 5 wurden zeitlich am längsten beatmet (10 Stunden), während die Tiere in Gruppe 2 die kürzeste Beatmungszeit aufwiesen (7,5 Stunden). Das eigentliche Ziel dieses Versuchsaufbaus, die Dynamik des Pentanals zu den Zeitpunkten der Beatmungsumstellungen, ist davon jedoch nicht beeinträchtigt.

Die unterschiedlich langen Beatmungsperioden könnten jedoch zu einer erschwerten Vergleichbarkeit der zum Versuchsende erhobenen Daten wie der Histologie, der Zytokinauswertung und der Leukozytenzählung geführt haben.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

### 5.2.1 Pentanal als Biomarker

Das abgeatmete Pentanal zeigt bei der protektiv ventilierten Gruppe über den gesamten Beatmungszeitraum einen leichten Anstieg. Bei den Interventionsgruppen sind die Pentanalwerte im lungenschädlich ventilierten Zeitraum signifikant erhöht und sinken bei der anschließenden Protektivbeatmung ebenso signifikant ab. Hierbei ist zu beachten, dass sich bereits der jeweils erste Wert nach der Beatmungsumstellung signifikant zum Vorwert unterschied, dies könnte eine besonders schnelle Reaktion der abgeatmeten Pentanalkonzentration auf lungenschädigende Einflüsse zeigen.

Die quantitative Vergleichbarkeit der gemessenen Werte untereinander gestaltet sich bei einer gewissen Streuung der Ausgangswerte als schwierig. Die Gruppenzuteilung der Tiere erfolgte randomisiert, um mögliche subjektspezifische Unterschiede auszugleichen. Dennoch wies die zweite Gruppe ( $V_T = 16 \text{ ml} \cdot \text{kgKG}^{-1}$  für 0,5 Stunden) einen deutlich höheren Pentalanstieg pro Stunde auf als die anderen Interventionsgruppen. Dies könnte auf eine erhöhte Anfälligkeit für eine Lungenschädigung in dieser Gruppe hindeuten. Es bleibt offen, ob diese Tiere ein bisher unbekanntes prädisponierendes Merkmal aufweisen.

Nicht zuletzt müssen weitere Faktoren bezüglich der quantitativen Auswertung der Ergebnisse beachtet werden. So konnte gezeigt werden, dass sowohl Propofol als auch Ketamin einen protektiven

Effekt auf das Lungengewebe haben [109, 120]. Inwieweit die Verwendung dieser Substanzen oder deren mögliche Akkumulation einen Einfluss auf die Messwerte haben, bleibt zu klären.

Trotz der fehlenden quantitativen Vergleichbarkeit des abgeatmeten Pentanals könnte dennoch die Beobachtung der Pentanaldynamik als Parameter einer Ventilator-induzierten Lungenschädigung fungieren. Da sich bereits der jeweils erste gemessene Wert nach einer Beatmungsumstellung signifikant vom Vorwert unterscheidet, kann somit möglicherweise bereits frühzeitig der Effekt einer therapeutischen Intervention vorausgesagt werden.

Eine Ventilator-induzierte Lungenschädigung, wie in unserer Untersuchung dargestellt, ist jedoch nicht die einzige Ursache einer verstärkten Abatmung von Pentanal. So können zum einen Pathologien der Lunge wie das akute Lungenversagen z. B. im Rahmen eines Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS), Asthma bronchiale oder Lungenkarzinome, aber auch systemische Erkrankungen wie ein schlecht eingestellter Diabetes mellitus, Malnutrition, Arteriosklerose oder eine Niereninsuffizienz zu einer erhöhten Abatmung von Pentanal führen [37, 57, 71, 99]. Auch extrapulmonale Tumoren wurden als Ursache einer vermehrten Pentanalabatmung identifiziert [52].

Inwieweit die Ergebnisse dieser Studie unter klinischen Bedingungen anwendbar sind, ist demnach unklar. Gerade bei kritisch Kranken oder bei multimorbiden Patienten gilt es wichtige klinische Aspekte bei der Wahl der Beatmungsstrategie zu beachten. Insbesondere für Patienten, welche an einem ARDS leiden, wäre ein Biomarker zur Überwachung der Beatmungsinvasivität hilfreich.

Das ARDS bezeichnet ein akut auftretendes respiratorisches Versagen, welches mit einer Entzündung des Lungengewebes, einer erhöhten Permeabilität der Lungengefäße und einer Verminderung der ventilatorischen Austauschfläche einhergeht [19, 75, 77, 106]. Dieses Schädigungsmuster ähnelt dem eines Biotraumas bei einer Ventilator-induzierten Lungenschädigung.

Die Beatmung solcher Patienten kann nicht anhand strikt vorgegebener Tidalvolumina oder Beatmungsprotokolle erfolgen. In der klinischen Praxis wird versucht durch die Verminderung von Atelektasen und die Reduktion des transpulmonalen Drucks sowie die Belüftung ungenutzter Areale, eine ausreichende Oxygenierung sicherzustellen und die auf die vorgeschädigte Lunge wirkenden Kräfte durch die Beatmung möglichst gering zu halten [81, 83].

Die Beatmung bei ARDS-Patienten ist weiterhin Gegenstand aktueller Forschung. So wurde in den 1990er Jahren vorwiegend auf die Vermeidung großer Scherkräfte, welche bei einer Eröffnung kollabierter Lungenabschnitte entstehen, geachtet. Daher wurden mitunter Recruitment Manöver mit anschließender Anlage eines hohen endexpiratorischen Drucks empfohlen [53].

Pelosi et al. veröffentlichten im Jahr 2018 einen Review, in dem das Konzept der sog. „open lung“ kritisch hinterfragt wurde und das Konzept der permissiven Atelektasen diskutiert wurde. Hier wird

ein niedriger PEEP in Kombination mit niedrigen Tidalvolumina postuliert, welcher einen adäquaten Gasaustausch ermöglicht. Verglichen mit anderen Beatmungsformen kam es durch die Anwendung der Strategie der permissiven Atelektasen zu einer Reduktion der Ausschüttung von Entzündungsmediatoren (IL-6, Receptor for Advanced Glycation End products (RAGE) und Amphiregulin) und der Inflammation im Gewebe [75].

Beide Theorien werden in der Fachwelt diskutiert, ohne dass bisher eine eindeutige Empfehlung ausgesprochen werden konnte [40, 104]. Ein möglicher Biomarker, welcher nicht-invasiv gemessen und eine zuverlässige Aussage bezüglich der Beatmungsinvasivität treffen kann, könnte möglicherweise helfen, eine Empfehlung auszusprechen.

