

Aus der Klinik für Anästhesiologie  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Proinflammatorische Effekte intrabronchial applizierter extrazellulärer Histone im Vergleich  
mit Lipopolysaccharid im Großtiermodell

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Elisabeth Schmidt geb. Britten  
aus Trier

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. U. Förstermann

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 15. April 2025

**Meiner Familie**

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	III
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VII
1 Einleitung und Zielsetzung .....	1
2 Literaturdiskussion.....	3
2.1 Das akute Atemnotsyndrom .....	3
2.2 Die Rolle extrazellulärer Histone im alveolären Entzündungsprozess.....	5
2.3 Die lungenschädigende Wirkung von Lipopolysaccharid .....	8
2.4 Tiermodelle in der Forschung und das Lungenschadensmodell.....	10
2.5 Die histologischen Scoringssysteme der Lunge .....	11
3 Material und Methodik .....	15
3.1 Material .....	15
3.1.1 Geräte .....	15
3.1.2 Medikamente .....	16
3.1.3 Verbrauchsmaterial .....	17
3.1.4 Software.....	18
3.2 Methodik .....	19
3.2.1 Versuchsprotokoll mit Gruppeneinteilung .....	19
3.2.2 Vorbereitung der Tiere mit Instrumentierung .....	20
3.2.3 Erhobene Parameter und deren Messzeitpunkte .....	22
3.2.4 Intrabronchiale Applikation .....	24
3.2.5 Überwachung der Schweine und Versuchsbeendigung.....	24
3.2.6 Organentnahme und Aufbereitung der Lungenschnitte.....	24
3.2.7 Histopathologische Auswertung .....	26
3.2.8 Molekularbiologische Analyse .....	29
3.2.9 Statistik .....	29
4 Ergebnisse.....	31
4.1 Histologische Auswertung.....	31
4.1.1 Der Lungenschaden im Überblick.....	31
4.1.2 Der Lungenschaden in einzelnen Parametern .....	32
4.1.3 Der Lungenschaden nach Ober- und Unterlappen.....	34
4.1.4 Der Lungenschaden- ventral und dorsal.....	36
4.2 Molekularbiologische Analyse von TNF- $\alpha$ und IL-6.....	37
4.3 Kreislauf- und Beatmungsparameter .....	38
4.3.1 Herzfrequenz .....	38

4.3.2	Mittlerer arterieller Druck .....	39
4.3.3	Pulmonalarteriendruck.....	41
4.3.4	Zentralvenöser Druck .....	42
4.3.5	Herzindex (CI).....	43
4.3.6	Funktionelle Residualkapazität .....	44
4.3.7	Inspiratorischer Spitzendruck (Ppeak) .....	45
4.3.8	Horovitz-Quotient.....	46
4.3.9	Arterieller Kohlendioxidpartialdruck (PaCO <sub>2</sub> ) .....	47
5	Diskussion .....	48
5.1	Diskussion der Methodik .....	48
5.1.1	Studienmodell.....	48
5.1.2	Limitationen der Studie.....	49
5.2	Diskussion der Ergebnisse.....	53
5.2.1	Histologie .....	53
5.2.2	Molekularbiologie.....	55
5.2.3	Kreislauf- und Beatmungsparameter .....	56
6	Zusammenfassung und Ausblick .....	59
7	Literaturverzeichnis .....	61
8	Anhang.....	66
8.1	Protokoll zur Paraffineinbettung .....	66
8.2	Protokoll zur H.E.-Färbung.....	67
8.3	Protokoll, Programm und Primer zum Zielgenachweis.....	68
9	Danksagung.....	70
10	Tabellarischer Lebenslauf .....	71

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird auf die gleichzeitige Verwendung der Sprachformen männlich, weiblich und divers (m/w/d) verzichtet, somit gelten sämtliche Personenbezeichnungen gleichermaßen für alle Geschlechter.

## Abkürzungsverzeichnis

AJ.....	<i>Adherens Junctions</i>
AMPs.....	<i>Antimikrobielle Peptide</i>
ANOVA.....	<i>Analysis of Variance, Varianzanalyse</i>
ARDS.....	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome, Akutes Atemnotsyndrom</i>
ATI.....	<i>Alveolarepithelzelle Typ I</i>
ATII.....	<i>Alveolarepithelzelle Typ II</i>
AZV.....	<i>Atemzugvolumen</i>
BGA.....	<i>Blutgasanalyse</i>
BLH.....	<i>Baseline Healthy</i>
BZ.....	<i>Blutzucker</i>
CD14.....	<i>Cluster of differentiation 14</i>
cDNA.....	<i>Complementary DNA</i>
CI.....	<i>Kardialer Index</i>
CO <sub>2</sub> .....	<i>Kohlendioxid-Wert</i>
COVID-19.....	<i>Coronavirus Disease 2019</i>
DAD.....	<i>Diffuse alveolar Damage</i>
DAMPs.....	<i>Danger associated molecular Patterns</i>
ECMO.....	<i>Extrakorporale Membranoxygenierung</i>
EKG.....	<i>Elektrokardiogramm</i>
etCO <sub>2</sub> .....	<i>Endexpiratorischer Kohlendioxid-Wert</i>
ETs.....	<i>Extracelluläre Traps</i>
F <sub>i</sub> O <sub>2</sub> .....	<i>inspiratorische Sauerstoffkonzentration, inspiratorische Sauerstoffkonzentration</i>
Fr.....	<i>French, Maß für den Außendurchmesser von Kanülen und Kathetern</i>
FRC.....	<i>Funktionelle Residualkapazität</i>
H.E.-Färbung.....	<i>Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>
HF.....	<i>Herzfrequenz</i>
HMEC.....	<i>Menschliche mikrovaskuläre Endothelzellen</i>
HPAECs.....	<i>Human Pulmonary Artery Endothelial Cells</i>

HZV.....	<i>Herzzeitvolumen</i>
I:E-Verhältnis.....	<i>Inspiration-zu-Expiration-Zeit</i>
IL-6.....	<i>Interleukin-6</i>
LBP.....	<i>LPS-Bindungsprotein</i>
LDS.....	<i>Lobe Damage Score</i>
LIS.....	<i>Lung injury Score</i>
LPS.....	<i>Lipopolysaccharid</i>
MAD.....	<i>Mittlerer arterieller Druck</i>
MM6.....	<i>Menschliche monozytische Zellen</i>
mmHg.....	<i>Millimeter-Quecksilbersäule</i>
NOX.....	<i>NADPH-Oxidase</i>
PAD4.....	<i>Peptidylarginin-Deiminase 4</i>
PA-Katheter.....	<i>Pulmonalarterien-Katheter</i>
PAMPs.....	<i>Pathogen associated molecular Patterns</i>
paO <sub>2</sub> .....	<i>arterieller Sauerstoffpartialdruck</i>
PDS.....	<i>Parameter Damage Score</i>
PEEP.....	<i>Positive EndExpiratory Pressure, Positiv-Endexpiratorischer Druck</i>
PiCCo-Katheter.....	<i>Pulse Contour Cardiac Output-Katheter</i>
PIM.....	<i>Pulmonale intravaskuläre Makrophagen</i>
PMNs.....	<i>Polymorphkernige Neutrophile Leukozyten</i>
Ppeak.....	<i>Inspiratorischer Spitzendruck</i>
PRRs.....	<i>Pattern Recognition Receptors, Mustererkennungsrezeptoren</i>
ROS.....	<i>reactive oxygen species</i>
RR.....	<i>Blutdruck nach "Riva-Rocci"</i>
SpO <sub>2</sub> .....	<i>peripher gemessene Sauerstoffkonzentration</i>
TDS.....	<i>Total Damage Score</i>
TIVA.....	<i>Total intravenöse Anästhesie</i>
TJ.....	<i>Tight Junctions</i>
TLR.....	<i>Toll-Like-Rezeptoren</i>

TNF- $\alpha$  ..... *Tumornekrosefaktor-alpha*

VCV ..... *Volumenkontrollierte Beatmung*

ZVD..... *Zentralvenöser Druck*

ZVK..... *Zentralvenöser Katheter*

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zelluläre Struktur und Aufbau von Histonen .....	5
Abbildung 2: Position und Aufbau von Lipopolysaccharid .....	9
Abbildung 3: LPS/TLR4-Signalübertragung .....	10
Abbildung 4: Einzelne Lungenschadensparameter im histologischen Schnitt .....	13
Abbildung 5: Einzelne Lungenschadensparameter im histologischen Schnitt .....	14
Abbildung 6: Versuchsprotokoll ARDS-55 .....	20
Abbildung 7: Übersicht der Parameter-Erhebung während der Messzeitpunkte BLH bis T8	23
Abbildung 8: Fotografische Darstellung einer Schweinelunge (ARDS 55-24, Sham) .....	25
Abbildung 9: Vorgehen der Auswertung eines histologischen Lungenschnittes .....	27
Abbildung 10: TDS pro Interventionsgruppe .....	32
Abbildung 11: Ausprägung der Schadensparameter pro Interventionsgruppe, angegeben in Mittelwerten .....	33
Abbildung 12: Lungenschaden nach gesamtem Ober- und Unterlappen .....	34
Abbildung 13: Lungenschaden im Oberlappen je Interventionsgruppe (bis T6 n=8, T8: Sham- und Histon-Gruppe n=8, LPS n=7), angegeben in Mittelwerten, .....	35
Abbildung 14: Lungenschaden im Unterlappen je Interventionsgruppe (bis T6 n=8, T8: Sham- und Histon-Gruppe n=8, LPS n=7), angegeben in Mittelwerten .....	35
Abbildung 15: Lungenschaden des Ober- und Unterlappen .....	36
Abbildung 16: Expression von TNF- $\alpha$ und IL-6 im ventralen und dorsalen Unterlappen .....	37
Abbildung 17: Herzfrequenz (HF) über die Zeit BLH-T8 .....	38
Abbildung 18: Mittlerer arterieller Druck (MAD) über die Zeit BLH-T8 .....	39
Abbildung 19: Pulmonalarteriendruck über die Zeit BLH-T8 .....	41
Abbildung 20: Zentralvenöser Druck über die Zeit BLH-T8 .....	42
Abbildung 21: Herzindex über die Zeit BLH-T8 .....	43
Abbildung 22: Funktionelle Residualkapazität (FRC) über die Zeit BLH-T8 .....	44
Abbildung 23: Ppeak über die Zeit BLH-T8 .....	45
Abbildung 24: Horovitz-Quotient (PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> ) über die Zeit nach Interventionsgruppen .....	46
Abbildung 25: PaCO <sub>2</sub> über die Zeit nach Interventionsgruppen .....	47

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Schweregradeinteilung des ARDS bei PEEP $\geq 5$ cm H <sub>2</sub> O.....	3
Tabelle 2: Vorgehen der pulmonalen Probengewinnung aus dem linken Lungenlappen .....	25
Tabelle 3: Wertebelegung der einzelnen Felder (oben) und des Überblicks (unten) in Excel27	
Tabelle 4: Zusammenfassung der Werte in die drei Schadensscores .....	28
Tabelle 5: Randomisierte und verblindete Einteilung der Versuchstiere in die Interventionsgruppen .....	31
Tabelle 6: Protokoll zur Paraffineinbettung.....	66
Tabelle 7:H.E.-Färbeprotokoll .....	67
Tabelle 8: Light-Cycler Protokoll .....	68
Tabelle 9: Light-Cycler Programm .....	68
Tabelle 10: Primer zum Zielgenachweis.....	69

## 1 Einleitung und Zielsetzung

Die Entzündung ist ein pathologischer Prozess, welcher reaktiv auf infektiöse, chemische oder physikalische Reize ausgelöst werden kann und dazu dient, Infektionen zu beseitigen und die Reparatur des Gewebes zu ermöglichen. Diverse Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems sind dabei multifunktional an der Immunabwehr beteiligt (Sun et al., 2020). Den entzündlichen Prozess im Rahmen eines akuten Atemnotsyndroms (*Acute Respiratory Distress Syndrome*, ARDS) in seiner Komplexität zu verstehen, ist Gegenstand aktueller Forschung (Cusack et al., 2023). Hier scheinen extrazelluläre Histone in der alveolären Entzündungsreaktion pathophysiologisch eine besondere Rolle zu spielen (Karki et al., 2020, Kim et al., 2022).

In seinem „Gefahrenmodell“ geht Matzinger davon aus, dass geschädigte Zellen, obgleich fremd oder eigen, Gefahren- und Alarmsignale aussenden und diese die Auslösung einer Immunantwort zur Folge haben (Matzinger, 1994). So werden über Mustererkennungsrezeptoren (Pattern Recognition Receptors, PRRs) fremde Strukturen (Pathogen-associated molecular Patterns, PAMPs) erkannt, wie zum Beispiel Lipopolysaccharid (LPS) durch Toll-Like-Rezeptoren (TLR). Der chemisch gebundene „PRR-PAMP-Komplex“ führt entweder dazu, dass PAMPs direkt abgetötet werden oder diese dem spezifischen Immunsystem präsentiert werden, um eine adaptive Immunantwort einzuleiten. Demgegenüber konnten nukleare oder zytoplasmatische, körpereigene Moleküle als schadensassoziierte molekulare Muster (*Danger-associated molecular Patterns*, DAMPs) identifiziert werden. Diese werden im Rahmen einer Gewebeverletzung aus der Zelle freigesetzt und aktivieren das Immunsystem auf ähnliche Art wie PAMPs. Neben der Auslösung und Aufrechterhaltung einer Entzündungsreaktionen kann diese sich so auch systemisch ausbreiten und durch multiple Organschäden bis zum Tod führen (Denning et al., 2019, Matzinger, 2002).

Extrazelluläre Histone, als wichtige Vertreter der DAMPs (Murao et al., 2023, Brinkmann et al., 2004), interagieren mit TLRs ähnlich wie LPS (Allam et al., 2012), Komplementfaktoren (Zetoune and Ward, 2020) oder Zellmembran-Phospholipiden. Der Histonspiegel korreliert dabei mit der Schwere pathophysiologischer Prozesse im Rahmen eines ARDS, aber auch bei Sepsis (Ekaney et al., 2014), Trauma (Abrams et al., 2013), Autoimmunerkrankungen und der COVID-19-Erkrankung (COVID-19) (Bouchard et al., 2022). Ansätze wie eine direkte Neutralisierung von Histonen, die Hemmung mittels Antikörpern oder die Blockierung von Oberflächenrezeptoren könnten potenzielle therapeutische Möglichkeiten bieten (Zhang et al., 2013). Hier bedarf es angesichts der noch immer hohen Mortalität weiterer Untersuchungen (Rahman et al., 2021).

Die vorliegende Dissertation soll die Erkenntnisse aus der Forschung in-vitro (Xu et al., 2011), sowie im Nagetiermodell (Bosmann et al., 2013), als auch retrospektiv (Allam et al., 2014) ergänzen. Ziel ist es dabei, die zuvor in der Studie durch Ruemmler et al. nachgewiesenen entzündungsfördernden Wirkungen von extrazellulären, freien Histonen auf das Großtiermodell Schwein zu übertragen und zu evaluieren (Ruemmler et al., 2021). Hierzu wird die Hypothese aufgestellt, dass eine intrabronchiale Gabe von Histonen zu einer inflammatorischen Reaktion mit Gewebeentzündung und septischer Organschädigung in der Schweinelunge führen kann.

Zur Überprüfung der Hypothese werden die drei Interventionsgruppen auf statistische Signifikanz hin miteinander verglichen. Als primäre Endpunkte dienen die Ergebnisse der histologischen Auswertung, sowie der molekularbiologischen Analyse durch Detektion von Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) mittels Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (*Reverse transcription polymerase chain reaction*, RT-PCR). Die sekundären Endpunkte bilden sich aus den Daten des Monitorings und der Beatmung vor, während und nach der Intervention.

## 2 Literaturdiskussion

### 2.1 Das akute Atemnotsyndrom

Unter dem akuten Atemnotsyndrom (ARDS) wird nach der aktuellen Definition durch Matthey et al. in Ergänzung zu der zuvor schon etablierten Berliner Definition der *ARDS Definition Task Force* durch Ranieri et al. eine plötzlich einsetzende, diffuse, entzündliche Lungenschädigung verstanden (Matthey et al., 2024). Neben der klinischen Komponente der, definitionsgemäß innerhalb einer Woche entstehenden, respiratorischen Verschlechterung, zeigen sich beidseitig diffuse Infiltrate im Röntgen-Thorax-Bild, welche nicht durch andere Ätiologien begründet werden können. Es kommt zu einem respiratorischen Versagen, welches anhand des Horovitz-Quotienten ( $\text{paO}_2/\text{FiO}_2$ ) in drei Schweregrade eingeteilt wird (Ranieri et al., 2012) (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Schweregradeinteilung des ARDS bei PEEP  $\geq 5$  cm H<sub>2</sub>O

Schweregrad	Horovitz-Quotient [ $\text{paO}_2/\text{FiO}_2$ ]
Mildes ARDS	201–300 mmHg
Moderates ARDS	101–200 mmHg
Schweres ARDS	$\leq 100$ mmHg

Ätiologisch wird das ARDS in die direkten und in die indirekten Formen eingeteilt. Zu den direkten, pulmonalen Ursachen zählt unter anderem eine bakterielle oder viral bedingte Lungenentzündung. Nichtpulmonale Infektionen, Traumata oder Schock bilden indirekte Auslöser (Matthey et al., 2024, Ranieri et al., 2012). Von besonderer Relevanz sind mit 59,4 % Pneumonien, mit 16 % eine Sepsis, mit 14,2 % Aspirationen und mit 7,5 % nicht kardiogene Schockformen (Spieth et al., 2017).

Das ARDS ist vor allem im Rahmen eines septischen Geschehens mit einer erhöhten Sterblichkeit auf der Intensivstation, einer erhöhten Krankenhausaufenthaltsdauer und einer erhöhten Verweildauer auf der Intensivstation vergesellschaftet und zeigt die Dringlichkeit der weiteren pathophysiologischen Aufklärung (Auriemma et al., 2020).

Der Schaden des Lungengewebes ist dabei durch eine diffuse Alveolarschädigung (*Diffuse Alveolar Damage*, DAD) begründet und führt zu einer erhöhten Lungengefäß- und Epithelpermeabilität mit Lungenödem und schwerkraftabhängiger Atelektasenbildung (Ranieri et al., 2012, Katzenstein et al., 1976a). Intraalveoläre Ödeme, Entzündungen, das

Vorhandensein von hyalinen Membranen und alveoläre Blutungen können histologisch erfasst werden (Xu et al., 2023).