In diesem Versuchsaufbau sollten alternative Ursachen einer Pentanalentstehung möglichst ausgeschlossen werden. So handelt es sich bei den hier verwendeten Sprague-Dawley Ratten um Versuchstiere einer gemeinsamen genetischen Linie. Diese waren gesund, ohne körperliche Leiden und anhand der Werte in der arteriellen Blutgasanalyse sowie des Monitorings erkennbar über den gesamten Versuchszeitraum in einem Zustand der körperlichen Homöostase.

Zusammenfassend kann man für die klinische Erprobung folgern, dass gerade bei vorerkrankten Personen alternative Entstehungsmechanismen des Pentanals existieren. Eine Erhöhung des abgeatmeten Pentanals im klinischen Setting könnte somit auf eine Zustandsverschlechterung der Komorbiditäten und nicht zwangsweise auf eine falsch eingestellte Ventilation zurückzuführen sein. Eine sichere Abgrenzung wäre vermutlich nur in Zusammenschau mit sowohl klinischen, als auch laborchemischen und radiologischen Befunden möglich. In unserer Untersuchung scheint jedoch ein direkter Zusammenhang zwischen einer Veränderung der Beatmungssituation des Versuchstieres und der Veränderung des abgeatmeten Pentanals zu bestehen.

### 5.2.2 Hypothese zur Pentanalentstehung

In unserem Versuch konnten wir analog zu der Beatmungsumstellung eine konkordante Veränderung der abgeatmeten Pentanalkonzentration zum applizierten Tidalvolumen feststellen. Das Pentanal gehört zu den flüchtigen organischen Stoffen, welche in der Ausatemluft nachgewiesen werden können. Eine eindeutige Zuordnung zu verschiedenen biochemischen Prozessen ist nur bei wenigen VOCs erforscht.

Pentanal wurde jedoch im Rahmen diverser Studien als einer der Metabolite identifiziert, welche durch den Prozess der Lipidperoxidation entstehen [44, 65, 78, 86, 119].

Die Lipidperoxidation wird primär mit der Entstehung von Sauerstoffradikalen (reactive oxygen species, ROS) in Verbindung gebracht (vgl. Kapitel 2.5). Es konnte nachgewiesen werden, dass eine mechanische Beatmung eine Überdehnung bereits belüfteter Alveolen zur Folge hat [21]. Die hier entstehenden Scherkräfte im Lungengewebe führen zu Membranschädigungen und könnten dadurch zu einer vermehrten Oxidation der nun exponierten ungesättigten Fettsäuren führen [91]. Hierbei könnte das Maß der Oberflächenvergrößerung der Lunge und der entsprechenden Schädigung des Gewebes mit der gemessenen Pentanalkonzentration zusammenhängen.

Jedoch spielen die ROS möglicherweise nur eine untergeordnete Rolle bei der Entstehung von Pentanal. In einer Folgestudie konnten wir zeigen, dass die inspiratorische Sauerstoffkonzentration keinen wesentlichen Einfluss auf die Pentanalabatemung hat und dass das abgeatmete Pentanal in Abhängigkeit zur Beatmungsinvasivität ansteigt [67]. Demgegenüber reagierte ein parallel entstehendes Produkt der Lipidperoxidation, das Hexanal, auf eine Erhöhung der inspiratorischen Sauerstofffraktion ( $FiO_2$ ) [67].

Hierbei untermauert der leichte, aber kontinuierliche Anstieg der Pentanalkonzentration in der Ausatemluft bei der protektiv-ventilierten Gruppe die Hypothese, dass jede Beatmung eine Schädigung des Lungengewebes bewirkt.

### 5.3 Leukozyten und Inflammation

Die Auswertung der Leukozyten und der inflammatorischen Marker erfolgte in der vorliegenden Untersuchung, um die biologische Schädigung des Lungengewebes im Rahmen des Ventilator-induzierten Lungenschadens quantifizieren zu können (vgl. Kapitel 2.4.5).

Sowohl IL-6, TNF- $\alpha$  und Leukozyten konnten bereits von Trembley et al. in der bronchoalveolären Lavage nachgewiesen werden [100]. So sollte eine Differenzierung zwischen den lokal, also pulmonal entstandenen Entzündungsmediatoren und den systemischen Mediatoren unterschieden werden.

In dieser Studie unterschieden sich hingegen weder die Leukozytenzahl, noch die inflammatorischen Interleukine oder der Tumornekrosefaktor zwischen den Interventionsgruppen oder im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Im Rahmen einer Ventilator-induzierten Lungenschädigung wurden primär die Interleukine-6 und -8 sowie IL-1 $\beta$  und der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) als die relevanten Zytokine identifiziert [46]. Wir haben uns in diesem Versuch auf die Zytokine Interleukin-6 und den Tumornekrosefaktor- $\alpha$  beschränkt.



Bei Interleukin-6 (IL-6) handelt es sich um schnell produziertes Interleukin, welches im Rahmen von akuten Infektionen oder bei Gewebsschädigung ausgeschüttet wird [97]. IL-6 induziert eine Angiogenese und erhöht die vaskuläre Permeabilität. Außerdem stimuliert es die Transkription weiterer inflammatorischer Zytokine wie dem Tumornekrosefaktor-alpha und IL-1 $\beta$  [97].

Der Tumornekrosefaktor-alpha gehört ebenfalls zu den proinflammatorischen Zytokinen. Ähnlich der Funktion des IL-6 führt der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  zu einer lokalen Vasodilatation mit folgender Ödembildung [121]. Zusätzlich kommt es zu einer Leukozytenadhäsion durch die Exprimierung von entsprechenden Adhäsionsmolekülen [121].

Bei Leukozyten handelt es sich um Zellen des Immunsystems. Diese sog. weißen Blutkörperchen dienen der Abwehr von Infektionen und migrieren im Rahmen von entzündlichen Prozessen früh in inflammatorisch verändertes Gewebe [2]. Es wurde bereits gezeigt, dass eine Beatmung mit hohen Tidalvolumina eine Leukozytenmigration in das Lungengewebe fördert und dass die entstehenden Scherkräfte zu einer Inflammation des Lungengewebes führen [91]. Diese Leukozytenadhäsion findet bereits im frühen Stadium des Biotraumas statt und geht mit einer ödematösen Veränderung sowie mit einer erhöhten Permeabilität des Lungenparenchyms einher [13, 28, 30, 45, 117]. Insbesondere die neutrophilen Leukozyten scheinen einen direkten Effekt auf die Entstehung von Ventilator-induzierten Lungenschäden zu haben [45, 56, 101].

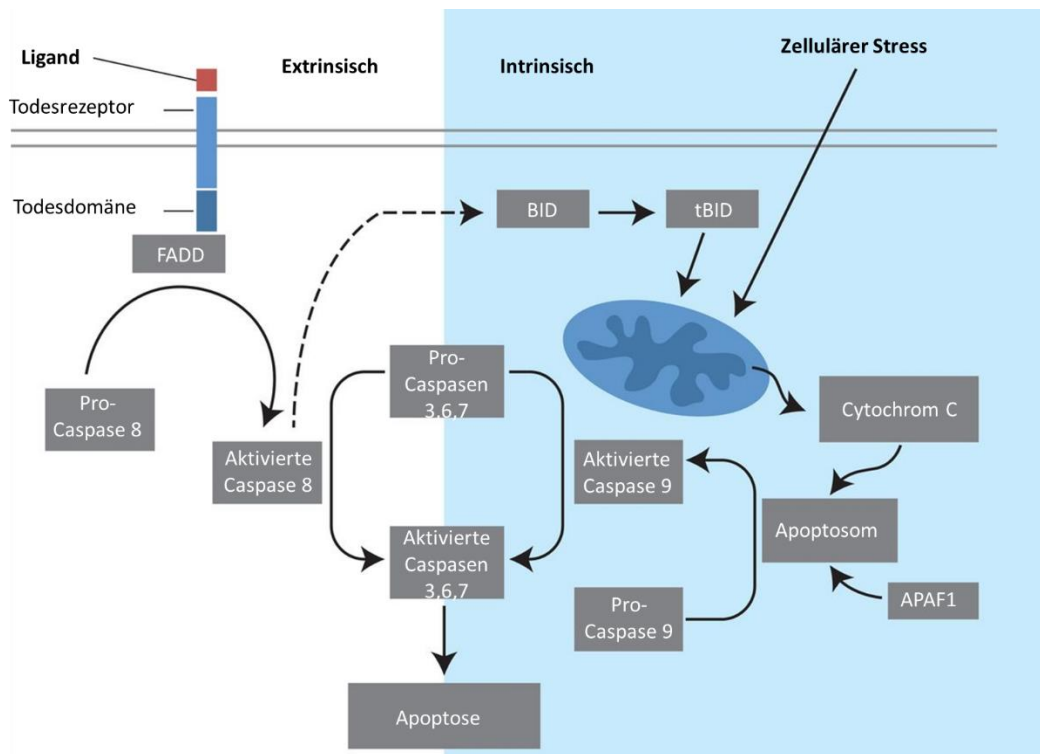
Slutsky et al. fanden heraus, dass durch die erhöhte alveolo-kapilläre Permeabilität diese Entzündungsmediatoren in den systemischen Kreislauf gelangen können, wo diese zu einem Multiorganversagen und schließlich zum Tod führen können [91].

In unserer Studie haben wir nicht zwischen den einzelnen Subtypen der Leukozyten differenziert, sondern lediglich die Anzahl im Blut und in der bronchoalveolären Lavage bestimmt. Der Vergleich der Leukozyten im Vollblut und denen in der bronchoalveolären Lavage sollte eine systemische Inflammation ausschließen. Da die Leukozyten in der Lavage verglichen mit denen im Vollblut erhöht waren, scheinen diese im Rahmen der Lungenschädigung in das pulmonale Gewebe migriert zu sein.

Wie dargestellt gehören die erhobenen inflammatorischen Marker zu den ersten ansteigenden Entzündungsmarkern, welche mit dem Auftreten einer akuten Lungenschädigung im Sinne einer Ventilator-induzierten Lungenschädigung in Einklang zu bringen sind. Dennoch war kein Zusammenhang der erhobenen Marker mit der Dauer der schädigenden Beatmung zu beobachten. Dies kann einerseits durch die mangelnde Spezifität der einzelnen Marker, die natürliche Varianz der Zytokine und Inflammationsmarker oder durch die nur kurzen schädigenden Beatmungsperioden bedingt sein.

## 5.4 Apoptose (Caspase 3)

Die Messung der Caspase 3 bzw. derer Vorstufe, der Procaspase 3, diente der Evaluation stattgehabter Apoptosevorgänge. Wir konnten keine signifikanten Unterschiede, weder zwischen den einzelnen Interventionsgruppen noch im Vergleich zu der Kontrollgruppe feststellen.



**Abbildung 38** Extrinsischer und intrinsischer Weg der Apoptose. Der extrinsische Apoptoseweg wird durch die Bindung eines Liganden an einen Todesrezeptor aktiviert, was wiederum zur Aktivierung von Caspase 8 führt. Die aktive Caspase 8 leitet dann entweder direkt die Apoptose ein, indem sie die Caspasen 3, 6, oder 7 spaltet und dadurch aktiviert, oder sie aktiviert den intrinsischen apoptotischen Weg. Der intrinsische oder mitochondriale Apoptoseweg kann durch verschiedene zelluläre Stressfaktoren aktiviert werden, die zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und zur Bildung des Apoptosoms führen, was zur Aktivierung von Caspase 9 führt. Die aktive Caspase 9 leitet dann die Apoptose ein, indem sie die o. g. Caspasen spaltet und dadurch aktiviert, FADD = Fas-Associated Death Domain Protein, BID = BH3 Interacting Domain Death Agonist, tBID = truncated BID, APAF1 = Apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1, nach [62].

Bei der Apoptose spielen eine Reihe von intrazellulären Prozessen eine Rolle. So kann ein extrinsischer von einem intrinsischen Weg unterschieden werden (vgl. Abb. 38). Der extrinsische Weg wird durch das Binden eines Liganden am sog. Todesrezeptor (engl.: Death receptor) initiiert, wohingegen der intrinsische Weg von der Zelle selbst bei dem Auftreten von zellulärem Stress gestartet wird. Das Binden eines Liganden (z. B. TNF oder andere Zytokine) an einen Todesrezeptor aus der TNF-Rezeptorfamilie führt mittels FAD-Domäne zu der Bindung der Procaspase 8 an eine

Todeseffektordomäne (engl. death effector domain) und formt so einen Signalkomplex (DISC = engl. death including signaling complex) [62].

Dieser DIS-Komplex kann nun entweder direkt die Caspasenkaskade (engl. executioner caspases) aktivieren oder über eine Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges den Zelltod einleiten [62].

Der intrinsische Weg wird auch als der mitochondriale Weg bezeichnet [62]. Hierbei kommt es durch eine tBID-vermittelte Permeabilisierung der Mitochondrien zu einem Austritt von z. B. Cytochrom c [36, 62]. Dieses bildet mit dem apoptotischen Protease-Aktivierungsfaktor-1 (APAF1) einen Komplex, welcher die Procaspase 9 binden und dadurch aktivieren kann. Der entstandene Komplex wird als das Apoptosom bezeichnet [62].

Wenngleich sich die Wege in den verschiedenen Caspasenabfolgen unterscheiden, haben sie eine gemeinsame Endstrecke. So werden als letzter Schritt beider sog. Pathways die Procaspasen 3, 6 und 7 in ihren aktiven Zustand gebracht [62]. Die Apoptose zeigt sich mikroskopisch als ein Schrumpfen der betroffenen Zelle sowie einer Defragmentation des Nukleus [60].