Der Pathologe Tomashefski spricht in seiner Veröffentlichung über die pulmonalen Veränderungen im Rahmen eines ARDS von einem „Permeabilitäts-Lungenödem“. Er teilt das histologische Erscheinungsbild des Lungenschadens in drei zeitlich zwar begrenzte, aber klinisch sich häufig überlappende Phasen mit jeweils typischen Merkmalen ein. Dabei steht zu Beginn bis Tag sieben die exsudative Phase im Vordergrund. Interstitielle und intraalveoläre Ödembildung, die Entstehung hyaliner Membranen, Hämorrhagie und eine inflammatorische Infiltration durch Zytokinaktivierung mit Freisetzung entzündungsfördernder Mediatoren, wie TNF- $\alpha$  und IL-6 können hierbei histologisch erhoben werden. Darauffolgend ab Tag sieben bis 21 beginnt die proliferative Phase mit interstitieller Proliferation von Fibroblasten, einem beginnenden fibrotischen Umbau und chronisch werdender Entzündung. In der sich anschließenden fibrotischen Phase, ab Tag 21, sorgt die kollagene Fibrose für eine zunehmende mikrozystische, hypertrophe Wabenbildung mit veränderter pulmonaler Mikrovaskularisation (Tomashefski, 2000). Folgen der beschriebenen pulmonalen Umbauprozesse zeigen sich in einer verminderten Compliance, einer erhöhten Kohlenstoffdioxidretention, geringeren Tidalvolumen, sowie einem erhöhten pulmonalarteriellen Druck (Hecker et al., 2008).

Erwähnenswert ist, dass nur die Hälfte der Patienten, die anhand der zuvor genannten klinischen Kriterien an einem ARDS erkrankt sind, auch ein DAD aufweisen. Kao et al. konnten in ihrer Studie an ARDS-Patienten anhand offener Lungenbiopsien einen DAD-Anteil von 56,4 % (56/101 Patienten) eruieren und zeigten zudem auf, dass bei Patienten mit nachgewiesenem DAD eine erhöhte Krankenhaussterblichkeit im Gegensatz zu ARDS-Patienten ohne DAD bestand (71,9% vs. 45,5% mit  $p = 0,007$ ) (Kao et al., 2015). In ihrer Meta-Analyse konnten Cardinal-Fernández et al. zeigen, dass DAD dabei mit einem nahezu verdoppelten Sterberisiko bei ARDS-Patienten im Vergleich zu ARDS-Patienten ohne DAD verbunden war (OR 1,81, 95% KI, 1,14-2,86) (Cardinal-Fernández et al., 2016).

Derzeit gibt es keine kausale Therapie für das akute Atemnotsyndrom. Der Versuch die komplexe pathophysiologische Kaskade des ARDS zu durchbrechen ist eine große Aufgabe der aktuellen Forschung. Ein intensivmedizinisch betreuter Patient mit einem schweren ARDS wird mit möglichst lungenprotektiven Drücken invasiv beatmet. Banavasi et al. beschreiben die mechanische Beatmung als den wichtigsten Aspekt bei der Behandlung von Patienten mit ARDS (Banavasi et al., 2021). Als lungenprotektiv gilt dabei ein Atemzugvolumen von 6-8 ml/kgKG (Standardgewicht) und ein positiver endexpiratorischer Druck (*Positive end-expiratory pressure*, PEEP) von mindestens 5 mbar, orientiert an dem aktuellen FiO<sub>2</sub>-Wert. Grundlage dieses Beatmungs-Standards im Rahmen eines schweren ARDS bildet die Studie

von Brower et al., in welcher durch die Reduktion des Tidalvolumens von 12 ml/kgKG auf 6 ml/kgKG die Mortalität um 22 Prozent gesenkt und die Anzahl der beatmungsfreien Tage erhöht werden konnte (Brower et al., 2000).

## 2.2 Die Rolle extrazellulärer Histone im alveolären Entzündungsprozess

Neben der architektonischen Rolle von Histonen etablierte sich im Verlauf der Evolution die Fähigkeit der epigenetischen Modifikation in Eukaryoten (Alva and Lupas, 2019, Kossel, 1928).

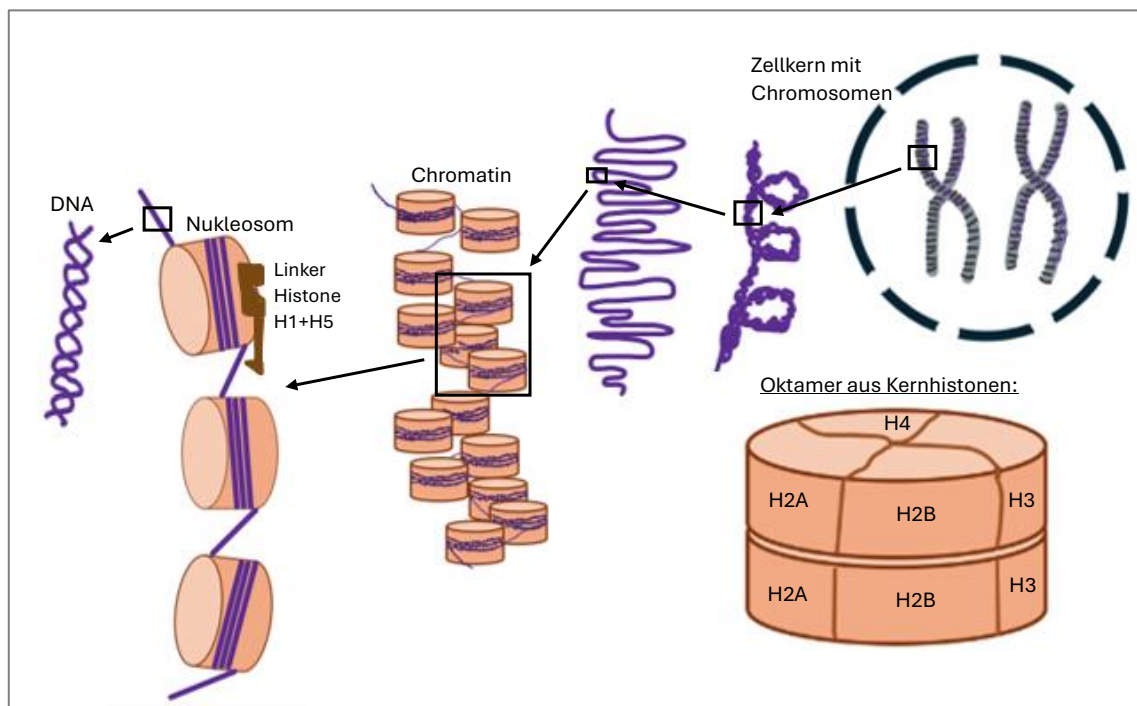


Abbildung 1: Zelluläre Struktur und Aufbau von Histonen

*Ein Oktamer besteht aus acht Kernhiston-Isomeren (zwei H3-H4- und zwei H2A-H2B-Dimeren), der DNA-Strang umwickelt ein Oktamer und bildet damit ein Nucleosom, diese werden durch Linker-Histone (H1 und H5) zusammengehalten, so bilden viele Nucleosome Chromatin, daraus Kondensierung bis zur Chromosomen-Struktur, modifiziert nach Silk et al. (Silk et al., 2017).*

In allen Eukaryonten wird das Genom so verpackt und organisiert, dass es in den Zellkern passt und zugleich korrekt abgelesen werden kann. Dies wird durch vier strukturell verwandte Kernhistone (H2A, H2B, H3 und H4) bewerkstelligt. Der daraus entstehende oktamer Komplexe, bestehend aus einem (H3-H4)<sub>2</sub>-Tetramer und zwei H2A-H2B-Dimeren, umhüllt 146-147 Basenpaare der DNA und bildet damit die kleinste Struktureinheit, ein Nucleosom. Dabei sind die Isomere H1/H5, H2A und H2B Lysin-reich, die Isomere H3 und H4 Arginin-reich (DeLange and Smith, 1971).

Alle Histon-Isomere haben eine zentrale Helix und eine gemeinsame Faltungsstruktur, welche aus drei  $\alpha$ -Helixen besteht (Arents et al., 1991). Durch eine antiparallele Paarung von jeweils zwei Heterodimeren (H2A mit H2B und H3 mit H4) entstehen für jedes Histonfaltungsdimer somit drei Interaktionsschnittstellen mit der DNA (Bhattacharyya et al., 2018). Dadurch wird es möglich, dass Histone als „Kontrollschalter“ während der Transkription wirken können (Li et al., 2022) und durch posttranslationale Modifikationen die Zugänglichkeit von Genen für Transkriptionsfaktoren und viele andere Proteinen überwachen (Parseghian and Luhrs, 2006, Bhaumik et al., 2007).

Durch die Linkerhistone H1 und H5 wird ein Nukleosom weiter stabilisiert und mit benachbarten Nukleosomen verbunden (Talbert and Henikoff, 2021, Chen et al., 2014). Dabei kann die Möglichkeit der variablen, molekularen Ordnung auf höherer Ebene der Chromatinstruktur eine entscheidende Rolle in der Regulation der Transkription, der DNA-Replikation, sowie der DNA-Reparatur haben. Histonvarianten, Histonmodifikationen, DNA-Methylierung und die Bindung von Nicht-Histon-Architekturproteinen wirken dabei auf die Art der Chromatinstruktur ein (Chen and Li, 2010). Besonders durch die vielen Histonvarianten wird die Funktion der Nukleosomen durch die Art der Umhüllung, der Stabilität, der posttranslationalen Modifikation und der Interaktion mit der DNA vielfältig erweitert (Mariño-Ramírez et al., 2005). Histone scheinen hier epigenetisch entscheidend an der Regulation der angeborenen Immunantwort und der Expression entsprechender Gene beteiligt zu sein (Li et al., 2022).

Neben der intranukleär gelegenen Aufgabe der DNA-Organisation und Modifikation, werden Histone, welche sich außerhalb des Zellkernes im Zytoplasma, in Zellmembranen oder in der extrazellulären Flüssigkeit aufhalten als Teil des angeborenen Abwehrsystems gesehen. Sie können eine Immunantwort auslösen, indem sie als DAMPs wirken und an PRRs binden (siehe Einleitung). Darüber hinaus können sie als antimikrobielle Peptide (AMPs) zur direkten Eliminierung von Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten *in vitro* und *in vivo* dienen. Histone sind an der Phagozyten-bedingten angeborenen Immunantwort als Komponenten von NETs, Neutrophilenaktivatoren und Plasminogenrezeptoren beteiligt (Li et al., 2022). Dabei können Histone frei, als DNA-gebundenes Nukleosom oder als Teil dieser NETs vorliegen. Auch Brinkmann et al. beschreibt NETs als wichtige Akteure in der angeborenen Immunabwehr. Durch Bindung von Mikroorganismen können sie Virulenzfaktoren abbauen und Bakterien eliminieren (Brinkmann et al., 2004).

Die NETose ist dabei entweder abhängig von der Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies (*Reactive Oxygen Species*, ROS) durch die NADPH-Oxidase (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase*, NOX) oder NOX- unabhängig über eine direkte Aktivierung von Peptidylarginin-Deiminase 4 (PAD4), der anschließenden Citrullierung von H3 und daraus

resultierenden Chromatin-Dekondensation. Die im Rahmen dieses Prozesses entstehenden extrazellulären Strukturen werden als NETs bezeichnet (Arazna et al., 2013).

Neben Phagozytose und Degranulation haben Neutrophile mit der Bildung von NETs eine dritte antimikrobielle Strategie. Aktivierte Neutrophile setzen ihren Kerninhalt in den extrazellulären Raum frei und es entstehen große, extrazelluläre, netzartige Strukturen, welche aus Granulatproteinen auf einem Gerüst aus dekondensiertem Chromatin bestehen (Conceição-Silva et al., 2021). Mittlerweile ist bekannt, dass neben Neutrophilen auch Makrophagen, Mastzellen, Eosinophile, Basophile und Lymphozyten fähig sind, extrazelluläre Fallen freizugeben, man spricht daher allgemein von Extrazellulären Fallen (*Extracellular Traps*, ETs). Der daraus resultierende Zelltod, die ETose, kann so von anderen Arten des Zelltods wie Nekrose, Apoptose, Nekroptose und Pyroptose unterschieden werden (Conceição-Silva et al., 2021).

Das Vorkommen extrazellulärer Histone im Serum nach erheblichem Zelltod wie Sepsis, ARDS, Trauma, Ischämie mit Reperfusionverletzungen und auch im Rahmen von Autoimmunerkrankungen wird durch Silk et al. beschrieben (Silk et al., 2017).

Frydman et al. konnten ebenfalls erhöhte Konzentrationen von extrazellulären Histonen in septischen Patienten messen. Dabei hatten die Patienten mit hohen Histon-Konzentrationen eine schlechtere Prognose und eine höhere Rate an Endorganschäden. Die Forscher identifizierten neben Neutrophilen auch Megakaryozyten und Thrombozyten als Quellen extranukleärer Histone (Frydman et al., 2020).

Die Komplexität des alveolären Entzündungsprozesses im Rahmen eines ARDS begründet sich in den physiologischen Gegebenheiten des Atemorgans. Täglich strömen mindestens 10.000 Liter Luft durch beide Lungenflügel. Die innere Oberfläche, das Alveolarepithel, hat dabei kontinuierlichen Kontakt zur Außenwelt und zu luftgetragenen Krankheitserregern. Um die komplexe Aufgabe des Gasaustausches zu bewerkstelligen, braucht es zum einen die kontinuierliche Verbindung zur sauerstoffreichen Luft und zum anderen eine sehr schmale Barriere. So besteht das Epithel der Alveolen aus einer Monoschicht mit dünnen Alveolarzellen vom Typ I (ATI) und runden Alveolarzellen vom Typ II (ATII), welche eine oberflächenaktive Substanz, den Surfactant (Kunstwort aus dem Englischen und Abkürzung für *surface active agent*) produzieren. Beide Zellarten bewahren durch Ionen- und Flüssigkeitstransport die Trockenheit des Luftraumes. Die abdichtenden interzellulären Tight Junctions (TJ) haben dabei eine regulatorische Barrierefunktion. Auf der Seite des Gefäßendothels regulieren ebenfalls TJ und zudem Adherens Junctions (AJ) den Zustrom von Flüssigkeit und Zellen (Matthay et al., 2019).

Um den Wirt vor Infektionen zu schützen, bedarf es in der Lunge einem kompetenten Abwehrsystem. Das angeborene Immunsystem nutzt unspezifische Mechanismen (Myszor and Gudmundsson, 2023). Neben dem polysynaptischen Hustenreflex wird über die Produktion von Mukus mit beispielsweise Lysozym oder Laktoferrin eine chemische Abwehr geschaffen. Eine physikalische Barriere entsteht durch das Flimmerepithel mit ihren in orale Richtung schlagenden Flimmerhärchen, sowie einem engen Epithel-Zusammenhalt durch zuvor beschriebene TJ und AJ. Im Luftraum der Alveolen halten sich zur Erregerabwehr Makrophagen auf. Polymorphkernige Leukozyten (PMNs) befinden sich in den Kapillaren der Alveolen und werden im Rahmen einer Infektion in die Lufträume mobilisiert (Matthay et al., 2019).

Als Vermittler zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem können die Epithelzellen Zytokine und Chemokine produzieren (Ryu et al., 2010). Zu den wichtigsten Rezeptoren, welche Viren- oder Bakterienbestandteile erkennen können, gehören die TLRs. Als DAMPs wirkend induzieren freigesetzte Histone über TLR2 und TLR4 die Induktion proinflammatorischer Zytokine (Allam et al., 2012). Das Histon-Isomer H4 kann zudem im Rahmen von Infektionen die Neutrophilenaktivierung verstärken und so die Reaktion auf eine Entzündung zusätzlich triggern (Hsieh et al., 2021). Kim et. al fanden in ihrer Arbeit mit menschlichen Lungenarterien-Endothelzellen (*Human Pulmonary Artery Endothelial Cells*, HPAECs) heraus, dass die Histon-Untereinheiten H3 und H4 die Permeabilität dieser Zellen verstärken (Kim et al., 2022). Und auch Li et al. beschrieb eine Histon-ausgelöste Permeabilisierung des Endothels mit Kalziumeinstrom und daraus resultierender dysfunktionaler Endothelbarriere einhergehend mit Ödembildung und Aktivierung zirkulierender Leukozyten mit Zytokinfreisetzung (Li et al., 2021). Durch intratracheale Injektion von Histonen in Ratten konnten Bosmann et al. Lungenfunktionsstörungen mit entzündlichen Veränderungen verursachen (Bosmann et al., 2013). Durch eine Histoninfusion kam es zu einer dysfunktionalen Barriere mit inflammatorischer Infiltration von Entzündungszellen in den Alveolarraum und starker Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen in Mäusen (Abrams et al., 2013).

### **2.3 Die lungenschädigende Wirkung von Lipopolysaccharid**

Das Lipopolysaccharid (LPS) ist ein Glykolipid, welches in der Außenmembran gramnegativer Bakterien vorkommt. Bereits Richard Pfeiffer entwickelte in Zusammenarbeit mit Robert Koch während seinen Forschungen zu Cholera das Konzept des Endotoxins als ein hitzestabiles Bakteriengift (Rietschel and Cavaillon, 2003, Koch, 1884).

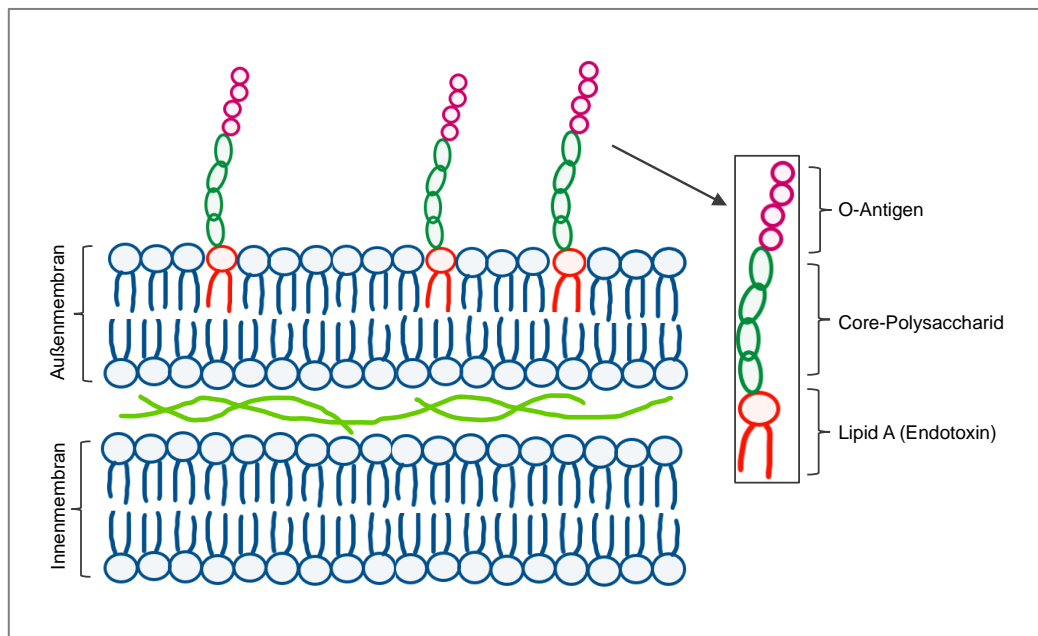


Abbildung 2: Position und Aufbau von Lipopolysaccharid

Vorkommen in der Außenmembran von gram-negativen Bakterien, z.B. *Escherichia coli*, Lipid-A (rot) löst die Immunantwort aus, modifiziert nach Bidne et al. (Bidne et al., 2018)

LPS (siehe Abbildung 2) besteht aus einer polaren Lipidgruppe, dem Lipid A, und einer Oligosaccharid-Kette (Matute-Bello et al., 2008). Aufgrund der starken Wirkung auf tierische Zellen, insbesondere auf die Zellen des Immunsystems, wird Lipid A auch als Endotoxin bezeichnet (Raetz et al., 1991) und scheint wesentlich an der Ausprägung pathophysiologischer Wirkungen beteiligt zu sein (Schromm et al., 2000). Matute-Bello et al. beschreiben LPS als einen wichtigen Mediator der Sepsis und deuten auf die große Relevanz des LPS-induzierten septischen Modells in der Forschung hin (Matute-Bello et al., 2008). Ein wichtiger Faktor der Schadensausprägung ist dabei die Stärke der Endotoxin-induzierten Immunantwort des Wirts (Gioannini and Weiss, 2007). LPS kann an ein lösliches Shuttle-Protein, das LPS-Bindungsprotein (LBP), binden und hilft bei der Interaktion mit CD14. CD14 ist ein Glykosylphosphatidylinositol-verankertes Protein, welches LPS hilft, mit einem TLR4/MD-2-Rezeptorkomplex zu interagieren. Durch verschiedene Signalwege kommt es schließlich zur Aktivierung von proinflammatorischen Zytokin- und Typ- I-Interferon-Genen (Lu et al., 2008) (siehe Abbildung 3).

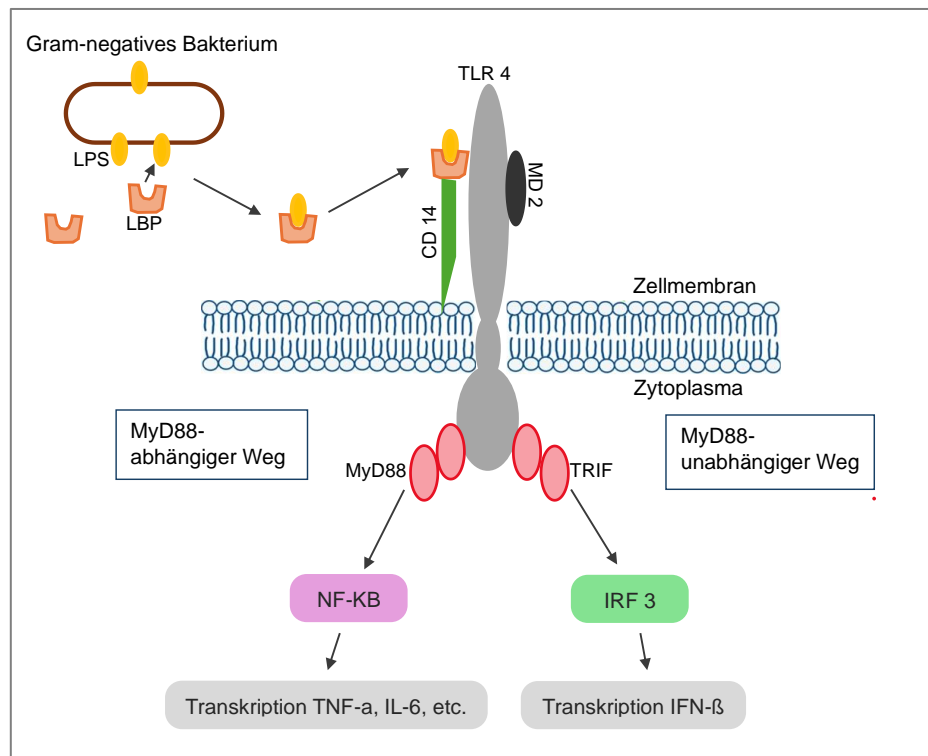


Abbildung 3: LPS/TLR4-Signalübertragung

Antwort des Immunsystems auf Lipopolysaccharid (LPS) durch TLR4-Signalisierung, IFN- $\beta$ : Interferon  $\beta$ , IL: Interleukin, IRF3: Interferon-Regulatorfaktor 3, LBP: LPS-Bindungsmolekül, MyD88: Myeloider Differenzierungsfaktor 88, TLR4: Toll-ähnlicher Rezeptor 4, TNF- $\alpha$ : Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , TRIF: TIR-Domänen-haltiges Adapterprotein, modifiziert nach Lu et al. und Nova et al. (Lu et al., 2008), (Nova et al., 2019)

## 2.4 Tiermodelle in der Forschung und das Lungenschadensmodell

Ein Tiermodell mit einem induzierten ARDS sollte idealerweise Merkmale eines menschlichen ARDS erfassen. Hierzu zählen Matute-Bello et al. ein schnelles Einsetzen der Symptomatik nach einem auslösenden Reiz, Zeichen eines dysfunktionalen Gasaustausches und einer erhöhten Permeabilität durch eine geschädigte Alveolarkapillarmembran, sowie einen histologischen Hinweis auf einen Lungenschaden (Matute-Bello et al., 2011).

Tiermodelle sind das Bindeglied zwischen der Arbeit an Zellen und Studien an Patienten und bieten die notwendige Möglichkeit relevante Ergebnisse aus in-vitro-Studien in lebenden Systemen zu bewerten. Aber auch aufgestellte Hypothesen, welche aus Studien an Patienten hervorgehen, können so am Tiermodell getestet und geprüft werden (Matute-Bello et al., 2008). Therapeutische Ansätze, welche heutzutage im Rahmen des ARDS genutzt werden, gehen auf die Erkenntnisse aus Tiermodellen zurück. Die therapeutische Strategie der lungenprotektiven Beatmung ging dabei auf Versuche an Tieren zurück, bei denen zu hohe Spitzendrücke histopathologisch den Lungenschaden verstärkten (Tsuno et al., 1991). Albert et al. zeigten in ihrer Arbeit mit Hunden einen Einfluss der Schwerkraft auf die Lungenperfusion

im Rahmen eines akuten Lungenschadens und legten damit die Grundpfeiler für die heutzutage angewandte Bauchlage im intensivmedizinischen Setting (Albert et al., 1987).

Im Rahmen der ARDS-Forschung bieten Kleintiermodelle die Möglichkeit durch genetische Manipulation Krankheiten darzustellen und pathophysiologische Prozesse verstehen zu lernen (Matute-Bello et al., 2008). Ein Nachteil ist jedoch, dass Kleintiere aufgrund großer anatomischer und physiologischer eine dem Menschen teilweise deutlich abweichende Klinik bieten. Mäuse können sich dabei grundlegend in ihrer angeborenen und adaptiven Immunantwort unterscheiden (Mestas and Hughes, 2004). Auch die Durchführung von „Co-Interventionen“, wie Extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO, ist in Kleintiermodellen technisch schwer umzusetzen (Silva et al., 2022).

Großtiermodelle hingegen, vor allem am Schwein, aber auch am Schaf (Engel et al., 2020) haben den Vorteil, dass sie aus anatomischer und physiologischer Sicht dem Menschen deutlich näher sind. Diese erfordern dabei jedoch einen organisatorisch größeren Aufwand, bieten knappe Ressourcen und sind teurer (Matute-Bello et al., 2008).

Es gilt also ein Modell für einen akuten Lungenschaden zu generieren, auf dessen Basis man nach neuen therapeutischen Möglichkeiten suchen kann. Wichtig dabei ist, dass dieses Modell reproduzierbar ist, um relevante Daten in einem experimentellen Umfeld für neue Therapieansätze gewinnen zu können. So haben Ruemmler et al. durch intrabronchiale Applikation von Lipopolysacchariden mittels flexibler faseroptischer Bronchoskopie ein experimentelles Modell eines akuten Lungenschadens geschaffen (Ruemmler et al., 2021). Und auch Urmann et al. konnten mittels intravenöser Applikation von LPS ein Schockmodell im Schwein erstellen und damit mehr Standardisierung etablieren (Urmann et al., 2023). Ölsäure und LPS zielen dabei hauptsächlich auf das Kapillarendothel ab, Hyperoxie und Säureaspiration greifen vorwiegend das Alveolarepithel an, so Matute-Bello et al. (Matute-Bello et al., 2008).

## 2.5 Die histologischen Scoringssysteme der Lunge

Der Begriff des diffusen Alveolarschadens (*Diffuse alveolar Damage*, DAD) wurde 1976 von Katzenstein et al. etabliert, welche darunter einen Schaden des Alveolar- und Kapillarendothels mit Flüssigkeits- und Zellexsudation verstanden (Katzenstein et al., 1976b). Und auch Blennerhassett spricht von einer „einheitlichen Pathologie“ während eines ARDS (Blennerhassett, 1985). DAD gilt als histologisches Kennzeichen für die akute Phase des ARDS (Ranieri et al., 2012). Obduktionen zeigten jedoch, dass nur die Hälfte der ARDS-Patienten auch histopathologisch einen DAD hervorbringen. Ist ein DAD bei Patienten mit

ARDS vorhanden, so ist die Mortalität durch refraktäre Hypoxämien etwa fünfmal höher als bei Patienten ohne DAD (Lorente et al., 2015).

Dass ein „validierter histologischer Score“ eine zu messende Haupteigenschaft innerhalb von Merkmalen eines experimentellen akuten Lungenschadens sein sollte wurde durch das Gremium der *American Thoracic Society* mit 63% empfohlen (Kulkarni et al., 2022).

Dabei wurden in der Forschung bereits verschiedene Scoring-Systeme erstellt. 1997 werteten Broccard et al. in ihrer Studie den Einfluss der Bauchlage auf das Ausmaß und die Verteilung einer Lungenschädigung in Hunden aus. Sie verwendeten hierzu einen Score mit Schadensparametern wie *Interstitielles Ödem* oder *Neutrophile Infiltration* (Broccard et al., 1997).

In ihrer Studie mit Schafen als Modell für ein akutes Atemversagen verwendeten Quintel et al. zehn verschiedene histologische Merkmale, darunter *Fibrinbildung*, *hyaline Membranen*, *Hyperämie*, *Interstitielle Ödeme*, *Intrazelluläre und Alveoläre Blutung*, *Intraalveoläres Ödem*, *Lymphangiektasie*, *Perivaskuläres Ödem*, *Neutrophilenanzahl* und *Thrombozytenaggregation* (Quintel et al., 1998).

Spieth et al. beschrieben DAD anhand der auch in dieser Arbeit verwendeten Parameter. Hierzu zählen: *Alveoläres Ödem*, *Interstitielles Ödem*, *Hämorrhagie*, *Inflammatorische Infiltration*, *Epithelschaden*, *Mikroatelektasen* und *Überblähung* (Spieth et al., 2007). Ziebart et al. bildeten mit dem *Lung Injury Score* (LIS) die Grundlage der histologischen Schadensbewertung dieser Arbeit (siehe Abbildung 4 und 5), indem die Forscher die bereits durch Spieth et al. beschriebenen Parameter in vier unabhängigen Bereichen (vier Felder) eines Lungenschnittes und zusätzlich in einem Überblicks-Feld anwendeten (Ziebart et al., 2014b, Ziebart et al., 2015).

Auch Böhme et al. verwendeten in ihrer Studie zu Schwankungen des Sauerstoffpartialdrucks zur histologischen Bewertung der Lungenverletzung den zuvor beschriebenen LIS-Score (Boehme et al., 2019).

Im Folgenden werden die zur Anwendung gekommenen sieben Parameter anhand von Fotos einzelner histologischer Lungenschnitte in H.E.-Färbung veranschaulicht.

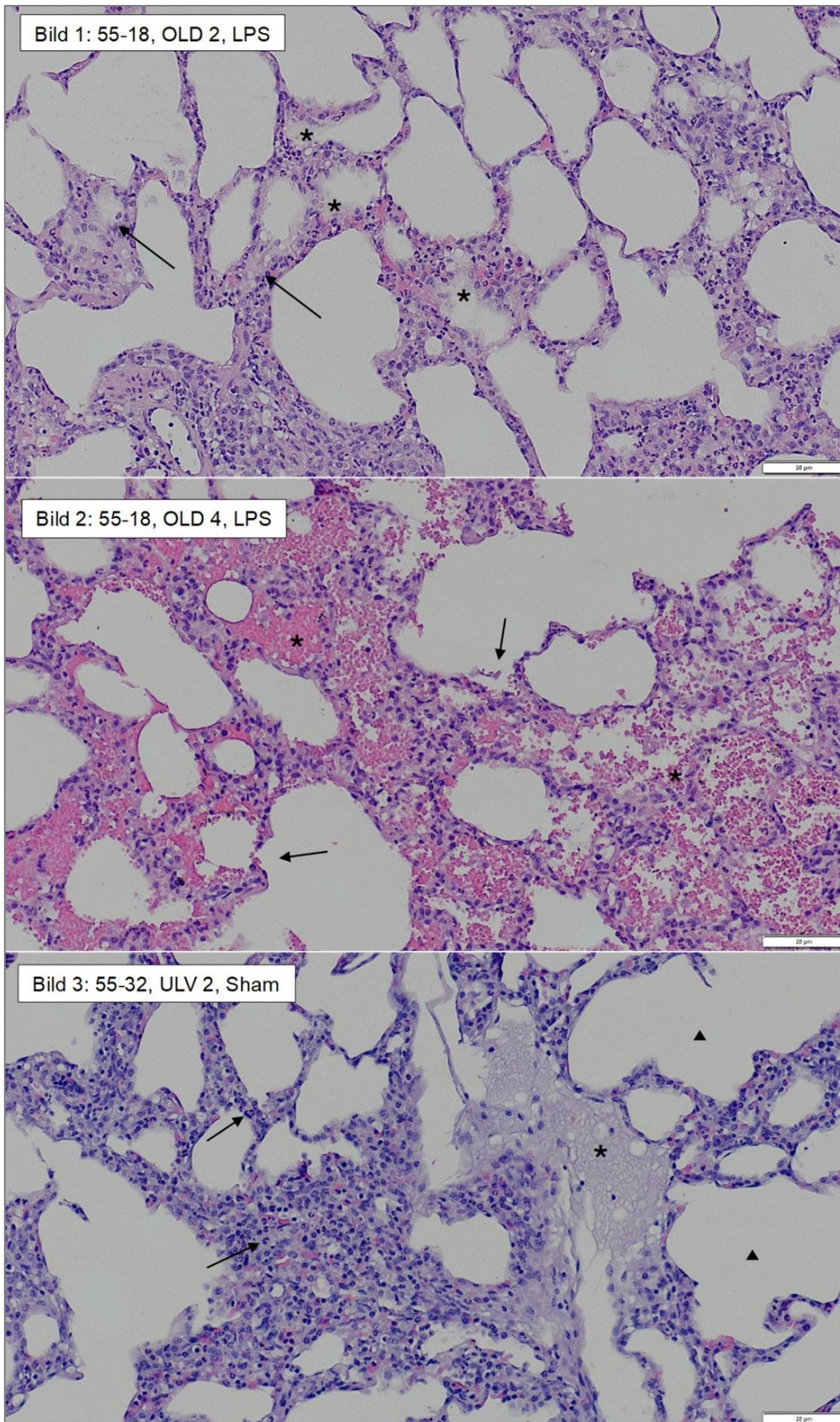


Abbildung 4: Einzelne Lungenschadensparameter im histologischen Schnitt  
Bild 1: Interstitielles Ödem (Pfeil), Alveoläres Ödem (\*), Bild 2: Epithelschaden (Pfeil),  
Hämorrhagie (\*), Bild 3: inflammatorische Infiltration (Pfeil), Überblähung (Dreieck),  
Alveoläres Ödem (\*), alle Bilder in H.E.-Färbung

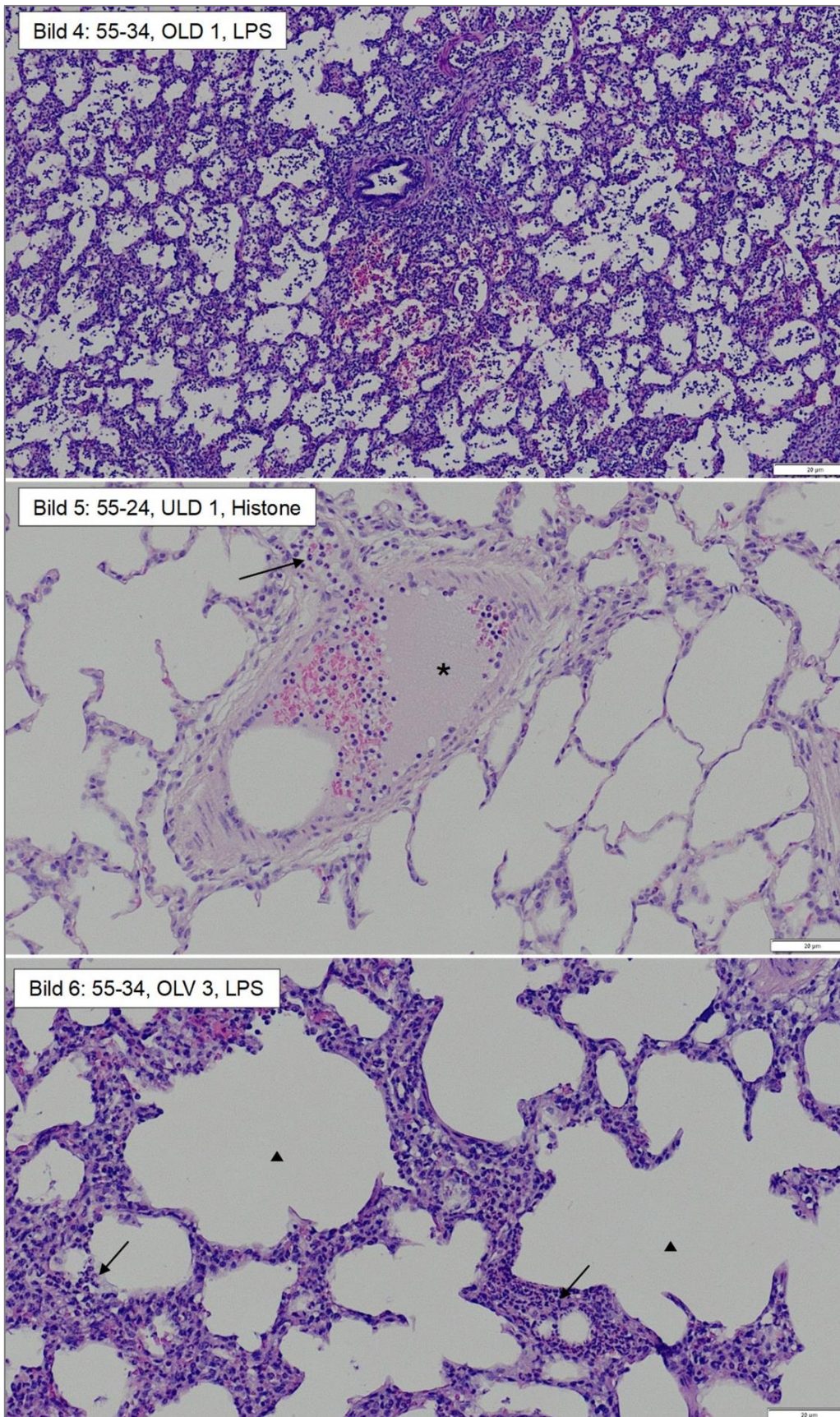


Abbildung 5: Einzelne Lungenschadensparameter im histologischen Schnitt  
Bild 4: Inflammatorische Infiltration mit Atelektasenbildung, Bild 5: inflammatorische Infiltration (Pfeil), interstitielles Ödem (\*), Bild 6: inflammatorische Infiltration (Pfeil), Überblähung (Dreieck), H.E.-Färbung