Eine quantitative Auswertung z. B. der aktivierten Caspase 3, insbesondere im Vergleich zu ihrer inaktiven Vorstufe Procaspase 3, könnte so auf die Anzahl der abgelaufenen Zelltode hindeuten.

Die hier dargestellte Apoptose ist jedoch nicht der einzige Mechanismus des Zelluntergangs, welcher bei einer Ventilator-induzierten Lungenschädigung in Betracht kommt. Im Gegensatz zu der Apoptose ist der Zelluntergang im Rahmen der Nekrose unkontrolliert und zeichnet sich durch einen Verlust der Membranintegrität mit Schwellung der Zelle und anschließender Aktivierung des Immunsystems aus [60, 102]. Auch wird die Nekrose nicht mit Caspasen in Verbindung gebracht. Lediglich im Rahmen der Entzündungsreaktion wurden die inflammatorischen Caspasen 1, 4 und 5 nachgewiesen [60]. Die sogenannte Nekroptose bezeichnet eine organisiert ablaufende Nekrose in Folge der Bindung eines Todesliganden (z. B. Fas) an bestimmten Zelltypen, wie den T-Zellen. Bei diesen Zellen liegt eine Inhibition der Caspasen vor und durch die Bindung des Todesliganden kann eine kontrolliert ablaufende Nekrose mit Umgehung der Caspasenkaskade eingeleitet werden [69, 82].

Neben der in der Regel unkontrolliert ablaufenden Nekrose wurde jedoch auch die Pyroptose als Form eines kontrollierten Zelluntergangs beschrieben [25]. Hierbei handelt es sich um einen kontrollierten Zelltod, welcher nicht dem klassischen intrinsischen oder extrinsischen Weg folgt, sondern über eine proinflammatorische Aktivierung der Caspasen 1, 4, 5 und 11 unter Aussparung der Caspasen 3, 8 und 9 abläuft [25, 62]. Die Pyroptose wurde ursprünglich bei einem programmierten Zelltod nach bakteriellen Infektionen beschrieben [25]. Jedoch weisen aktuelle Studien darauf hin, dass die Pyroptose eine wichtige Rolle im Rahmen einer akuten Lungenschädigung (acute lung injury = ALI) spielen könnte [58].

Eine Messung der Caspase 3 bringt weder bei der Nekrose noch bei der Pyroptose verwertbare Ergebnisse, sodass für eine genauere Beurteilung weitere Parameter zur Quantifizierung des Zelluntergangs notwendig sein könnten. Ebenso gilt der Western Blot als semiquantitatives Verfahren, sodass keine sichere Aussage bezüglich der Quantität des Apoptoseparameters Caspase 3 getroffen werden kann [48].

Als weiterer möglicher Störfaktor muss beachtet werden, dass nach der Beatmung mit hohen Tidalvolumina erneut auf eine lungenprotektive Beatmungsform umgestellt wurde. Diese wurde bei allen Gruppen für sechs Stunden fortgeführt, sodass ein möglicher Gruppenunterschied am ehesten unmittelbar vor dieser Beatmungsumstellung zu erkennen gewesen wäre.

Wenngleich die Messung des Verhältnisses von Caspase 3 zu Procaspase 3 eine potenzielle Möglichkeit zur ansatzweisen Quantifizierung der ablaufenden Apoptosen bietet, eignet sich dieses Verfahren nicht, um sämtliche Zelluntergänge, welche im Rahmen einer Ventilation entstehen können, abzubilden.

## 5.5 Histologie

Im Rahmen der histologischen Begutachtung wurden repräsentative Bilder der Lungen hinsichtlich mikroskopisch sichtbarer Schäden untersucht. Im Verlauf der Auswertung zeigten sich keine ersichtlichen Zusammenhänge zwischen histologisch erkennbarer Schädigung und Dauer der lungenschädigenden Beatmung, sodass keine weitere Auswertung erfolgte.

Zur histologischen Beurteilung einer pulmonalen Schädigung haben sich folgende Kriterien etabliert: Alveoläre Stauung, Hämorrhagien, Infiltration von Leukozyten und die Dicke der alveolären Wände [50, 70].

In einer vorherigen Studie wurden signifikante histologische Unterschiede zwischen einer Kontrollgruppe und mehreren Interventionsgruppen mit unterschiedlich hohen Tidalvolumina (16 und 20 ml\*kgKG<sup>-1</sup>) festgestellt [68]. Hierbei wurde der Anteil der alveolären Fläche als Parameter einer histologischen Lungenschädigung gewertet. Diese Ergebnisse konnten wir in diesem Versuch nicht reproduzieren.

Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die lungenschädigende Beatmung der Versuchstiere in der Vorstudie bis zum Versuchsende durchgeführt wurde und keine Reduzierung des Tidalvolumens wie in dieser Studie erfolgte [68].

## 5.6 Vitalparameter und Blutgase

Die Beurteilung der arteriellen Blutgase und der Vitalparameter diente einerseits dem hämodynamischen Monitoring während des Versuchs, andererseits wurde über den gesamten Versuchszeitraum die Vermeidung einer Hyper- bzw. einer Hypoventilation angestrebt.

Die Vitalparameter blieben über den gesamten Versuchszeitraum stabil. Es kam lediglich zu einem konstanten Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP), jedoch ohne relevante Hypotonien. Bei einer Abweichung des  $p\text{CO}_2 < 28 \text{ mmHg}$  bzw.  $> 45 \text{ mmHg}$  erfolgte die Adaptation der Beatmungsfrequenz, um eine Normokapnie herzustellen und eine mögliche Alkalose oder Azidose zu verhindern.

Wie bereits dargestellt können viele verschiedene Ursachen zu einer vermehrten Abatmung von Pentanal führen (vgl. Kapitel 5.2.1). Das erfolgreiche Aufrechterhalten einer Homöostase könnte somit etwaigen Störfaktoren vorgebeugt haben.

Ebenfalls wurden die Druck- und Flusskurven der Beatmung kontinuierlich überwacht und bei Atemanstrengungen durch das Versuchstier mittels Relaxation interveniert. Es konnte gezeigt werden, dass es durch die Reizung des Diaphragmas bei der mechanischen Ventilation zu einem Anstieg von ROS und damit unter Umständen auch zu einem Anstieg von Pentanal kommen könnte [92]. Ein zusätzlicher Stress von Atemexkursionen des Tieres gegen den Widerstand der Ventilation wurde somit verhindert.

Wenngleich es verschiedene Gründe zur Etablierung eines invasiven hämodynamischen Monitorings und der regelmäßigen Blutentnahme zur Messung der Blutgase gegeben hat, ist der wichtigste Grund jedoch das Sicherstellen der Vitalfunktion und das Beibehalten der körpereigenen Homöostase.

## 5.7 Schlussfolgerung

In unserer vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass sowohl der Beginn einer potenziell schädigenden, als auch der Beginn einer lungenprotektiven Beatmungsepisode durch den Verlauf des abgeatmeten Pentanals abgebildet werden. Wenngleich anscheinend keine Korrelation zwischen dem abgeatmeten Pentanal und systemischen Pentanal besteht, untermauert dennoch das schnelle Ansprechen der abgeatmeten Pentanalkonzentration auf eine Beatmungsumstellung die Tauglichkeit als Biomarker zur Detektion eines potenziellen Volutraumas. Zu beachten ist jedoch, dass der gemessene Pentanalwert selbst bei genetisch identischen Tieren einer gewissen Streuung unterliegt und demnach nicht zur Quantifizierung des Grades einer Ventilator-induzierten Lungenschädigung geeignet ist. Diese Theorie wird durch die molekularchemischen Untersuchungen gestützt, da sich

keine gruppenspezifischen signifikanten Unterschiede zwischen den Markern von Apoptose und Inflammation oder im histologischen Schnittbild zeigten. Selbst wenn sich Pentanal nicht zur Quantifizierung eines Ventilator-induzierten Lungenschadens eignet, so könnte ein kontinuierliches Monitoring, welches die Beobachtung der abgeatmeten Pentanalwerte über die Zeit hinweg darstellt, hinsichtlich einer Beatmungsoptimierung zielführend sein. Ob sich das Pentanal auch beim Menschen als Biomarker einer Ventilator-induzierten Lungenschädigung eignet, muss noch erforscht werden.

## Literaturnachweis/Quellen

1. Acute Respiratory Distress Syndrome Network, Brower RG, Matthay MA et al (2000) Ventilation with Lower Tidal Volumes as Compared with Traditional Tidal Volumes for Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med* 342:1301–1308. <https://doi.org/10.1056/NEJM200005043421801>
2. Afshar-Kharghan V, Thiagarajan P (2006) Leukocyte adhesion and thrombosis. *Curr Opin Hematol* 13:34–39. <https://doi.org/10.1097/01.moh.0000190107.54790.de>
3. Amato MBP, Barbas CSV, Medeiros DM et al (1998) Effect of a Protective-Ventilation Strategy on Mortality in the Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med* 338:347–354. <https://doi.org/10.1056/NEJM199802053380602>
4. Aoyama H, Yamada Y, Fan E (2018) The future of driving pressure: a primary goal for mechanical ventilation? *J Intensive Care* 6:64. <https://doi.org/10.1186/s40560-018-0334-4>
5. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S (2014) Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014:1–31. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
6. Bals R, Vogelmeier Claus Franz (2006) Klinische Pathophysiologie. *Klin Pathophysiol*. <https://doi.org/10.1055/b-004-134448>
7. Bauer I, Wanner GA, Rensing H et al (1998) Expression pattern of heme oxygenase isoenzymes 1 and 2 in normal and stress-exposed rat liver. *Hepatology* 27:829–838. <https://doi.org/10.1002/hep.510270327>
8. Baumbach JI (2009) Ion mobility spectrometry coupled with multi-capillary columns for metabolic profiling of human breath. *J Breath Res* 3:034001. <https://doi.org/10.1088/1752-7155/3/3/034001>
9. BECKMAN KB, AMES BN (1998) The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiol Rev* 78:547–581. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.2.547>
10. Beitler JR, Malhotra A, Taylor Thompson B (1744) XI. Observations on a case published in the last volume of the medical essays, &c. of recovering a man dead in appearance, by distending the lungs with air. Printed at Edinburgh, 1744; by John Fothergill, Licent. Coll. Med. Lond. *Philos Trans R Soc London* 43:275–281. <https://doi.org/10.1098/rstl.1744.0061>
11. Beitler JR, Malhotra A, Thompson BT (2016) Ventilator-induced Lung Injury. *Clin Chest Med*

- 37:633–646. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2016.07.004>
12. Bellani G, Laffey JG, Pham T et al (2016) Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries. *JAMA* 315:788. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0291>
  13. Belperio J, Keane M, Lynch J, Strieter R (2006) The Role of Cytokines during the Pathogenesis of Ventilator-Associated and Ventilator-Induced Lung Injury. *Semin Respir Crit Care Med* 27:350–364. <https://doi.org/10.1055/s-2006-948289>
  14. Bilek AM, Dee KC, Gaver DP (2003) Mechanisms of surface-tension-induced epithelial cell damage in a model of pulmonary airway reopening. *J Appl Physiol* 94:770–783. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00764.2002>
  15. Blankman P, Hasan D, Bikker IG, Gommers D (2016) Lung stress and strain calculations in mechanically ventilated patients in the intensive care unit. *Acta Anaesthesiol Scand* 60:69–78. <https://doi.org/10.1111/aas.12589>
  16. Bradford M (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72:248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
  17. Brieger K, Schiavone S, Miller J, Krause K (2012) Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly*. <https://doi.org/10.4414/smw.2012.13659>
  18. Brower RG, Morris A, MacIntyre N et al (2003) Effects of recruitment maneuvers in patients with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome ventilated with high positive end-expiratory pressure\*. *Crit Care Med* 31:2592–2597. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000090001.91640.45>
  19. Brun-Buisson C, Minelli C, Bertolini G et al (2004) Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. *Intensive Care Med* 30:51–61. <https://doi.org/10.1007/s00134-003-2022-6>
  20. Cao W, Duan Y (2007) Current Status of Methods and Techniques for Breath Analysis. *Crit Rev Anal Chem* 37:3–13. <https://doi.org/10.1080/10408340600976499>
  21. Cercos-Pita J-L, Fardin L, Leclerc H et al (2022) Lung tissue biomechanics imaged with synchrotron phase contrast microtomography in live rats. *Sci Rep* 12:5056. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09052-9>
  22. Chang H-C, Ho C-H, Kung S-C et al (2021) Maintenance of low driving pressure in patients with