### 3 Material und Methodik

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte

Beatmungsgerät	Engström Care Station, GE Healthcare (Frankfurt a.M., DE))
Überwachungsmonitor	S5, Datex Ohmeda GmbH (Duisburg, DE)
Perfusor	Braun Perfusor FM, Melsungen AG (Melsungen DE)
Infusomat	Volumed 5000 Diabolo, Fresenius Kabi AG (Bad Homburg, DE)
Fiberoptik	aScope 4 Broncho Regular, Ambu GmbH (Bad Nauheim, DE)
Bildschirm Fiberoptik	aView, Ambu GmbH (Bad Nauheim, DE)
Ultraschall	Sonosite MicroMaxx, Ultrasound System, Fujifilm (Bothell, USA)
Ultraschall-Kopf	Sonosite MicroMaxx, HFL38/13-6 MHz, Fujifilm, (Bothell, USA)
Zerebrale Oximetrie	Invos 5100C Oximeter cerebral/somatic, Medtronic (Minneapolis, USA)
Arterielle O <sub>2</sub> -Messung	NeoFox-GT, Ocean Insight (Largo, USA)
Pulsoximetrie	Masimo Radical 7, Masimo Corporation (Irvine, USA)
Drucküberwachung	LogiCal, Smiths Medical GmbH (Grasbrunn, DE)
MIGET	Oscilygy LCC, Folsom (Pennsylvania, USA)
Temperaturmesssonde	rektal, TCAT-2DF Controller (New Jersey, USA)
HZV-Messung	PiCCO <sub>2</sub> , PULSION Medical Systems SE (Feldkirchen, DE)
Wärmesystem	Warmtouch, Patient Warming System, Medtronic (Minneapolis, USA)
Blutgasanalysator	BGA ABL 90 Flex, Radiometer (Krefeld, DE)
Pipetten	100-1000 µl, Eppendorf AG (Hamburg, DE)
Zentrifuge	EBA 3S, Andreas Hettich GmbH & Co.KG (Tuttlingen, DE)
Waage	Ohaus CS200, (Asslar, DE)

Wobbelgenerator	Model 8202, Voltcraft (Hirschau, DE)
Mastermill	MM 300, Retsch (Haan, DE)
RNA-Bestimmung	Heidolph REAX control (Wiesbaden, DE)
Mikroskop	Olympus CX 43, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH (Münster, DE)
Digitalkamera	Super Fine Camera, CCD Camera, Sony (Tokio, JP)
Gerät zur H.E.-Färbung	Dako CoverStainer Aglient (Santa Clara, US)
System zur Paraffineinbettung	MEDITE TES 99 MEDITE Medical GmbH (Burgdorf, DE)
Mikrotom	Thermo Scientific HM355 S Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)

### 3.1.2 Medikamente

Midazolamhydrochlorid	Midazolam 10mg, Hameln Pharmaceuticals GmbH (Hameln, DE)
Ketaminhydrochlorid	Ketamin 50mg, Hameln Pharmaceuticals GmbH (Hameln, DE)
Azaperon	Stresnil 80mg, Lilly Deutschland GmbH, Abteilung Elanco Animal Health (Bad Homburg, DE)
Fentanylcitrat	Fentanyl 0,05mg/ml, Janssen-Cilag GmbH (Neuss, DE)
Propofol	Propofol 2% 20mg/ml, Fresenius Kabi Deutschland GmbH (Bad Homburg, DE)
Atracuriumbesilat	Atracurium 50mg/5ml, Hikma Pharma GmbH (Martinsried, DE)
Sterofundin	Sterofundin 1/1 E ISO 1000ml, B.Braun Melsungen AG (Melsungen, DE)
Norepinephrin	Arterenol 5mg/50ml, Sanofi-Aventis GmbH (Frankfurt a.M., DE)
Epinephrin	Supraenin 1mg/ml, 25ml Durchstechflasche, Sanofi-Aventis GmbH (Frankfurt a.M., DE)
Kaliumchlorid	1 M Kaliumchlorid Lösung 7,46% 20ml, B.Braun Melsungen AG (Melsungen, DE)
Amiodaron HCL	Amiodaron HCL 150mg/ml, Hikma Pharma GmbH (Martinsried, DE)

Glukose 5% & 40%	Glukose 5% & 40%, B.Braun Melsungen AG (Melsungen, DE)
Formalinaldehydlösung 4%	Roti-Histofix 4 % Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE)
Natriumchlorid	NaCl 0,9%, B.Braun Melsungen AG
Arginin Vasopressin	Pitressin 20 IE/ml, Pfizer Inc. (New York City, US)

### 3.1.3 Verbrauchsmaterial

Beatmungsmaske	Midmark Corporation (Miamisburg, US)
Tubus 7.0/ 7.5	steriler Endotrachealtubus, Wirutec Rüschi (Sulzbach, DE)
Laryngoskop	Rüschi + Welsh Allyn 69604, Wirutec Rüschi (Sulzbach, DE)
Macintosh-Spatel	Stainless Gr. 4, Wirutec Rüschi (Sulzbach, DE)
Beatmungsbeutel	SPUR II, Ambu GmbH (Bad Nauheim, DE)
Magensonde	Salem Sump PVC, Medtronic (Minneapolis, USA)
Sekretbeutel	Sekretbeutel mit NRV, ASID BONZ GmbH (Herrenberg, DE)
Venenverweilkanüle	Vasofix Safety 22G-16G, B. Braun Melsungen AG (Melsungen, DE)
Perfusorspritze	Original-Perfusor-Spritze 50ml, B. Braun Melsungen AG (Melsungen, DE)
Perfusorleitung	Injectomat line 150cm, Fresenius Kabi (Bad Homburg, DE)
Infusionsbesteck	Infusionsset, Codan Medizinische Geräte (Lensahn, DE)
Zerebraler Oximetriesensor	INVOS Cerebral/Somatic Adult Sensor, Medtronic (Minneapolis, USA)
Blutröhrchen	Monovette Serum Gel/Li-Hep-Gel/EDTA-K/Luer-Lock-Adapter, Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, DE)
Spritzen	Discardit II 1,2,5,10,20 ml, Becton Dickinson, BD (Franklin Lakes, USA)
3-Wege-Hahn	Luer connecta, Becton Dickinson BD (Franklin Lakes, USA)
Kombistopfen	Combi Stopper, B Braun (Melsungen, DE)

Aufziehkanüle	Microlance 3 20G, Becton Dickinson BD (Franklin Lakes, USA)
Punktionskanüle	Seldinger Nadel mit Fixierflügel, Smiths Medical Deutschland(Grasbrunn, DE)
Desinfektionsmittel	Octeniderm farblos, Schülke & Mayr GmbH (Norderstedt, DE)
ZVK-Lege-Set	ZVK-Lege-Set, Version 5Wagner Kliniksbedarf (Remscheid, DE)
Gefäßschleuse	Radifocus Introducer Schleuse Fr. 5/6/7/8,10cm, Terumo International Systems, (Shibuya, Japan)
Gefäßschleuse	Percutaneous sheath introducer set 8,5/9 Fr, Arrow International, (Cleveland, USA)
Pulmonalkatheter	PA Katheter Swan Ganz 7,5 Fr 110 cm, Edwards Lifesciences Corporation, (Irvine, USA)
Thermodilutionskatheter	PiCCO Katheter 5F, Pulsion Medical Systems (München, DE)
DNA-Spray	RNaseZap-Spray, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Pipettenspitze	Quality Pipette Tips, Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, DE)
PiCCO Monitor System	Picco Monitoring Kit, Pulsion Medical Systems (München, DE)
Trennsäulen	QIAshredder, Quiagen (Hilden, DE)
Tubes	Collection Tubes, Quiagen (Hilden, DE)
Puffer	Buffer RPE, Quiagen (Hilden, DE)
Lösungsmittel	Lysis Reagent, Quiagen (Hilden, DE)
DNA-Lösung	gDNA-Eliminator Solution, Quiagen (Hilden, DE)
Histonlösung	Kalbsthymus Histone LS 00254 Worthington Biochemical Corp (Lakewood, NJ, USA)
Escherichia coli-Endotoxin	LPS; Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

### 3.1.4 Software

Bildsoftware zur Auswertung der histologischen Bilder	Olympus Soft Imaging Solution GmbH (Münster, DE)
Literaturverwaltungsprogramm	Endnote X9.3.3 (Bld 13 966), Clarivate Analytics (Philadelphia, US)

Statistikprogramm	IBM SPSS Statistics 27.0.1. IBM Deutschland GmbH (Ehningen, DE)
Tabellenkalkulationsprogramm	Excel Microsoft Corporation (Remond, US)
Textverarbeitungsprogramm	Word Microsoft Corporation (Remond, US)

---

## 3.2 Methodik

Der in dieser Arbeit beschriebene Versuch wurde durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz mit dem Aktenzeichen 23 177-07/ G17-1-018 genehmigt. Die Versuche, sowie die histologische Auswertung der Lungenschnitte wurden im Großtierlabor (Gebäude 911) der Klinik für Anästhesiologie an der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt. Aufbauend auf den Versuchen von Bosmann et al. an Mäusen und Ratten, sollte eine proinflammatorische Wirkung von extrazellulären Histonen im Schwein als Großtiermodell untersucht werden (Bosmann et al., 2013).

### 3.2.1 Versuchsprotokoll mit Gruppeneinteilung

Über einen Zeitraum von fünf Monaten wurden zwei Versuchstage pro Woche geplant, außer in den Urlaubszeiten der Versuchsmitarbeiter. Orientiert wurde sich während des Versuches an einem Protokoll (siehe Abbildung 6). Zusammenfassend wurde nach der Vorbereitung und erfolgreichen Instrumentierung die Messung der *Baseline Healthy* (BLH) durchgeführt. Daraufhin erfolgte die randomisierte Einteilung in die drei Interventionsgruppen (Sham, Histone und LPS). Die 24 Versuchstiere wurden dabei in gleichgroße Gruppen mit jeweils n= 8 randomisiert aufgeteilt und entsprechend behandelt. Die Schweine der Sham-Gruppe wurden mit 200ml Sterofundin behandelt. Weitere acht Schweine als Histon-Gruppe erhielten 200ml Sterofundin und 100mg Histonlösung. Die LPS-Gruppe erhielt 200ml Sterofundin und 20mg LPS-Lösung.

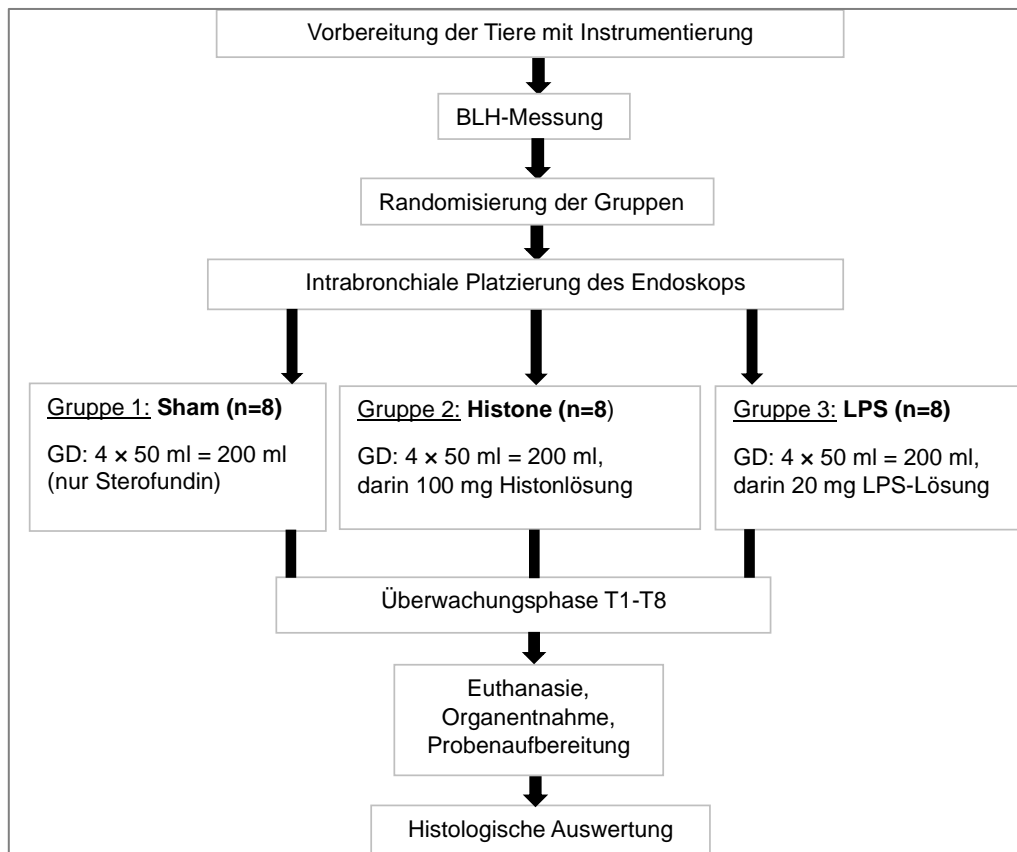


Abbildung 6: Versuchsprotokoll ARDS-55  
GD= Gesamtdosis, BLH= Baseline Healthy

### 3.2.2 Vorbereitung der Tiere mit Instrumentierung

Die Versuchstiere stammen aus einem vom Landesuntersuchungsamt empfohlenen regionalen Zuchtbetrieb. Es handelte sich um 24 vorwiegend männliche, deutsche Hausschweine (*Sus scrofa domesticus*) im Alter von 12 - 16 Wochen mit einem Gewicht zwischen 28 kg und 35 kg. Ausschlusskriterien waren Vorerkrankungen der Tiere wie beispielsweise eine Infektion, größere Verletzungen oder Auffälligkeiten in der BGA. Ein Tier wurde innerhalb der Überwachungsphase zum Zeitpunkt T6 aufgrund von septisch bedingtem Tod aus der Gruppe mit LPS-Behandlung ausgeschlossen.

Die Beschreibung des Versuchsablauf bezieht sich im Folgenden auf ein einzelnes Versuchstier. Am Morgen eines Versuchstages wurde das zuvor gemäß der deutschen Tierschutzverordnung auf Krankheiten untersuchte, nüchterne Schwein vom Züchter (Lindenhof, Herr Eisenmenger) auf seinem Hof durch eine intramuskuläre Injektion mit Azaperon (4mg/kg, Lilly Deutschland GmbH, Bad Homburg (DE)) und Midazolam (0,4mg/kg, Hameln Pharmaceuticals GmbH, Hameln (DE)) analgosediert. Nach dem Transport in einer artgerechten Box erfolgte vor Gebäude 911 der Universitätsmedizin Mainz die Übergabe an das Versuchsteam.

Im Großtierlabor wurde eine Ohrtrandvene mittels einer Verweilkanüle (Vasofix Safety, 22 Gauge) kanüliert und das Schwein durch Kontrolle der peripher gemessenen Sauerstoffsättigung im Blut ( $\text{SpO}_2$ ) mittels Pulsoximetrie am Ohr (Masimo Radical 7, Masimo Corporation, Irvine (US)) mit einer inspiratorischen Sauerstoffkonzentration ( $\text{FiO}_2$ ) von 100% durch geübte Maskenbeatmung (Midmark Corporation, Miamisburg (US)) ausreichend präoxygeniert. Die Anästhesieeinleitung erfolgte am durch 4-Punkt-Fixierung gesicherten Schwein. Die *Total Intravenöse Anästhesie* (TIVA) mit Fentanyl ( $4\mu\text{g}/\text{kg}$ , Janssen-Cilag GmbH, Neuss (DE)) und Propofol ( $2\text{ mg}/\text{kg}$ , Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg (DE)) diente der Sedierung und die Gabe von Atracurium ( $0,5\text{ mg}/\text{kg}$ , Hikma Pharma GmbH, Martinsried (DE)) sorgte für eine Relaxation.

Anschließend erfolgte mit einem Standard-Endotrachealtubus (ID 6,0–7,0 mm, Wirutec Rüschi Medical Vertriebs GmbH, Sulzbach (DE)) unter direkter Laryngoskopie oder mittels einem flexiblen Einweg-Videoendoskop (Ambu GmbH, Bad Nauheim, (DE)) die endotracheale Intubation, um den Atemweg zu sichern. Die korrekte Lage wurde durch Auskultation und Kapnometrie kontrolliert. Die Ventilation am Beatmungsgerät (Engström Carestation, General Electrics, Frankfurt a.M. (DE)) wurde volumenkontrolliert (VCV) mit einem Atemzugvolumen (AZV) von 6-8 ml/kg, einem inspiratorischen Spitzendruck (Ppeak) von 30 mbar, einem positiv-endexpiratorischen Druck (PEEP) von 5-10 mbar und einer Inspiration-zu-Expiration-Zeit (I:E-Verhältnis) von 1:2 durchgeführt. Mit einer  $\text{FiO}_2$  von 40% sollte der  $\text{SpO}_2$ -Wert stets über 93% liegen, ein Schema zur eventuellen Eskalation bei Verschlechterung lag vor. Die Frequenz wurde außerdem nach dem endexpiratorischen Kohlendioxid-Wert ( $\text{etCO}_2$ ) festgelegt und variierte bei einem Zielwert von 35 - 45 mmHg zwischen 20 - 30/ min.

Die über die gesamte Versuchsdauer verabreichte Analgosedierung mit Fentanyl ( $8 - 12\mu\text{g}/\text{kg}$ ) und Propofol ( $5 - 10\text{mg}/\text{kg}$ ) wurde durch Spritzenpumpen (Perfusor fm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen (DE)) aufrechterhalten. Ergänzend erhielt das Schwein bis zum Versuchsende über einen Infusomaten (Volumed 5000 Diabolo, Fresenius Kabi AG, Bad Homburg (DE)) eine Vollelektrolytlösung mit  $5\text{ ml}/\text{kg}$  pro Stunde (h).

Über einen Überwachungsmonitor (S5, Datex Ohmeda GmbH, Duisburg (DE)) wurden kontinuierlich der Blutdruck (RR), ein Elektrokardiogramm (EKG), die Herzfrequenz (HF) und der Kohlendioxid-Wert ( $\text{CO}_2$ ) abgeleitet.