- early acute respiratory distress syndrome significantly affects outcomes. *Respir Res* 22:313. <https://doi.org/10.1186/s12931-021-01912-8>
23. Chen L, Xia H-F, Shang Y, Yao S-L (2018) Molecular Mechanisms of Ventilator-Induced Lung Injury. *Chin Med J (Engl)* 131:1225–1231. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.226840>
  24. Cohen TS, Cavanaugh KJ, Margulies SS (2008) Frequency and peak stretch magnitude affect alveolar epithelial permeability. *Eur Respir J* 32:854–861. <https://doi.org/10.1183/09031936.00141007>
  25. Cookson BT, Brennan MA (2001) Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol* 9:113–114. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01936-3](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01936-3)
  26. Cumeras R, Figueras E, Davis CE et al (2015) Review on Ion Mobility Spectrometry. Part 1: current instrumentation. *Analyst* 140:1376–1390. <https://doi.org/10.1039/C4AN01100G>
  27. Cumeras R, Figueras E, Davis CE et al (2015) Review on Ion Mobility Spectrometry. Part 2: hyphenated methods and effects of experimental parameters. *Analyst* 140:1391–1410. <https://doi.org/10.1039/C4AN01101E>
  28. Curley GF, Laffey JG, Zhang H, Slutsky AS (2016) Biotrauma and Ventilator-Induced Lung Injury. *Chest* 150:1109–1117. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.07.019>
  29. D’Autréaux B, Toledano MB (2007) ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:813–824. <https://doi.org/10.1038/nrm2256>
  30. DREYFUSS D, SAUMON G (1998) Ventilator-induced Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med* 157:294–323. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.157.1.9604014>
  31. Dreyfuss D, Soler P, Basset G, Saumon G (1988) High Inflation Pressure Pulmonary Edema: Respective Effects of High Airway Pressure, High Tidal Volume, and Positive End-expiratory Pressure. *Am Rev Respir Dis* 137:1159–1164. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/137.5.1159>
  32. Eiceman GA, Snyder AP, Blyth DA (1990) Monitoring of Airborne Organic Vapors Using Ion Mobility Spectrometry. *Int J Environ Anal Chem* 38:415–425. <https://doi.org/10.1080/03067319008026945>
  33. Faller S, Ryter SW, Choi AMK et al (2010) Inhaled Hydrogen Sulfide Protects against Ventilator-induced Lung Injury. *Anesthesiology* 113:104–115. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3181de7107>
  34. Finfer S, Rocker G (1996) Alveolar Overdistension is an Important Mechanism of Persistent

- Lung Damage following Severe Protracted ARDS. *Anaesth Intensive Care* 24:569–573.  
<https://doi.org/10.1177/0310057X9602400511>
35. Fink T, Baumbach JJ, Kreuer S (2014) Ion mobility spectrometry in breath research. *J Breath Res* 8:027104. <https://doi.org/10.1088/1752-7155/8/2/027104>
  36. Flores-Romero H, Hohorst L, John M et al (2022) BCL-2-family protein tBID can act as a BAX-like effector of apoptosis. *EMBO J*. <https://doi.org/10.15252/embj.2021108690>
  37. Fuchs P, Loeseken C, Schubert JK, Miekisch W (2009) Breath gas aldehydes as biomarkers of lung cancer. *Int J Cancer* 126:NA-NA. <https://doi.org/10.1002/ijc.24970>
  38. Gaschler MM, Stockwell BR (2017) Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 482:419–425. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>
  39. Gattinoni L, Carlesso E, Caironi P (2012) Stress and strain within the lung. *Curr Opin Crit Care* 18:42–47. <https://doi.org/10.1097/MCC.0b013e32834f17d9>
  40. Gattinoni L, Marini JJ, Collino F et al (2017) The future of mechanical ventilation: lessons from the present and the past. *Crit Care* 21:183. <https://doi.org/10.1186/s13054-017-1750-x>
  41. Gattinoni L, Marini JJ, Pesenti A et al (2016) The „baby lung“ became an adult. *Intensive Care Med* 42:663–673. <https://doi.org/10.1007/s00134-015-4200-8>
  42. Gattinoni L, Protti A, Caironi P, Carlesso E (2010) Ventilator-induced lung injury: The anatomical and physiological framework. *Crit Care Med* 38:S539–S548.  
<https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181f1fcf7>
  43. Gatto L a, Fluck RR (2004) Alveolar mechanics in the acutely injured lung: role of alveolar instability in the pathogenesis of ventilator-induced lung injury. *Respir Care* 49:1045–55
  44. Giustarini D, Dalle-Donne I, Tsikas D, Rossi R (2009) Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci* 46:241–281.  
<https://doi.org/10.3109/10408360903142326>
  45. Grommes J, Soehnlein O (2011) Contribution of Neutrophils to Acute Lung Injury. *Mol Med* 17:293–307. <https://doi.org/10.2119/molmed.2010.00138>
  46. Halbertsma FJJ, Vaneker M, Scheffer GJ, van der Hoeven JG (2005) Cytokines and biotrauma in ventilator-induced lung injury: a critical review of the literature. *Neth J Med* 63:382–92
  47. Harman D (1956) Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *J Gerontol* 11:298–300. <https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298>

48. Hnasko TS, Hnasko RM (2015) *The Western Blot*. Humana Press, New York, NY, S 87–96
49. Hoegl S, Boost KA, Czerwonka H et al (2009) Inhaled IL-10 reduces biotrauma and mortality in a model of ventilator-induced lung injury. *Respir Med* 103:463–470.  
<https://doi.org/10.1016/j.rmed.2008.09.020>
50. Imanaka H, Shimaoka M, Matsuura N et al (2001) Ventilator-Induced Lung Injury Is Associated with Neutrophil Infiltration, Macrophage Activation, and TGF- $\beta$ 1 mRNA Upregulation in Rat Lungs. *Anesth Analg* 92:428–436. <https://doi.org/10.1213/00000539-200102000-00029>
51. Jaswal DS, Leung JM, Sun J et al (2014) Tidal Volume and Plateau Pressure Use for Acute Lung Injury From 2000 to Present. *Crit Care Med* 42:2278–2289.  
<https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000504>
52. Kumar S, Huang J, Abbassi-Ghadi N et al (2015) Mass Spectrometric Analysis of Exhaled Breath for the Identification of Volatile Organic Compound Biomarkers in Esophageal and Gastric Adenocarcinoma. *Ann Surg* 262:981–990. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000001101>
53. Lachmann B (1992) Open up the lung and keep the lung open. *Intensive Care Med* 18:319–321. <https://doi.org/10.1007/BF01694358>
54. LAEMMLI UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
55. Lang H (2016) Messwerte der Beatmung. In: *Beatmung für Einsteiger*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 185–188
56. Liao X, Zhang W, Dai H et al (2021) Neutrophil-Derived IL-17 Promotes Ventilator-Induced Lung Injury via p38 MAPK/MCP-1 Pathway Activation. *Front Immunol*.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.768813>
57. Lichtenstern C, Hofer S, Möllers A et al (2011) Lipid Peroxidation in Acute Respiratory Distress Syndrome and Liver Failure. *J Surg Res* 168:243–252.  
<https://doi.org/10.1016/j.jss.2009.10.028>
58. Liu B, He R, Zhang L et al (2021) Inflammatory Caspases Drive Pyroptosis in Acute Lung Injury. *Front Pharmacol*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.631256>
59. Marini JJ (1996) EVOLVING CONCEPTS IN THE VENTILATORY MANAGEMENT OF ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME. *Clin Chest Med* 17:555–575.  
[https://doi.org/10.1016/S0272-5231\(05\)70331-2](https://doi.org/10.1016/S0272-5231(05)70331-2)
60. Martin SJ, Henry CM (2013) Distinguishing between apoptosis, necrosis, necroptosis and other

- cell death modalities. *Methods* 61:87–89. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.06.001>
61. Maurer F, Lorenz DJ, Pielsticker G et al (2017) Adherence of volatile propofol to various types of plastic tubing. *J Breath Res* 11:016009. <https://doi.org/10.1088/1752-7163/aa567e>
  62. McIlwain DR, Berger T, Mak TW (2013) Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5:a008656–a008656. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008656>
  63. Mead J, Takishima T, Leith D (1970) Stress distribution in lungs: a model of pulmonary elasticity. *J Appl Physiol* 28:596–608. <https://doi.org/10.1152/jappl.1970.28.5.596>
  64. Mladek C, Kromidas S HPLC für Neueinsteiger. <https://www.kromidas.de/Uploads/Dokumente/HPLCfuerNeueinsteiger.pdf>
  65. Mochalski P, Al-Zoairy R, Niederwanger A et al (2014) Quantitative analysis of volatile organic compounds released and consumed by rat L6 skeletal muscle cells in vitro. *J Breath Res* 8:046003. <https://doi.org/10.1088/1752-7155/8/4/046003>
  66. Moldovan L, Moldovan NI (2004) Oxygen free radicals and redox biology of organelles. *Histochem Cell Biol* 122:395–412. <https://doi.org/10.1007/s00418-004-0676-y>
  67. Müller-Wirtz LM, Kiefer D, Knauf J et al (2021) Differential Response of Pentanal and Hexanal Exhalation to Supplemental Oxygen and Mechanical Ventilation in Rats. *Molecules* 26:2752. <https://doi.org/10.3390/molecules26092752>
  68. Müller-Wirtz LM, Kiefer D, Maurer F et al (2021) Volutrauma Increases Exhaled Pentanal in Rats: A Potential Breath Biomarker for Ventilator-Induced Lung Injury. *Anesth Analg* 133:263–273. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000005576>
  69. Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N (2013) Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1833:3448–3459. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.001>
  70. Nishina K, Mikawa K, Takao Y et al (1998) Intravenous Lidocaine Attenuates Acute Lung Injury Induced by Hydrochloric Acid Aspiration in Rabbits. *Anesthesiology* 88:1300–1309. <https://doi.org/10.1097/0000542-199805000-00022>
  71. Obermeier J, Trefz P, Happ J et al (2017) Exhaled volatile substances mirror clinical conditions in pediatric chronic kidney disease. *PLoS One* 12:e0178745. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178745>
  72. Oczenski W (2017) Atmen - Atemhilfen. *Atmen - Atemhilfen*. <https://doi.org/10.1055/b-004-140689>

73. Parinandi NL, Kleinberg MA, Usatyuk P V. et al (2003) Hyperoxia-induced NAD(P)H oxidase activation and regulation by MAP kinases in human lung endothelial cells. *Am J Physiol Cell Mol Physiol* 284:L26–L38. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00123.2002>
74. PARKER JC, HERNANDEZ LA, PEEVY KJ (1993) Mechanisms of ventilator-induced lung injury. *Crit Care Med* 21:131–143. <https://doi.org/10.1097/00003246-199301000-00024>
75. Pelosi P, Rocco PRM, Gama de Abreu M (2018) Close down the lungs and keep them resting to minimize ventilator-induced lung injury. *Crit Care* 22:72. <https://doi.org/10.1186/s13054-018-1991-3>
76. Peng L, Hua L, Li E et al (2015) Dopant titrating ion mobility spectrometry for trace exhaled nitric oxide detection. *J Breath Res* 9:016003. <https://doi.org/10.1088/1752-7155/9/1/016003>
77. Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT et al (2012) Acute Respiratory Distress Syndrome. *JAMA* 307:2526–2533. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.5669>
78. Reinheckel T, Noack H, Lorenz S et al (1998) Comparison of protein oxidation and aldehyde formation during oxidative stress in isolated mitochondria. *Free Radic Res* 29:297–305. <https://doi.org/10.1080/10715769800300331>
79. Reis A, Spickett CM (2012) Chemistry of phospholipid oxidation. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1818:2374–2387. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.02.002>
80. Robertson TE (2016) Ventilator Management. *Adv Surg* 50:173–186. <https://doi.org/10.1016/j.yasu.2016.03.013>
81. Roche-Campo F, Aguirre-Bermeo H, Mancebo J (2011) Prone positioning in acute respiratory distress syndrome (ARDS): When and how? *Presse Med* 40:e585–e594. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2011.03.019>
82. Scheller C, Knöferle J, Ullrich A et al (2006) Caspase inhibition in apoptotic T cells triggers necrotic cell death depending on the cell type and the proapoptotic stimulus. *J Cell Biochem* 97:1350–1361. <https://doi.org/10.1002/jcb.20670>
83. Scholten EL, Beitler JR, Prisk GK, Malhotra A (2017) Treatment of ARDS With Prone Positioning. *Chest* 151:215–224. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.06.032>
84. Schwarz S (2018) *Lungenfunktionsdiagnostik und Spiroergometrie*, 1. Auflage. Georg Thieme Verlag
85. Schwingshackl A (2016) The role of stretch-activated ion channels in acute respiratory distress syndrome: finally a new target? *Am J Physiol Cell Mol Physiol* 311:L639–L652.

- <https://doi.org/10.1152/ajplung.00458.2015>
86. Shestivska V, Olšinová M, Sovová K et al (2018) Evaluation of lipid peroxidation by the analysis of volatile aldehydes in the headspace of synthetic membranes using selected ion flow tube mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 32:1617–1628.  
<https://doi.org/10.1002/rcm.8212>
  87. Shvartsburg AA, Smith RD (2008) Fundamentals of Traveling Wave Ion Mobility Spectrometry. *Anal Chem* 80:9689–9699. <https://doi.org/10.1021/ac8016295>
  88. Silva PL, Negrini D, Macêdo Rocco PR (2015) Mechanisms of ventilator-induced lung injury in healthy lungs. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 29:301–313.  
<https://doi.org/10.1016/j.bpa.2015.08.004>
  89. Slutsky AS (1993) Mechanical Ventilation. *Chest* 104:1833–1859.  
<https://doi.org/10.1378/chest.104.6.1833>
  90. Slutsky AS (2005) Ventilator-induced lung injury: from barotrauma to biotrauma. *Respir Care* 50:646–59
  91. Slutsky AS, Ranieri VM (2013) Ventilator-Induced Lung Injury. *N Engl J Med* 369:2126–2136.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMra1208707>
  92. Smuder AJ, Sollanek KJ, Nelson WB et al (2018) Crosstalk between autophagy and oxidative stress regulates proteolysis in the diaphragm during mechanical ventilation. *Free Radic Biol Med* 115:179–190. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.11.025>
  93. Störmann P, Lustenberger T, Relja B et al (2017) Role of biomarkers in acute traumatic lung injury. *Injury* 48:2400–2406. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2017.08.041>
  94. Striebel HW (2020) Anästhesie Intensivmedizin Notfallmedizin. *Anästhesie Intensivmed Notfallmedizin*. <https://doi.org/10.1055/b000000059>
  95. Sun Z-T, Yang C-Y, Miao L-J et al (2015) Effects of mechanical ventilation with different tidal volume on oxidative stress and antioxidant in lung. *J Anesth* 29:346–351.  
<https://doi.org/10.1007/s00540-014-1954-z>
  96. Takahashi K, Saha D, Shattino I et al (2011) Complement 3 is involved with ventilator-induced lung injury. *Int Immunopharmacol* 11:2138–2143.  
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.09.008>
  97. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T (2014) IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6:a016295–a016295. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>