Zum Schutz vor Aspiration erhielt das Schwein außerdem eine Magensonde mit Drainagebeutel. Zur Messung der Körperkerntemperatur diente ein rektal eingeführtes Thermometer (TCAT-2DF Controller, New Jersey (USA)), der Urin wurde über einen Blasendauerkatheter in einen Sekretbeutel abgeleitet.

Um die benötigten hämodynamischen Parameter während der Versuchsphase kontinuierlich ableiten zu können, wurden zentralvenöse und arterielle Zugänge in beide Leisten des Tieres platziert. Die Instrumentierung erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die zu punktierende Stelle in der Leiste wurde ausreichend desinfiziert und mit einem sterilen Lochtuch abgedeckt. Nachdem ultraschallgesteuert ein gut erreichbarer Punktionsort gefunden wurde, verwendete man die Seldinger-Technik bei der über die Punktionsnadel zuerst ein Draht zur Führung des Katheters vorgeschoben und dieser nach Dilatation über den liegenden Katheter entfernt wurde. Nach Lagekontrolle mittels Ultraschall wurde das Material fachgerecht fixiert und steril abgeklebt.

Die linke Vena femoralis wurde punktiert, um über eine 8 - 9 French (Fr) große Schleuse einen Pulmonalarterien-Katheter (PA-Katheter, auch Swan-Ganz-Katheter) retrograd durch den rechten Vorhof in die Pulmonalarterie einzuschwemmen, um dort den Druck im Gefäß (Wedge-Druck) zu messen. Dies erfolgte unter Kontrolle der Kurve des zentralvenösen Drucks (ZVD) am Überwachungsmonitor.

Die Punktion der linken Arteria femoralis diente zur Einlage einer 5 Fr-Schleuse, über welche dann ein Pulse Contour Cardiac Output-Katheter, kurz PiCCo-Katheter (Thermodilutionskatheter 5F, Pulsion Medical Systems, München (DE)) mit einem temperatursensitiven Widerstandselement platziert wurde. Dieser war mit einem Temperatursondenkabel, sowie einem Druckaufnehmer mit dem PiCCO-System am Monitor (Picco Monitoring Kit, Pulsion Medical Systems, München (DE)) verbunden. Neben dem arteriellen Teil des Picco-Systems benötigte man zur Messung der hämodynamischen Daten auch einen zentralvenösen Teil. Dieser wurde über einen Zentralvenösen-Katheter (ZVK), der durch eine 5 - 6-Fr-Schleuse gesichert war, in der rechten Vena femoralis etabliert. Über diesen ZVK wurde außerdem der ZVD abgeleitet.

### **3.2.3 Erhobene Parameter und deren Messzeitpunkte**

Im Anschluss an die Vorbereitung der Versuchstiere erfolgte die BLH-Messung. Durch diesen Ausgangspunkt, an dem eine gesunde bzw. vor der jeweiligen Intervention bestehende Physiologie gemessen wird, konnte durch Vergleichen mit den erhobenen Parametern aus den stündlichen Überwachungszeitpunkten T1-T8 eine Aussage bezüglich der Forschungshypothese gemacht werden.

Die BLH-Messung beinhaltete neben der Messung der Vitalzeichen eine arterielle und eine venöse Blutgasanalyse (BGA) welche durch einen vor Ort befindlichen Blutgasanalysator (BGA ABL 90 Flex, Radiometer, Krefeld (DE)) ausgewertet werden konnten. Über das PiCCo-System wurde durch die arterielle Pulskonturanalyse das Herzzeitvolumen (HZV), sowie der

mittlere arterielle Blutdruck (MAD) erhoben. Ein weiterer kontinuierlich erhobener, somit dynamischer Parameter war der Herzindex (CI), welcher mit der Einheit Volumen pro Minute den globalen Blutfluss darstellte. Die transpulmonale Thermodilution diente, neben der regelmäßig notwendigen Kalibrierung, der Erhebung weiterer statischer Parameter, die für die Fragestellung nicht relevant waren und somit in der Auswertung nicht näher betrachtet wurden.

Es erfolgte eine kontinuierliche Ableitung der pulmonalen Werte, die über die Spirometrie erzeugt wurden. Außerdem wurden die hämodynamischen Parameter, die Temperatur und die Oxygenierung kontinuierlich abgeleitet. Stündlich wurden die Werte der arteriellen und gemischtvenösen BGA erhoben. Zum Zeitpunkt BLH, T4 und T8 wurde zusätzlich Blut zur Analyse von Blutbild, Laktat, Leukozyten und Inflammationsmarkern (IL-6, TNF- $\alpha$ ) entnommen. Abbildung 7 gibt einen Überblick des Versuchsablaufes:

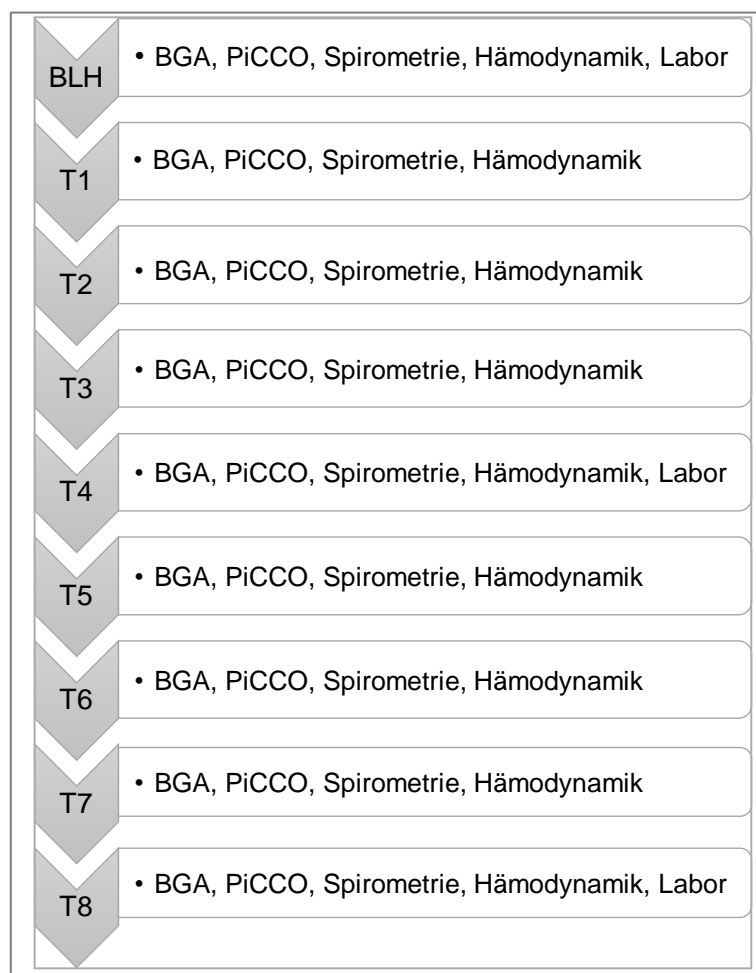


Abbildung 7: Übersicht der Parameter-Erhebung während der Messzeitpunkte BLH bis T8

### 3.2.4 Intra bronchiale Applikation

Nach standardisierter und an anderer Stelle publizierter Vorgehensweise durch Ruemmler et al. erfolgte die intra bronchiale Applikation von Sterofundin, LPS oder Histonen mittels intra bronchial platziertem Bronchoskop (Ruemmler et al., 2021).

Auf eine zügige Injektion von je 50ml in den rechten und linken Hauptbronchus, folgte eine abwartenden Phase, in der das Schwein hämodynamisch beobachtet wurde. Die Behandlung von weiteren jeweils 50 ml in den rechten und linken Hauptbronchus ohne oder mit LPS bzw. Histonen je nach Interventionsgruppe schloss die Behandlung ab.

Die Sham-Gruppe erhielt vier Mal 50ml, insgesamt 200ml Sterofundin. Die LPS-Gruppe erhielt zusätzlich ein Escherichia coli-Endotoxin (LPS; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Dabei diente das Sterofundin als Lösungsmittel. Die Histon-Gruppe erhielt zusätzlich ein aus Kalbsthymus gewonnenes Histon-Gemisch (Worthington, Lakewood, NJ, USA). Auch hier diente das Sterofundin als Lösungsmittel.

### 3.2.5 Überwachung der Schweine und Versuchsbeendigung

Im intensivmedizinischen Setting erfolgte die kontinuierliche Überwachung der Versuchstiere während des gesamten Versuches. Stündlich wurden die oben genannten Messparameter erhoben. Es erfolgte eine Noradrenalin-Gabe, um den MAD über 60 mmHg zu halten. Bei einem Blutzucker (BZ) von unter 80 mg/dl wurde Glukose gegeben. Eine Anpassung der Beatmungsparameter erfolgte bei einer SpO<sub>2</sub> von unter 93%. Der Kadaver wurde in der dafür zuständigen Einrichtung des Klinikums fachgerecht entsorgt.

### 3.2.6 Organentnahme und Aufbereitung der Lungenschnitte

Im direkten Anschluss an den Zeitpunkt T8 erhielt das Tier nach Vertiefung der Sedierung mittels Propofol eine tödliche zentralvenöse Injektion von 10 mg/kg Propofol (Propofol 2% 20 mg/ml, Fresenius Kabi Deutschland GmbH) und 2 mval/kg Kaliumchlorid (1 M Kaliumchlorid Lösung 7,46% 20ml, B.Braun Melsungen AG (Melsungen, DE)).

Der Thorax des Schweines wurde unterhalb des Rippenbogens eröffnet. Durch Abklemmen der Trachea nach einer Inspiration durch das Beatmungsgerät konnten die Lungenflügel gebläht und in diesem Zustand entnommen werden. Das entnommene Organ wurde fotografisch dokumentiert (siehe Abbildung 8). Aus dem linken Lungenflügel des Versuchstieres wurden folgende Proben gewonnen:

Tabelle 2: Vorgehen der pulmonalen Probengewinnung aus dem linken Lungenlappen

Lungenbereich	Vorgehen nach Protokoll
Oberlappen links (OLV und OLD)	2x2x0,5 cm Gewebestück, in Formalin, Histokassette
Oberlappen links	3x1 cm Gewebestücke, DNA-frei/ RT-PCR, 3x Tube
Unterbappen links (ULV und ULD)	2x2x0,5 cm Gewebestück, in Formalin, Histokassette
Unterbappen links	3x1 cm Gewebestücke, DNA-frei/ RT-PCR, 3x Tube

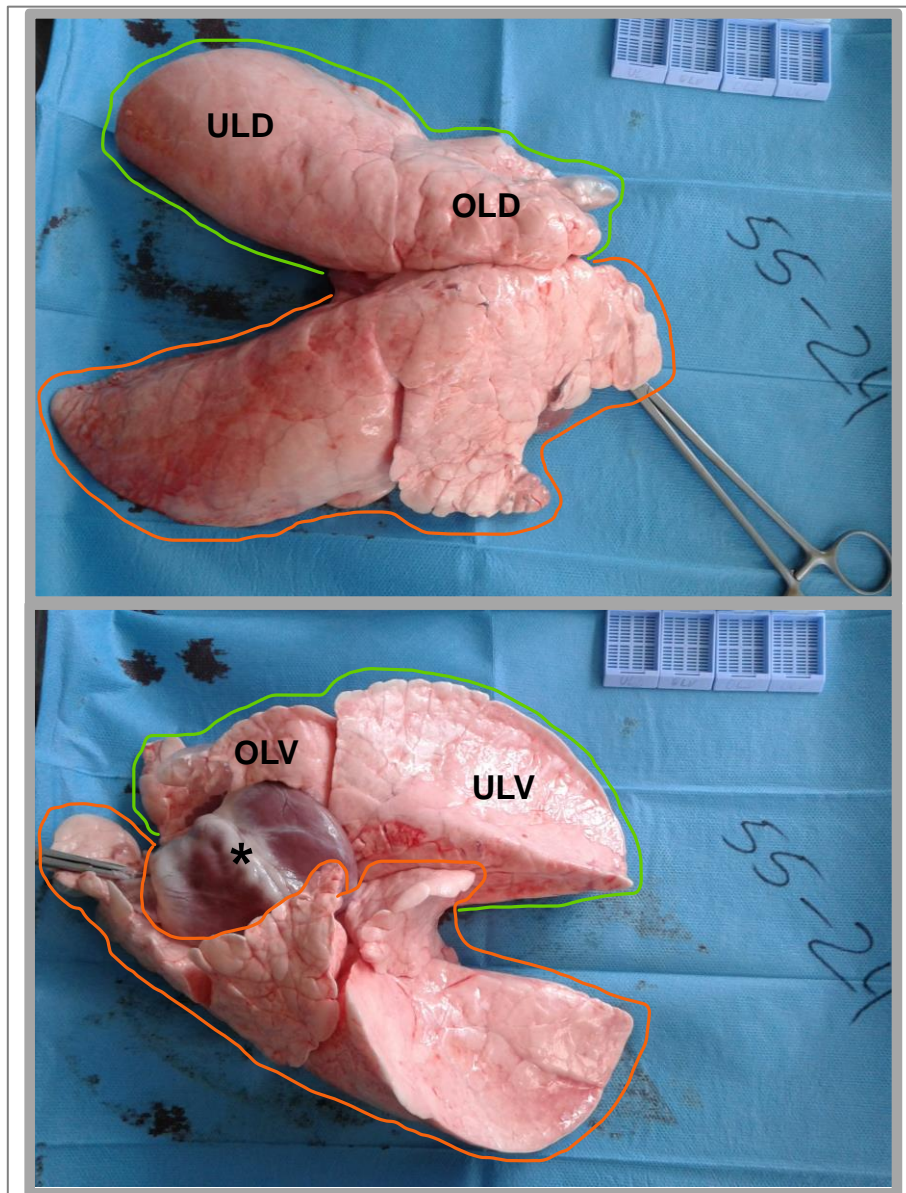


Abbildung 8: Fotografische Darstellung einer Schweinelunge (ARDS 55-24, Sham)

Dorsale (oben) und ventrale (unten) Darstellung mit linkem (grün) und rechtem (orange) Lungenlappen und dem Herz (\*), dabei Unterteilung des linken Lungenlappens in ventralen Oberlappen (OLV) und ventralen Unterlappen (ULV) und dorsalen Oberlappen (OLD) und dorsalen Unterlappen (ULD)

Vor Anfertigung der Proben aus den jeweiligen Lungenbereichen wurden die kühle Arbeitsfläche, sowie die Instrumente mit einem RNase-Spray behandelt. Die in speziellen Kassetten gelagerten Lungenproben konnten vor Ort in 4%-iger Formalinlösung fixiert und durch einen Pathologen der Gewebe-Biobank des Instituts für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz weiterbearbeitet werden.

Die vier Schritte dabei waren die Fixierung, das Einbetten, das Schneiden und die Färbung. Die Fixierung erfolgte direkt nach der Anfertigung der Lungenproben bereits im Tierversuchslabor. Durch einen Wasserentzug mittels aufsteigender Alkoholreihe und anschließendem Zuführen eines verbindenden Stoffes (Xylol), erfolgte die Einbettung in das Paraffin. Umgesetzt wurde dieser Schritt durch ein Paraffineinbettssystem (MEDITE TES 99, MEDITE Medical GmbH, Burgdorf, DE). Aus den entstandenen Paraffinblöcken konnten dann mithilfe eines Mikrotoms (Thermo Scientific HM355 S, Thermo Fisher Scientific, Waltham, US) ca. 2 µm dicke Schnitte angefertigt werden. Nach Streckung in einem Wasserbad wurden die Objektträger mit den Lungenschnitten bestückt. Als letzter Schritt folgte dann protokollgetreu die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung) durch ein dafür entwickeltes Gerät (Dako CoverStainer, Aglient, Santa Clara, US) (Färbeprotokoll im Anhang). Durch die H.-E.-Färbung kann das Lungengewebe gut dargestellt werden, Zellkerne stellen sich blau-violett und Zytoplasma rosa dar.

### 3.2.7 Histopathologische Auswertung

Die Histologische Auswertung erfolgte anhand eines bereits beschriebenen Scores (Ziebart et al., 2014b, Ziebart et al., 2015, Spieth et al., 2007). Die verblindete Bewertung orientierte sich dabei an den bereits in Kapitel 2.5 beschriebenen sieben Parametern: *Alveoläres Ödem*, *Interstitielles Ödem*, *Hämorrhagie*, *Inflammatorische Infiltration*, *Epitheliale Zerstörung*, *Mikroatelektasen* und *Überblähung* der Lungenalveolen.

Pro Schweinelunge wurden vier Schnitte ausgewertet: Oberlappen ventral (OLV), Unterlappen ventral (ULV), Oberlappen dorsal (OLD) und Unterlappen dorsal (ULD). Ein Schnitt wurde in vier Felder eingeteilt, welche einzeln bewertet wurden. Zusätzlich wurde pro Schnitt ein Überblicks-Wert erhoben (Overview) (siehe Abbildung 10). Jedes der vier Felder eines Lungenschnittes wurde nach den einzelnen Parametern mit einem Faktor zwischen null und fünf belegt. Null stand dabei für „keine Ausprägung“, fünf wurde bei sehr starker Ausprägung vergeben. Außerdem wurde ein zusätzlicher Faktor für den Überblick (Overview) vergeben. Daraus ergibt sich ein möglicher Maximalwert von 175 Punkten pro Lungenschnitt:

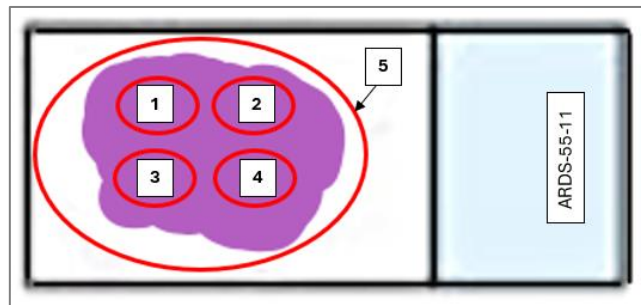


Abbildung 9: Vorgehen der Auswertung eines histologischen Lungenschnittes

Aufteilung nach vier sich nicht überlappenden Feldern (1-4), sowie einem Überblick (5), am Beispiel ARDS-55-11

Mithilfe eines Tabellenkalkulationsprogramm (Excel Microsoft Corporation (Remond, US)) konnte eine Datei geschaffen werden, die für jeden Lungenschnitt pro Parameter und pro Lungenbereich (OLV, OLD, ULV, ULD) die Werte der einzelnen Felder und den jeweiligen Overview-Wert erfasst. Am Beispiel ARDS-55-11 soll die Vorgehensweise veranschaulicht werden (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Wertebelegung der einzelnen Felder (oben) und des Überblicks (unten) in Excel

FIELDS	Schwein 55 11							
	OLV		OLD		ULV		ULD	
alveolar edema	2	1	3	1	3	2	4	5
	3	1	3	1	3	2	2	2
interstitial edema	2	2	2	3	1	1	4	4
	4	2	2	3	3	1	4	3
hemorrhage	0	2	1	2	1	1	0	1
	1	1	1	3	1	0	1	2
infl. infiltration	3	2	1	2	2	2	3	4
	3	3	3	4	4	1	4	3
epithelial destruction	4	2	2	3	2	3	5	5
	3	1	3	2	3	4	5	3
microatelectasis	1	1	1	0	0	0	4	3
	1	1	2	1	1	0	3	2
overdistension	4	3	1	2	4	5	4	2
	3	3	2	1	3	3	3	2
		Schwein 55 11						
OVERVIEW	OLV	OLD	ULV	ULD				
alveolar edema	2	2	3	3				
interstitial edema	3	3	2	4				
hemorrhage	1	2	1	1				
Infl. infiltration	3	3	2	4				
epithelial destruction	3	2	3	5				
microatelectasis	1	1	0	3				
overdistension	3	2	4	2				

Dabei Wertebelegung pro einzelnen Parameter pro Lungenbereich (OLV, OLD, ULV, ULD), Punktvergabe von 0 für „keine Ausprägung“ bis 5 „sehr starke Ausprägung“, am Beispiel ARDS-55-11

Die histologische Auswertung wurde zur besseren Darstellung der Ergebnisse zudem in drei verschiedene Scores eingeteilt (siehe Tabelle 4).

Der *Lobe Damage Score* (LDS) beschreibt die Schadensausprägung eines Lungenbereiches (OLV, OLD, ULV, ULD) und fasst dabei alle sieben Parameter zusammen. Der LDS entspricht dem LIS-Score von Ziebart et al. (Ziebart et al., 2015, Ziebart et al., 2014b). Dieser kann einen maximalen Wert von 175 Punkten haben. (Überblick-Wert bis maximal 35 Punkte und die Werte der vier Felder insgesamt bis maximal 140 Punkte).

Der *Parameter Damage Score* (PDS) beschreibt einen einzelnen Schadensparameter in der gesamten Lunge und kann Werte bis maximal 100 Punkte haben. (Überblicks-Wert bis maximal 20 Punkte und die Werte der vier Felder mal vier Lungenbereiche bis maximal 80 Punkte).

Als Überblick dient der *Total Damage Score* (TDS). Dieser bildet den Schaden der gesamten Lunge eines Versuchstieres ab und beinhaltet alle sieben Parameter und alle vier Lungenbereiche. Hier können Werte bis maximal 700 Punkte entstehen. (Vier mal 175 Punkte durch den LDS oder sieben Mal 100 Punkte durch den PDS).

*Tabelle 4: Zusammenfassung der Werte in die drei Schadensscores*

FIELDS SUM	OLV	OLD	ULV	ULD	LOBES SUM ONE PARAMETER	OVERVIEW SUM ONE PARAMETER	PARAMETER DAMAGE SCORE
<b>alveolar edema</b>	7	8	10	13	38	10	<b>48</b>
<b>interstitial edema</b>	10	10	6	15	41	12	<b>53</b>
<b>hemorrhage</b>	4	7	3	4	18	5	<b>23</b>
<b>infl. infiltration</b>	11	10	9	14	44	12	<b>56</b>
<b>epithelial destruction</b>	10	10	12	18	50	13	<b>63</b>
<b>microatelectasis</b>	4	4	1	12	21	5	<b>26</b>
<b>overdistension</b>	13	6	15	11	45	11	<b>56</b>
PARAMETER SUM ONE LOBE	<b>59</b>	<b>55</b>	<b>56</b>	<b>87</b>	<b>257</b>	<b>68</b>	
OVERVIEW SUM ONE LOBE	16	15	15	22			<b>TOTAL DAMAGE SCORE</b>
<b>LOBE DAMAGE SCORE</b>	<b>75</b>	<b>70</b>	<b>71</b>	<b>109</b>			<b>325</b>

*LDS (Lobe Damage Score, alle Parameter in einem Lungenbereich), PDS (Parameter Damage Score, ein Parameter in allen Lungenbereichen) und TDS (Total Damage Score, alle Parameter in allen Lungenbereichen summiert), orientiert am LIS-Score (Ziebart et al., 2014b), beispielhaft an ARDS-55-11*

### 3.2.8 Molekularbiologische Analyse

Um die Expressionsmenge der DNA von TNF- $\alpha$  und IL-6 aus den entnommenen Lungenproben zu erhalten, wurde eine RT-PCR im Labor der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt. Hierzu wurde die aus der Probe isolierte RNA in DNA umgeschrieben (complementary DNA = cDNA) um diese dann in einer Polymerase-Ketten-Reaktion zu vermehren und damit nachzuweisen.

Dabei wurde das frisch gewonnene Lungengewebe direkt auf einer durch RNase-Spray gesäuberten Fläche zurechtgeschnitten und in Pipetten befindlich in flüssigem Stickstoff gefroren. Nach der anschließenden Zerkleinerung des Gewebes für zwei Minuten konnte die Probe für drei Minuten zentrifugiert werden. Der dabei entstandene klare Flüssigkeit, der Überstand, wurde in ein neues Probengefäß überführt und 600  $\mu$ l 70 - prozentiges Ethanol hinzugegeben. Nach gründlichem Mischen konnten aus der entstandenen Lösung 700  $\mu$ l in eine dafür spezielle Säule überführt und bei Raumtemperatur für 15 Sekunden mit 10000 U/min zentrifugiert werden. Der sogenannte „DNA-Verdau“ auf der Säule konnte in folgenden Schritten umgesetzt werden:

- 1) Pipettierung von 350 $\mu$ l *RW1 Buffer* auf die Säule, 15 Sekunden bei 8000 x g waschen; dabei den Durchlauf verwerfen
- 2) 80 $\mu$ l *Dnase 1 Mix* auf den Filter pipettieren und bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubieren
- 3) Pipettierung von 350 $\mu$ l *RW1 Buffer* auf die Säule, 15 Sekunden bei 8000 x g waschen; den Durchlauf erneut verwerfen
- 4) 500 $\mu$ l *RPE Puffer* zugeben, bei 10000 rpm 15 Sekunden lang waschen; dabei den Durchlauf und Tube verwerfen
- 5) nochmals 500 $\mu$ l *RPE Puffer* einpipettieren und bei 8000 x g zwei Minuten zentrifugieren (trocknen)

Optional folgte noch das sogenannte Nachrocknen, ein Arbeitsschritt, bei dem die Säule eine Minute lang bei maximaler Geschwindigkeit betrieben wurde.

Das Herauslösen, die Eluierung erfolgte in einem frischen Reaktionsgefäß. Um die relevante RNA zu gewinnen, wurden 30 - 50 $\mu$ l Rnasefreies Wasser genau auf die Membran pipettiert und bei 10000 U/mi wurde für eine Minute zentrifugiert.

### 3.2.9 Statistik

Für die statistische Berechnung und die Visualisierung der Daten wurde SPSS (IBM SPSS Statistics 27.0.1. IBM Deutschland GmbH (Ehningen, DE)) genutzt.

Um zu untersuchen, ob es einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den drei Interventionsgruppen in Bezug auf den histologisch erhobenen Lungenschaden gibt, wurde bei Varianzgleichheit (mittels F-Test/Levene bestätigt) eine einfaktorische Varianzanalyse (*Analysis of Variance*, ANOVA) mit anschließendem Post-Hoc Test nach Scheffé zur exakten Diagnose durchgeführt.

Nicht normalverteilte Daten in der histologischen Auswertung wurden aufgrund der Annahme, dass die einfaktorische ANOVA relativ robust gegenüber Verletzungen ist, hingenommen (Blanca et al., 2017).

Für die Darstellung der Kreislauf- und Beatmungsparameter wurde eine gemischte Varianzanalyse berechnet, um die Vitalzeichen, sowie wie Ventilationsparameter als abhängige Variablen über die Zeit (BLH-T8) mehrfach aus den jeweiligen Interventionsgruppen zu erheben.

Eine Ablehnung der Nullhypothese, dass es keinen Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen gab, erfolgte mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von unter 5 %.

## 4 Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse unterteilt sich in die Daten für die primären Endpunkte dieser Arbeit, welche durch das post-mortem gewonnene Lungenmaterial erhoben werden konnten. Hier sind zum einen die histologische Datenerhebung anhand des Lungenschadenscores zu nennen, sowie die mittels RT-PCR gewonnenen Werten von IL-6 und TNF- $\alpha$ . Die sekundären Endpunkte ergeben sich aus den statistisch analysierten Kreislauf- und Beatmungsparametern.

Die 24 Versuchstiere (siehe Tabelle 5) wurden randomisiert und verblindet in die drei Interventionsgruppen aufgeteilt, wie schon in Kapitel 3.2.1 beschrieben. Die erhobenen Versuchsdaten des Tieres ARDS-29 konnten nur bis T6 gewonnen werden, da das Tier im Versuchsverlauf verstarb. Daraus ergibt sich eine Anzahl  $n = 8$  für BLH bis T6 für alle drei Interventionsgruppen. Zum Zeitpunkt T8 konnten für die LPS-Gruppe  $n = 7$ , für die Histon- und die Sham-Gruppe  $n = 8$  Tiere berücksichtigt werden.

*Tabelle 5: Randomisierte und verblindete Einteilung der Versuchstiere in die Interventionsgruppen*

Histone	LPS	Sham
ARDS 55-12	ARDS 55-13	ARDS 55-11
ARDS 55-14	ARDS 55-15	ARDS 55-19
ARDS 55-16	ARDS 55-18	ARDS 55-20
ARDS 55-17	ARDS 55-21	ARDS 55-22
ARDS 55-24	ARDS 55-26	ARDS 55-23
ARDS 55-25	ARDS 55-29 bis T6	ARDS 55-30
ARDS 55-27	ARDS 55-33	ARDS 55-31
ARDS 55-28	ARDS 55-34	ARDS 55-32

*Ausschluss des Tieres 55-29 nach T6*

### 4.1 Histologische Auswertung

#### 4.1.1 Der Lungenschaden im Überblick

Überblickend wird zunächst der TDS der mikroskopisch betrachteten histologischen Lungenschnitte pro Interventionsgruppe betrachtet. Durch die Berechnung einer ANOVA wurde dabei nach einem Unterschied in der Ausprägung des Gesamtschadens jeweiligen Interventionsgruppe gesucht.

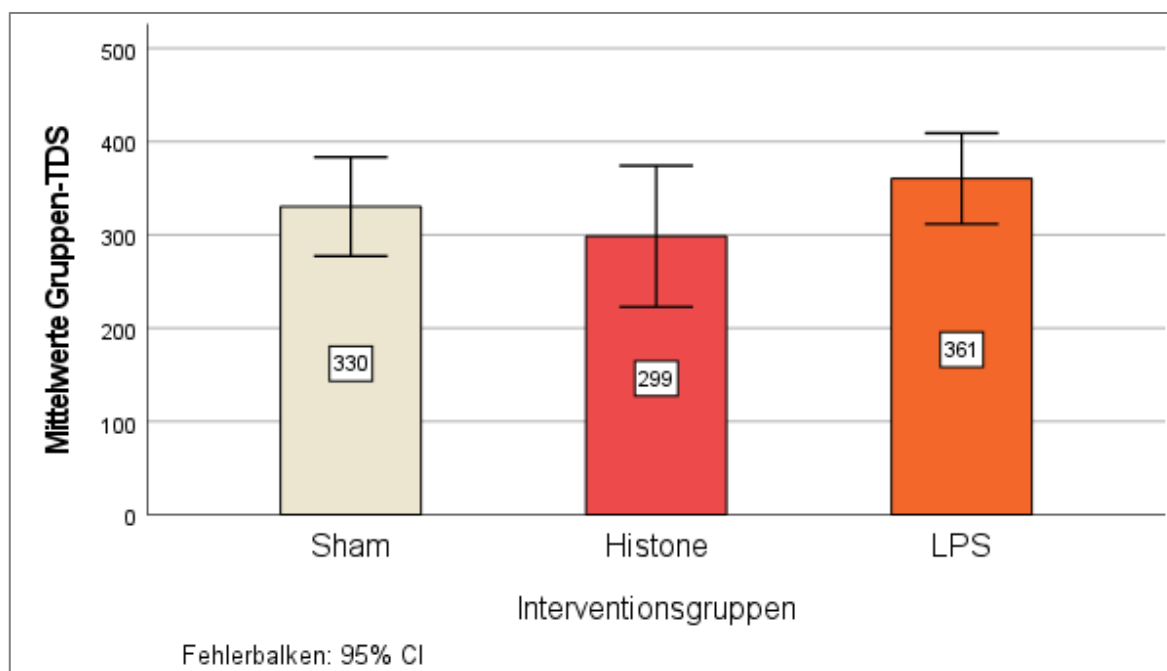


Abbildung 10: TDS pro Interventionsgruppe

Tendenz zu mehr Schadensausprägung in der Gruppe mit LPS-Behandlung, jedoch ohne statistische Signifikanz; angegeben in Mittelwerten aus allen Werten des TDS (0-700 P.) pro Interventionsgruppe (bis T6 n=8, T8: Sham- und Histone-Gruppe n=8, LPS n=7)

Der TDS variiert dabei in den drei Interventionsgruppen, wobei dieser in der LPS-Gruppe tendenziell am höchsten ausgeprägt ist: Sham (M = 330.38, SD = 63.480), Histone (M = 298.63, SD = 90.535) und LPS (M = 360.50, SD = 58.248). Es gibt keine Ausreißer (beurteilt mit dem Box-Plot). Unter den drei Interventionsgruppen kann durch Überprüfung mittels Levene-Test Varianzgleichheit angenommen werden ( $p = .607$ ). Eine Normalverteilung ist nach Überprüfung mit dem Shapiro-Wilk-Test in allen drei Interventionsgruppen gegeben (Sham  $p = .886$ , Histone  $p = .502$ , LPS  $p = .793$ ). Zwischen den drei Interventionsgruppen Sham, Histone und LPS gibt es keinen statistisch signifikanten Unterschied bezüglich der Ausprägung des TDS ( $F(2, 21) = 1.471$ ,  $p = .252$ ).

#### 4.1.2 Der Lungenschaden in einzelnen Parametern

Mittels ANOVA wurde nach Unterschieden in den Ausprägungen der sieben einzelnen, in Kapitel 2.5 beschriebenen Schadensparametern abhängig von der jeweiligen Interventionsgruppe gesucht. Hier dargestellt als der PDS.

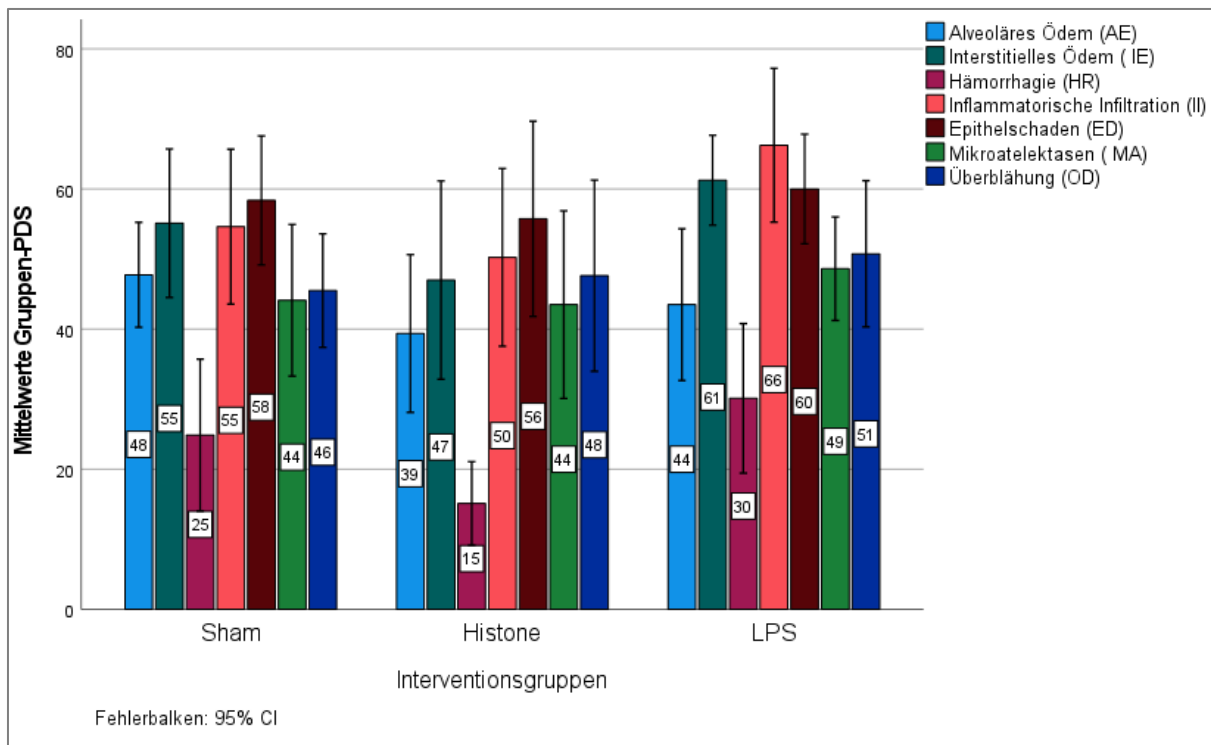


Abbildung 11: Ausprägung der Schadensparameter pro Interventionsgruppe, angegeben in Mittelwerten

Tendenz zu mehr Schadensausprägung in der Gruppe mit LPS-Behandlung außer bei alveoläres Ödem, jedoch ohne statistische Signifikanz; angegeben in Mittelwerten aus allen Werten des PDS (0-100 P.) pro Interventionsgruppe (bis T6 n=8, T8: Sham- und Histon-Gruppe n=8, LPS n=7)

Die Ausprägung des PDS zeigt eine Tendenz zur stärkeren Ausprägung aller Parameter in der LPS-Gruppe, außer bei *Alveoläres Ödem* (AE) (hier LPS: M = 43.50, SD = 12.95 und im Gegensatz dazu Sham: M = 47.75, SD = 8.96). So zeigen die Mittelwerte und die Standardabweichung in der LPS-Gruppe mit folgenden Werten stärkere Ausprägungen als in der Sham- und der Histongruppe.: *Interstitielles Ödem* (IE) (LPS: M = 61.25, SD = 7.67), *Hämorrhagie* (HR) (LPS: M = 30.13, SD = 12.77), *inflammatorische Infiltration* (II) (LPS: M = 66.25, SD = 13.13), *Epithelschaden* (ED) (LPS: M = 60.00, SD = 9.35), *Mikroatelektasen* (MA) (LPS: M = 48.63, SD = 8.85) und *Überblähung* (OD) (LPS: M = 50.75, SD = 12.49). Die Ausprägung des Parameters *Alveoläres Ödem* (AE) ist in der Gruppe mit Sham-Behandlung am stärksten (Sham: M = 47.75, SD = 8.96). Außerdem zeigt sich, dass in der Histon-Gruppe (Histone: M = 55.75, SD = 16.66), sowie in der Sham-Gruppe (Sham: M = 58.38, SD = 11.01) der *Epithelschaden* den größten Anteil der Schadensparameter hat, in der LPS-Gruppe sind *Interstitielles Ödem* und *Inflammatorische Infiltration* stärker ausgeprägt (s.o.).