98. Taskar V, John J, Evander E et al (1997) Surfactant dysfunction makes lungs vulnerable to repetitive collapse and reexpansion. *Am J Respir Crit Care Med* 155:313–320.  
<https://doi.org/10.1164/ajrccm.155.1.9001330>
99. Trefz P, Obermeier J, Lehbrink R et al (2019) Exhaled volatile substances in children suffering from type 1 diabetes mellitus: results from a cross-sectional study. *Sci Rep* 9:15707.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-52165-x>
100. Tremblay L, Valenza F, Ribeiro SP et al (1997) Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model. *J Clin Invest* 99:944–952.  
<https://doi.org/10.1172/JCI119259>
101. Tremblay LN, Slutsky AS (2006) Ventilator-induced lung injury: from the bench to the bedside. *Intensive Care Med* 32:24–33. <https://doi.org/10.1007/s00134-005-2817-8>
102. Trump BE, Berezesky IK, Chang SH, Phelps PC (1997) The Pathways of Cell Death: Oncosis, Apoptosis, and Necrosis. *Toxicol Pathol* 25:82–88.  
<https://doi.org/10.1177/019262339702500116>
103. Umbrello M, Marino A, Chiumello D (2017) Tidal volume in acute respiratory distress syndrome: how best to select it. *Ann Transl Med* 5:287–287.  
<https://doi.org/10.21037/atm.2017.06.51>
104. Vasques F, Duscio E, Pasticci I et al (2018) Is the mechanical power the final word on ventilator-induced lung injury?—we are not sure. *Ann Transl Med* 6:395–395.  
<https://doi.org/10.21037/atm.2018.08.17>
105. Vautz W, Nolte J, Fobbe R, Baumbach JI (2009) Breath analysis—performance and potential of ion mobility spectrometry. *J Breath Res* 3:036004. <https://doi.org/10.1088/1752-7155/3/3/036004>
106. Villar J, Blanco J, Kacmarek RM (2016) Current incidence and outcome of the acute respiratory distress syndrome. *Curr Opin Crit Care* 22:1–6.  
<https://doi.org/10.1097/MCC.0000000000000266>
107. Vlahakis NE, Schroeder MA, Pagano RE, Hubmayr RD (2002) Role of Deformation-induced Lipid Trafficking in the Prevention of Plasma Membrane Stress Failure. *Am J Respir Crit Care Med* 166:1282–1289. <https://doi.org/10.1164/rccm.200203-207OC>
108. Walter JM, Corbridge TC, Singer BD (2018) Invasive Mechanical Ventilation. *South Med J* 111:746–753. <https://doi.org/10.14423/SMJ.0000000000000905>

109. Wang W-F, Liu S, Xu B, Wang W (2017) A study of the protective effect and mechanism of ketamine on acute lung injury induced by mechanical ventilation. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 21:1362–1367
110. Wanger J, Clausen JL, Coates A et al (2005) Standardisation of the measurement of lung volumes. *Eur Respir J* 26:511–522. <https://doi.org/10.1183/09031936.05.00035005>
111. Webb HH, Tierney DF (1974) Experimental pulmonary edema due to intermittent positive pressure ventilation with high inflation pressures. Protection by positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis* 110:556–65. <https://doi.org/10.1164/arrd.1974.110.5.556>
112. Weiser TG, Regenbogen SE, Thompson KD et al (2008) An estimation of the global volume of surgery: a modelling strategy based on available data. *Lancet* 372:139–144. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60878-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60878-8)
113. Wellman TJ, Winkler T, Costa EL V. et al (2014) Effect of Local Tidal Lung Strain on Inflammation in Normal and Lipopolysaccharide-Exposed Sheep\*. *Crit Care Med* 42:e491–e500. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000346>
114. Wilson HKB analysis: P basis and sampling techniques on J (1986) *Breath Analysis: Physiological Basis and Sampling Techniques*. *Scand J Work Environ Heal* 12, no 3:174–192
115. Wirtz LM, Kreuer S, Volk T, Hüppe T (2019) Moderne Atemgasanalysen. *Medizinische Klin - Intensivmed und Notfallmedizin* 114:655–660. <https://doi.org/10.1007/s00063-019-0544-0>
116. Wolf A, Baumbach JI, Kleber A et al (2014) Multi-capillary column-ion mobility spectrometer (MCC-IMS) breath analysis in ventilated rats: a model with the feasibility of long-term measurements. *J Breath Res* 8:016006. <https://doi.org/10.1088/1752-7155/8/1/016006>
117. Woo SW, Hedley-Whyte J (1972) Macrophage accumulation and pulmonary edema due to thoracotomy and lung over inflation. *J Appl Physiol* 33:14–21. <https://doi.org/10.1152/jappl.1972.33.1.14>
118. Yang B, Chen Y, Shi J (2019) Reactive Oxygen Species (ROS)-Based Nanomedicine. *Chem Rev* 119:4881–4985. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00626>
119. YOSHINO K, SANO M, FUJITA M, TOMITA I (1991) Production of Aliphatic Aldehydes on Peroxidation of Various Types of Lipids. *Chem Pharm Bull* 39:1788–1791. <https://doi.org/10.1248/cpb.39.1788>
120. Yumoto M, Nishida O, Nakamura F, Katsuya H (2005) Propofol attenuates oxidant-induced acute lung injury in an isolated perfused rabbit-lung model. *J Anesth* 19:287–294.



<https://doi.org/10.1007/s00540-005-0338-9>

121. Zelová H, Hošek J (2013) TNF- $\alpha$  signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflamm Res* 62:641–651. <https://doi.org/10.1007/s00011-013-0633-0>
122. Zielinski ZAM, Pratt DA (2017) Lipid Peroxidation: Kinetics, Mechanisms, and Products. *J Org Chem* 82:2817–2825. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b00152>

Tag der Promotion:	21.08.2023
Dekan:	Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger
Berichterstatter:	Prof. Dr. Tobias Fink Prof. Dr. Dr. Robert Bals