Unter den drei Interventionsgruppen kann durch Überprüfung mittels Levene-Test Varianzgleichheit bezüglich aller Parameter angenommen werden ( $p = .749$  für *alveoläres Ödem* (AE),  $p = .272$  für *interstitielles Ödem* (IE),  $p = .456$  für *Hämorrhagie* (HR),  $p = .848$  für

*inflammatorische Infiltration* (II),  $p = .265$  für *Epithelschaden* (ED),  $p = .252$  für *Mikroatelektasen* (MA),  $p = .414$  für *Überblähung* (OD)).

Für die in Abbildung 11 dargestellten einzelnen Schadensparameter ergibt sich ein statistisch signifikanter Unterschied für *Hämorrhagie* (HR) ( $F(2, 21) = 3.639$ ,  $p = .044$ ), welcher durch die Scheffé-Prozedur als Post-Hoc-Test bestätigt wird (Mittelwert-Differenz = -15.00, 95%-CI[-29.86, -.14])  $p = 0.048$ ). Für die weiteren Parameter ist der Unterschied nicht statistisch signifikant. ( $F(2, 21) = .980$ ,  $p = .392$  für *alveoläres Ödem* (AE),  $F(2, 21) = 2.425$ ,  $p = .113$  für *interstitielles Ödem* (IE),  $F(2, 21) = 2.842$ ,  $p = .081$  für *inflammatorische Infiltration* (II),  $F(2, 21) = .227$ ,  $p = .799$  für *Epithelschaden* (ED),  $F(2, 21) = .373$ ,  $p = .693$  für *Mikroatelektasen* (MA),  $F(2, 21) = .324$ ,  $p = .727$  für *Überblähung* (OD)).

#### 4.1.3 Der Lungenschaden nach Ober- und Unterlappen

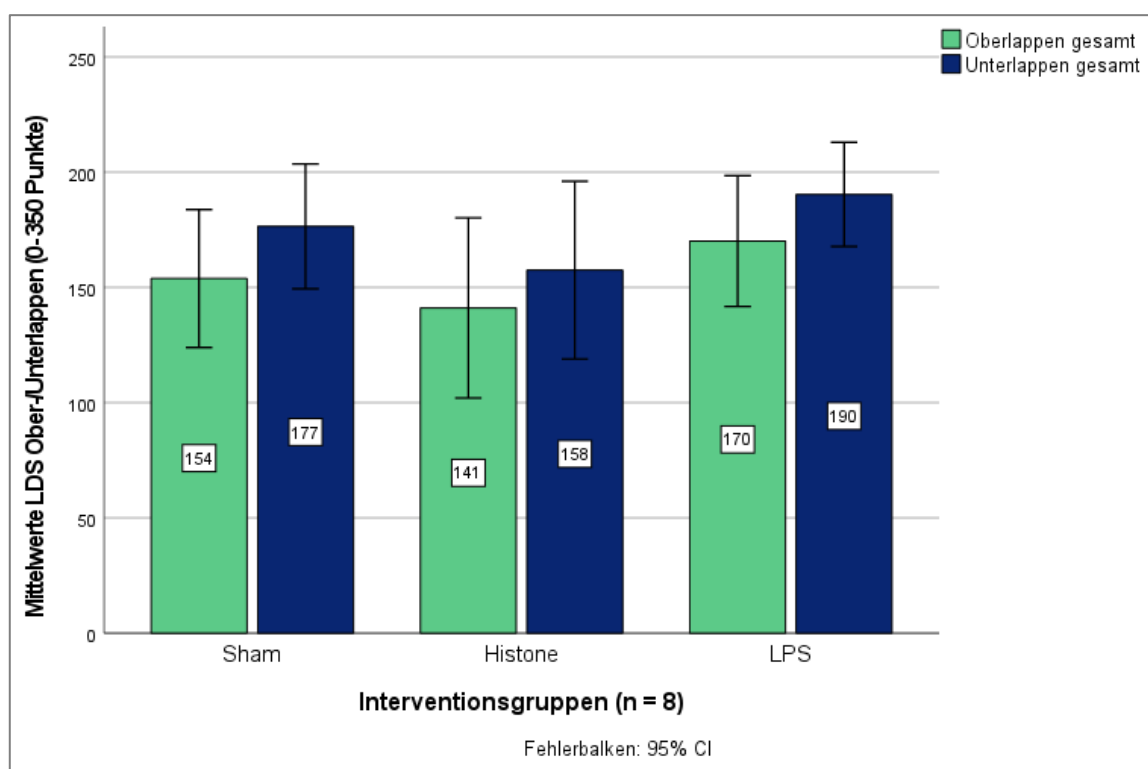


Abbildung 12: Lungenschaden nach gesamtem Ober- und Unterlappen

In allen drei Interventionsgruppen kommt es im Unterlappen (blau) tendenziell zu mehr Lungenschaden, dabei ohne statistische Signifikanz, angegeben in Mittelwerten aus den LDS-Werten (0-350 P.), aufgeteilt in Ober- und Unterlappen pro Interventionsgruppe (bis T6  $n=8$ , T8: Sham- und Histone-Gruppe  $n=8$ , LPS  $n=7$ )

Der Lungenschaden bezogen auf den gesamten Ober- und Unterlappen (Lobe Damage Score, LDS), zeigt in Abbildung 12 anhand der Mittelwerte in allen drei Interventionsgruppen eine Tendenz zu stärkerer Ausprägung im Unterlappen (Oberlappen: Sham:  $M = 153.89$ ,  $SD =$

35.81; Histone:  $M = 141.13$ ,  $SD = 46.75$ ; LPS:  $M = 170.13$ ,  $SD = 33.96$  und im Vergleich dazu: Unterlappen: Sham:  $M = 176.50$ ,  $SD = 32.37$ ; Histone:  $M = 157.50$ ,  $SD = 46.11$ ; LPS:  $M = 190.38$ ,  $SD = 27.06$ ).

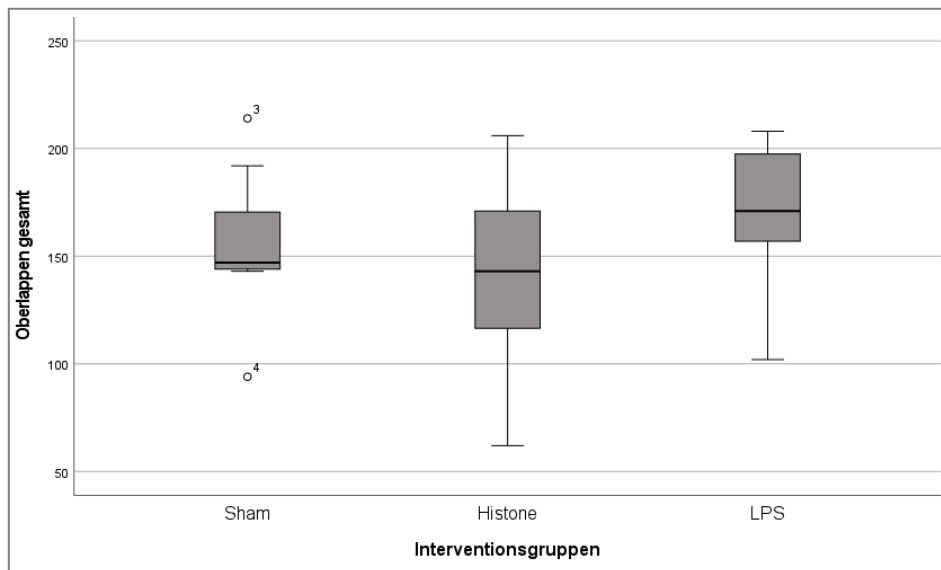


Abbildung 13: Lungenschaden im Oberlappen je Interventionsgruppe (bis T6  $n=8$ , T8: Sham- und Histon-Gruppe  $n=8$ , LPS  $n=7$ ), angegeben in Mittelwerten,

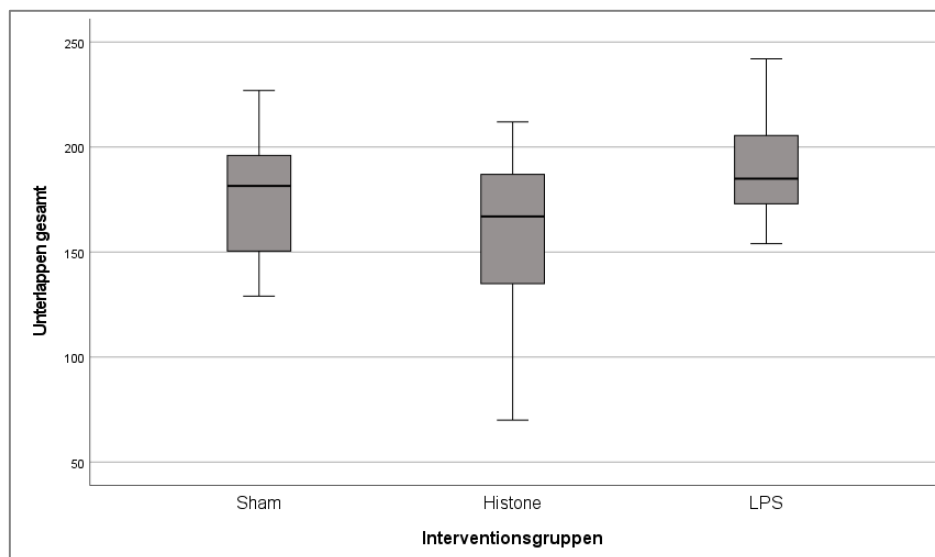


Abbildung 14: Lungenschaden im Unterlappen je Interventionsgruppe (bis T6  $n=8$ , T8: Sham- und Histon-Gruppe  $n=8$ , LPS  $n=7$ ), angegeben in Mittelwerten

Beurteilt nach den zugehörigen Box-Plots (Abbildung 13 und 14) können in der Sham-Gruppe des Oberlappens zwei Datenpunkte detektiert werden, die mehr als das 1,5-Fache des Interquartilsabstands haben und somit, als schwache Ausreißer geltend gemacht werden können. Hier wird zusätzlich ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt, der die Nullhypothese, dass es keinen Unterschied zwischen den gebildeten Rängen gibt, bestätigt (Oberlappen:

$H(2) = 3.192$ ,  $p = .203$ ; Unterlappen:  $H(2) = 2.420$ ,  $p = .298$ ). Durch Überprüfung mittels Levene-Test kann basierend auf dem Mittelwert Varianzgleichheit angenommen werden (Oberlappen:  $p = .257$ , Unterlappen:  $p = .734$ ). Eine Normalverteilung ist nach dem Shapiro-Wilk-Test in allen drei Interventionsgruppen gegeben (Oberlappen: Sham  $p = .201$ , Histone  $p = .661$ , LPS  $p = .381$ ; Unterlappen: Sham  $p = .887$ , Histone  $p = .352$ , LPS  $p = .726$ ).

Zwischen den drei Interventionsgruppen Sham, Histone und LPS gibt es keinen statistisch signifikanten Unterschied bezüglich der Ausprägung des LDS im Ober- und Unterlappen (Oberlappen:  $F(2, 21) = 1.097$ ,  $p = .352$ ; Unterlappen:  $F(2, 21) = 1.674$ ,  $p = .212$ ).

#### 4.1.4 Der Lungenschaden- ventral und dorsal

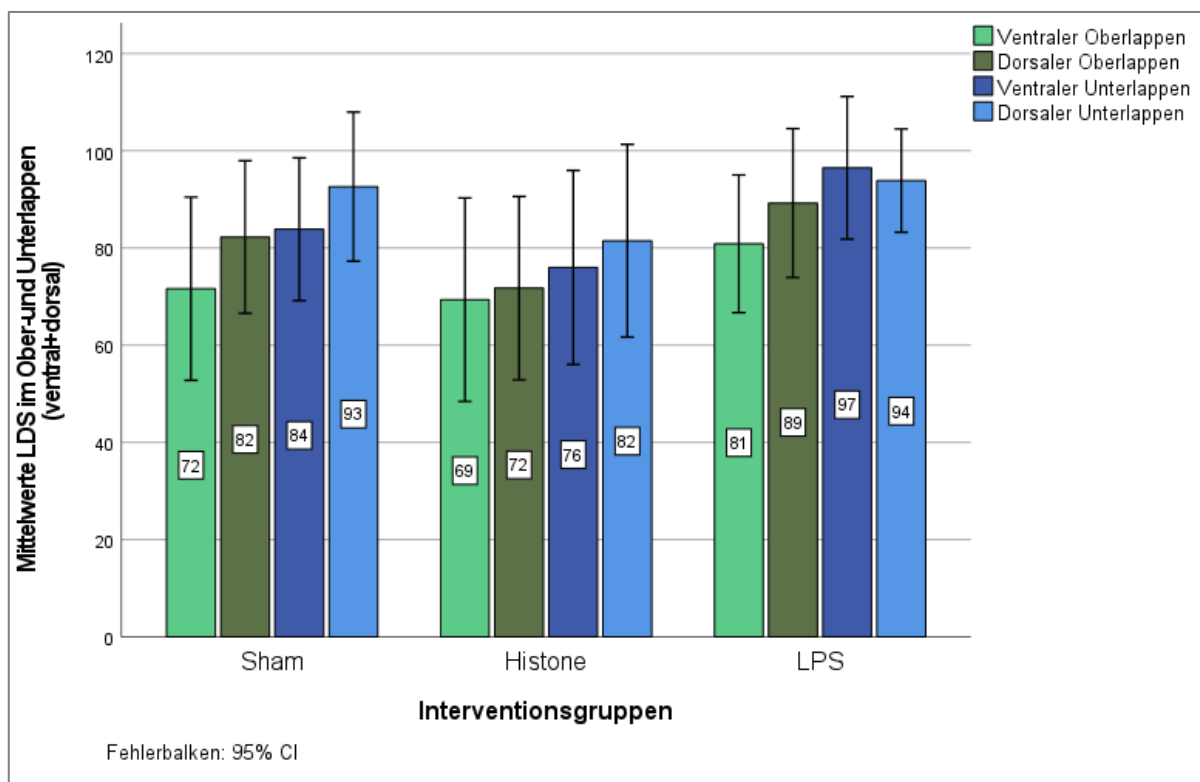


Abbildung 15: Lungenschaden des Ober- und Unterlappen

In zusätzlicher ventraler und dorsaler Unterteilung je Interventionsgruppe (Sham- und Histone-Gruppe  $n=8$ , LPS  $n=7$ ), angegeben in Mittelwerten

Der Lungenschaden bezogen auf den ventralen und dorsalen Oberlappen, sowie den ventralen und dorsalen Unterlappen, zeigt in Abbildung 15 anhand der Mittelwerte in allen drei Interventionsgruppen eine Tendenz zu stärkerer Ausprägung im Unterlappen, sowie eine Tendenz zur stärkeren Ausprägung des Schadens in den jeweiligen dorsalen Bereichen (Ober- und Unterlappen) (OLV: Sham:  $M = 71.63$ ,  $SD = 22.54$ ; Histone:  $M = 69.38$ ,  $SD = 25.05$ ; LPS:  $M = 80.88$ ,  $SD = 16.94$ ; OLD: Sham:  $M = 82.25$ ,  $SD = 18.77$ ; Histone:  $M = 71.75$ ,  $SD =$

22.56; LPS: M = 89.25, SD = 18.31; ULV: Sham: M = 83.88, SD = 17.55; Histone: M = 76.00, SD = 23.86; LPS: M = 96.50, SD = 17.55; ULD: Sham: M = 92.63, SD = 18.35; Histone: M = 81.50, SD = 23.71; LPS: M = 93.88, SD = 12.69).

Durch Überprüfung mittels Levene-Test kann basierend auf dem Mittelwert Varianzgleichheit angenommen werden (OLV:  $p = .350$ , OLD:  $p = .162$ , ULV:  $p = .465$ , ULD:  $p = .522$ ). Eine Normalverteilung ist nach dem Shapiro-Wilk-Test in allen drei Interventionsgruppen gegeben. Zwischen den drei Interventionsgruppen Sham, Histone und LPS gibt es keinen statistisch signifikanten Unterschied bezüglich der Ausprägung des LDS in den vier Lappenbereichen (OLV:  $F(2, 21) = .627$ ,  $p = .544$ ; OLD:  $F(2, 21) = 1.556$ ,  $p = .234$ ; ULV:  $F(2, 21) = 2.164$ ,  $p = .140$ ; ULD:  $F(2, 21) = 1.051$ ,  $p = .367$ ).

#### 4.2 Molekularbiologische Analyse von TNF- $\alpha$ und IL-6

Für die molekularbiologische Analyse zur Detektion der proinflammatorischen Marker TNF- $\alpha$  und IL-6 wurden die aus dem linken Ober- und Unterlappen entnommenen Lungenproben zur Messung mittels RT-PCR aufgearbeitet (siehe Kapitel 3.2.8).

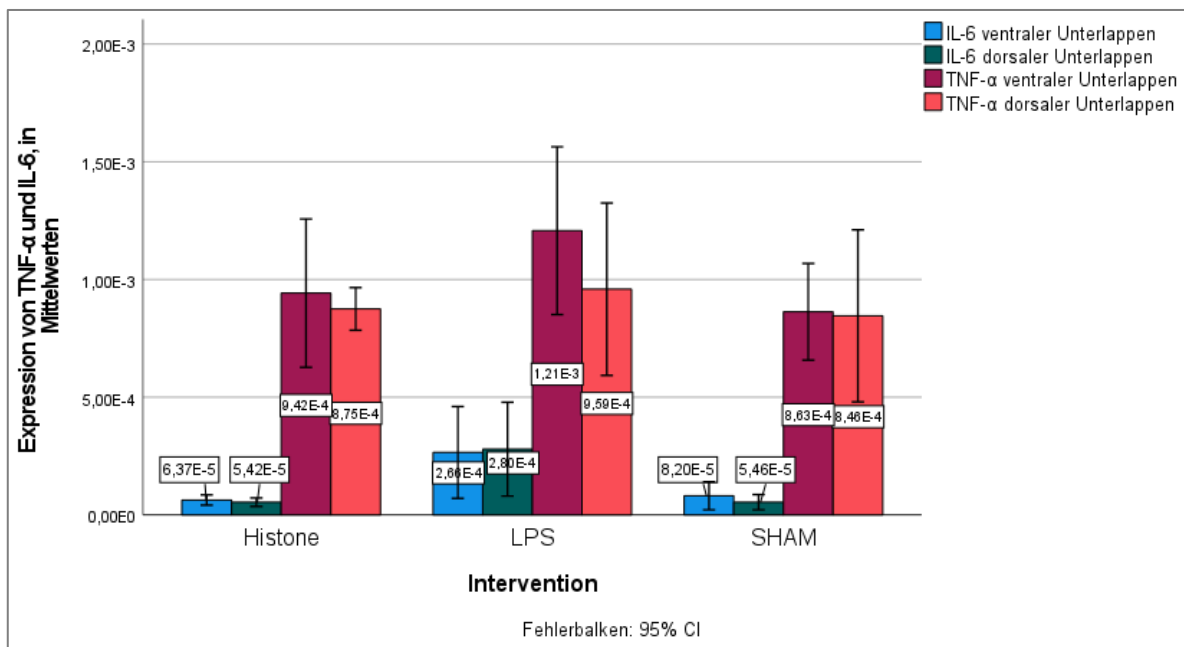


Abbildung 16: Expression von TNF- $\alpha$  und IL-6 im ventralen und dorsalen Unterlappen

Dabei konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede erhoben werden, tendenziell wies die LPS-Gruppe mehr Expression von IL-6 und TNF- $\alpha$  aus, angegeben in Mittelwerten pro Interventionsgruppe (Sham- und Histon-Gruppe  $n=8$ , LPS  $n=7$ )

Bei fehlender Varianzgleichheit basierend auf dem Mittelwert durch den Levene-Test (IL-6 ventraler Unterlappen  $p = .001$ , IL-6 dorsaler Unterlappen  $p = .034$ , TNF- $\alpha$  ventraler Unterlappen  $p = .395$ , TNF- $\alpha$  dorsaler Unterlappen  $p = .005$ ) wird eine Welch-Anova

durchgeführt. Hier zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Interventionsgruppen (IL-6 ventraler Unterlappen  $F(2, 10.52) = 2.948, p = .096$ , IL-6 dorsaler Unterlappen  $F(2, 11.45) = 3.354, p = .071$ , TNF- $\alpha$  ventraler Unterlappen  $F(2, 13.16) = 1.866, p = .193$ , TNF- $\alpha$  dorsaler Unterlappen  $F(2, 10.38) = .151, p = .861$ ).

### 4.3 Kreislauf- und Beatmungsparameter

#### 4.3.1 Herzfrequenz

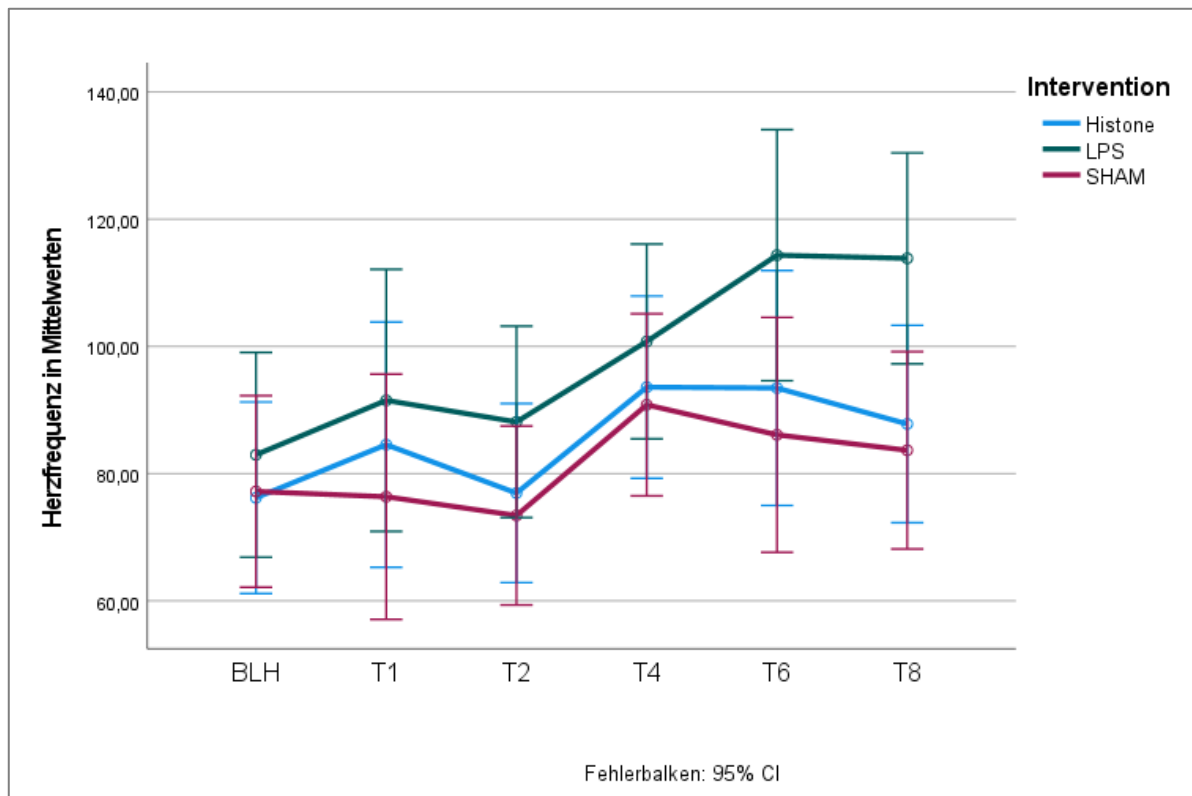


Abbildung 17: Herzfrequenz (HF) über die Zeit BLH-T8

*Tendenz zu steigender HF (BLH zu T8) in allen drei Interventionsgruppen, vor allem in der LPS-Gruppe*

Die LPS-Gruppe hat über den gesamten Versuchs-Zeitraum die höchsten HF-Werte (LPS-BLH:  $M = 81.84, SD = 24.72$ , LPS-T8:  $M = 113.86, SD = 25.29$ , Sham-BLH:  $M = 77.21, SD = 9.28$ , Sham-T8:  $M = 83.68, SD = 13.95$ ; Histone-BLH:  $M = 76.21, SD = 22.45$ , Histone-T8:  $M = 87.82, SD = 22.85$ ). Die Histone-Gruppe hat ab T1 zu jedem Messzeitpunkt höhere Werte als die Sham-Gruppe, ohne dass diese statistisch signifikant sind. Da eine Verletzung der Voraussetzung der Sphärizität vorliegt (Mauchly-Test  $p = <.001$ ), wird eine Greenhouse-Geisser Korrektur der Freiheitsgrade vorgenommen. Varianzhomogenität liegt nach Levene-Testung vor. Es können kein statistisch signifikanter Interaktionseffekte zwischen den Zeitpunkten der HF-Messung und den drei Interventionsgruppen festgestellt werden

(Greenhouse-Geisser  $F(4.72, 47.18) = 1.25, p = .302$ ). Haupteffekte des Zwischensubjektfaktors „Interventionsgruppe“, unabhängig von der Zeit, haben sich nicht statistisch signifikant unterschieden ( $F(2, 20) = 1.77, p = .197$ ). In der Testung des Haupteffekts des Innersubjektfaktors „Messzeitpunkte“ kann zum Zeitpunkt T8 eine statistische Signifikanz zwischen den Gruppen gefunden werden ( $F(2, 20) = 4.422, p = .026$ ). In allen anderen Messzeitpunkten sind die Ergebnisse nicht statistisch signifikant. In der Post-Hoc-Testung durch die Scheffé-Prozedur für den Zeitpunkt T8, kann statistisch bewiesen werden, dass sich lediglich die Sham- von der LPS-Gruppe signifikant unterscheidet (Scheffé  $p = .039$ ). Die Histon-Gruppe fällt hier zusammenfassend nicht statistisch signifikant auf, hat leicht erhöhte Werte gegenüber der Sham-Gruppe und ist in allen Messzeitpunkten mit niedrigeren Werten als die LPS-Gruppe vertreten.

#### 4.3.2 Mittlerer arterieller Druck

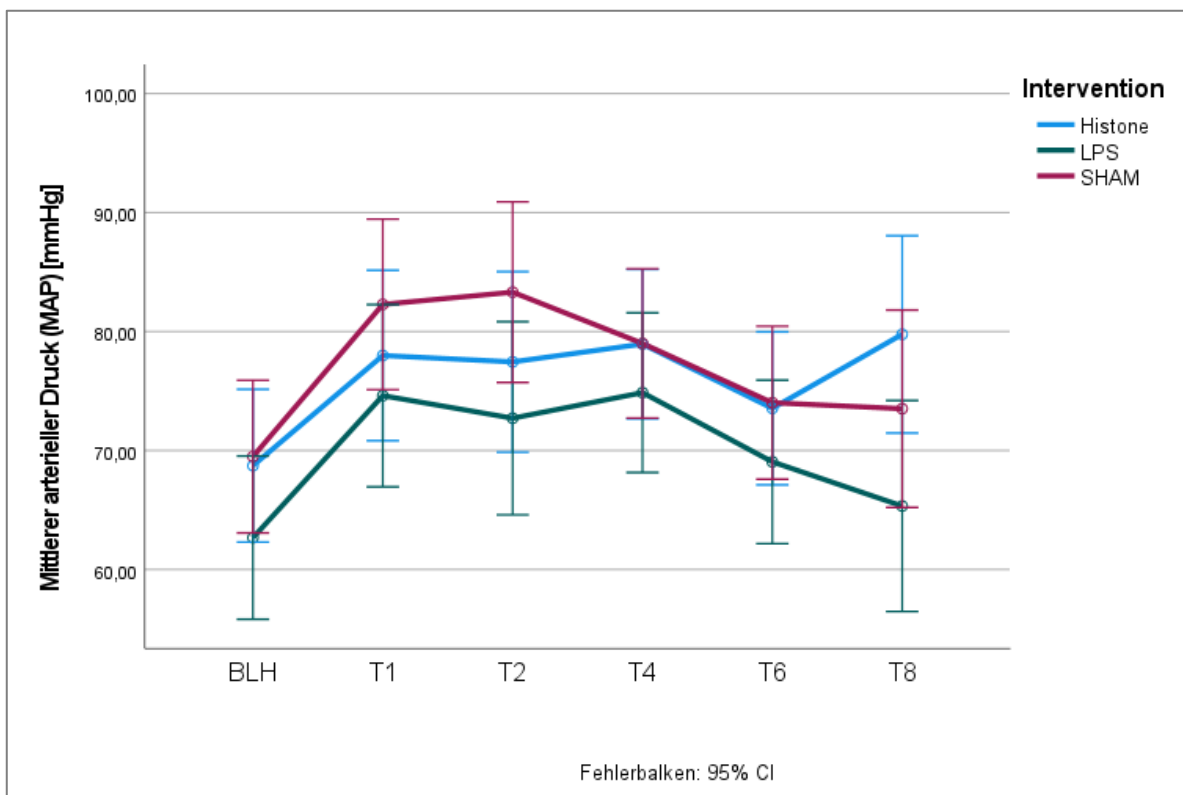


Abbildung 18: Mittlerer arterieller Druck (MAD) über die Zeit BLH-T8

*Zwischenzeitlicher Anstieg (T1 bis T4) in allen Interventionsgruppen, Tendenz zu insgesamt niedrigeren Werten in der LPS-Gruppe*

Der mittlere arterielle Druck (MAD) steigt während der Versuchsphase in allen drei Interventionsgruppen an und fällt dann zum Ende (T8) wieder ab auf leicht über den Wert von BLH, außer in der Histon-Gruppe, hier gibt es bei T8 nochmal einen Anstieg. (LPS-BLH:  $M = 63.17, SD = 4.68$ , LPS-T8:  $M = 65.34, SD = 6.97$ , Sham-BLH:  $M = 69.50, SD = 5.78$ , Sham-

T8:  $M = 73.52$ ,  $SD = 11.58$ ; Histone-BLH:  $M = 68.73$ ,  $SD = 12.77$ , Histone-T8:  $M = 79.77$ ,  $SD = 13.62$ ). Auffällig ist, dass in jedem Messzeitpunkt der mittlere arterielle Druck der LPS-Gruppe niedrigere Werte hat als die Histon- und auch die Sham-Gruppe. Außerdem hat die Sham-Gruppe zum Zeitpunkt T1 und T2 die höchsten Werte. Da eine Verletzung der Voraussetzung der Sphärizität vorliegt (Mauchly-Test  $p = <.001$ ) wird eine Greenhouse-Geisser Korrektur der Freiheitsgrade vorgenommen. Es kann kein statistisch signifikanter Interaktionseffekt zwischen den Messzeitpunkten und den Interventionsgruppen festgestellt werden (Greenhouse-Geisser  $F(7.11, 71.08) = 1.103$ ,  $p = .371$ ). Haupteffekte des Zwischensubjektfaktors „Interventionsgruppe“, also ob sich die drei Gruppen unabhängig von der Zeit unterscheiden haben, sind statistisch nicht signifikant ( $F(2, 20) = 2.06$ ,  $p = .154$ ). In der Testung des Haupteffekts des Innersubjektfaktors „Messzeitpunkte“ kann zu keinem Zeitpunkt eine statistische Signifikanz zwischen den Gruppen gefunden werden. Bei fehlender Varianzhomogenität wird sich hier der Welch-Anova bedient, die mit anschließendem Post-Hoc-Test nach Games-Howell interpretiert wird. Bei über den gesamten Zeitraum kontinuierlich höheren Werten der Histon-Gruppe gegenüber der LPS-Gruppe kann zum Zeitpunkt T8 zwar keine statistische Signifikanz, aber eine mit nach Welch ( $F(2, 12.80) = 3.79$ ,  $p = .051$ ) und im paarweisen Vergleich nach Games-Howell zwischen der LPS- und der Histon-Gruppe deutliche Tendenz aufgezeigt werden ( $M_{diff} = 14.43$ ,  $SD = 5.48$ ,  $p = .057$ ). Die LPS-Gruppe fällt hier zusammenfassend zu jedem Messzeitpunkt mit erniedrigten Werten des MAD gegenüber der Histon-Gruppe auf, es kann dabei keine statistische Signifikanz festgestellt werden.

## 4.3.3 Pulmonalarteriendruck

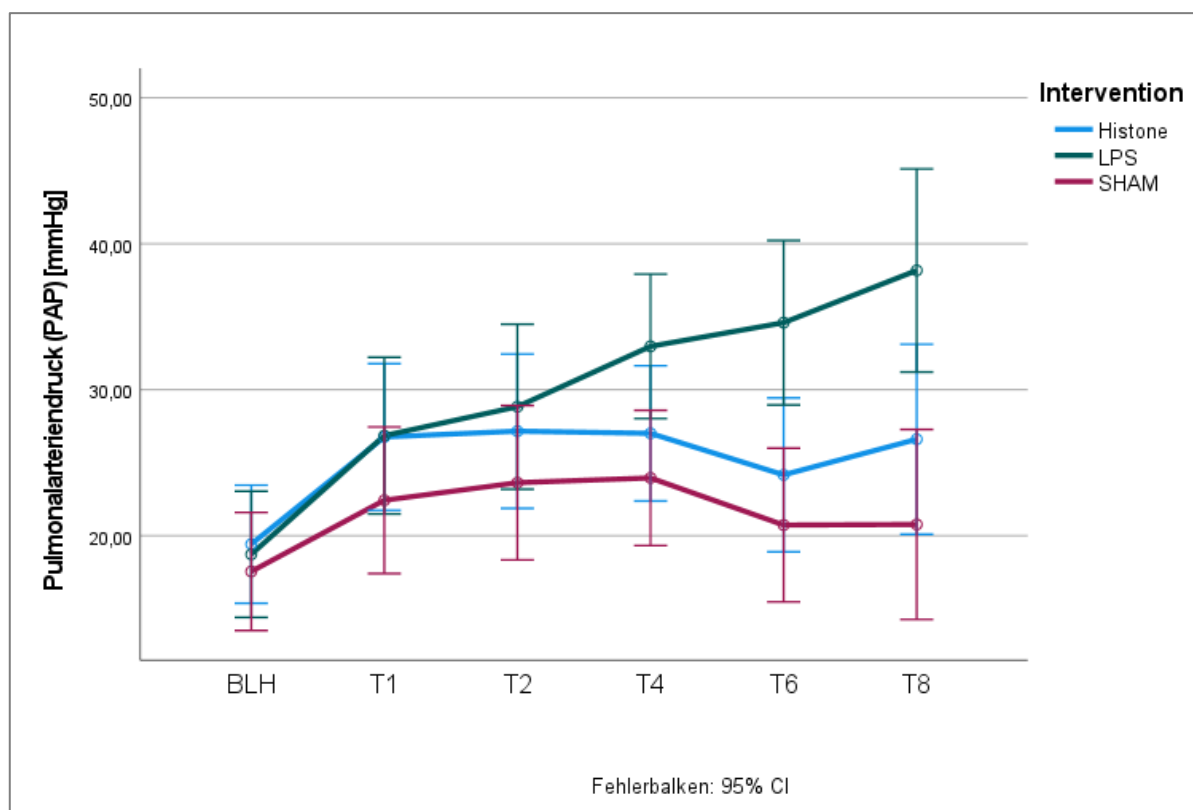


Abbildung 19: Pulmonalarteriendruck über die Zeit BLH-T8

Tendenz zu steigendem PAP (BLH zu T8) in der LPS-Gruppe, Histone-Gruppe tendenziell höherwertig als die Sham-Gruppe, aber hier in beiden Gruppen kein Anstieg von BLH zu T8

Der Druck der Pulmonalarterien (PAP) steigt während der Versuchsphase in allen drei Gruppen an, am deutlichsten in der LPS-Gruppe (LPS-BLH:  $M = 18.73$ ,  $SD = 4.36$ , LPS-T8:  $M = 38.18$ ,  $SD = 9.95$ , Sham-BLH:  $M = 17.55$ ,  $SD = 7.16$ , Sham-T8:  $M = 20.77$ ,  $SD = 10.12$ ; Histone-BLH:  $M = 19.42$ ,  $SD = 4.27$ , Histone-T8:  $M = 26.61$ ,  $SD = 5.94$ ). Die Histone-Gruppe fällt zu jedem Messzeitpunkt mit erhöhten Werten gegenüber der Sham-Gruppe auf, dies aber ohne statistische Signifikanz, beispielsweise zum Zeitpunkt T8 ( $M_{diff} = 5.84$ ,  $SD = 4.41$ ,  $p = .432$ ). Da eine Verletzung der Voraussetzung der Sphärizität vorliegt (Mauchly-Test  $p = <.001$ ) wird eine Greenhouse–Geisser Korrektur der Freiheitsgrade vorgenommen. Es kann ein statistisch signifikanter Interaktionseffekt zwischen den Messzeitpunkten und den Interventionsgruppen festgestellt werden (Greenhouse-Geisser  $F(4.03, 40.31) = 6.188$ ,  $p = <.001$ ). In der Post-Hoc-Testung durch die Scheffé-Prozedur wird hier die statistische Signifikanz für die LPS-Gruppe gegenüber der Sham-Gruppe ( $M_{diff} = 8.51$ ,  $SD = 3.20$ ,  $p = .048$ ) aufgedeckt. Die Werte der Histone-Gruppe gegenüber der Sham-Gruppe sind mit  $M_{diff} = 3.68$ ,  $SD = 3.09$ ,  $p = .505$  statistisch nicht signifikant erhöht.

## 4.3.4 Zentralvenöser Druck

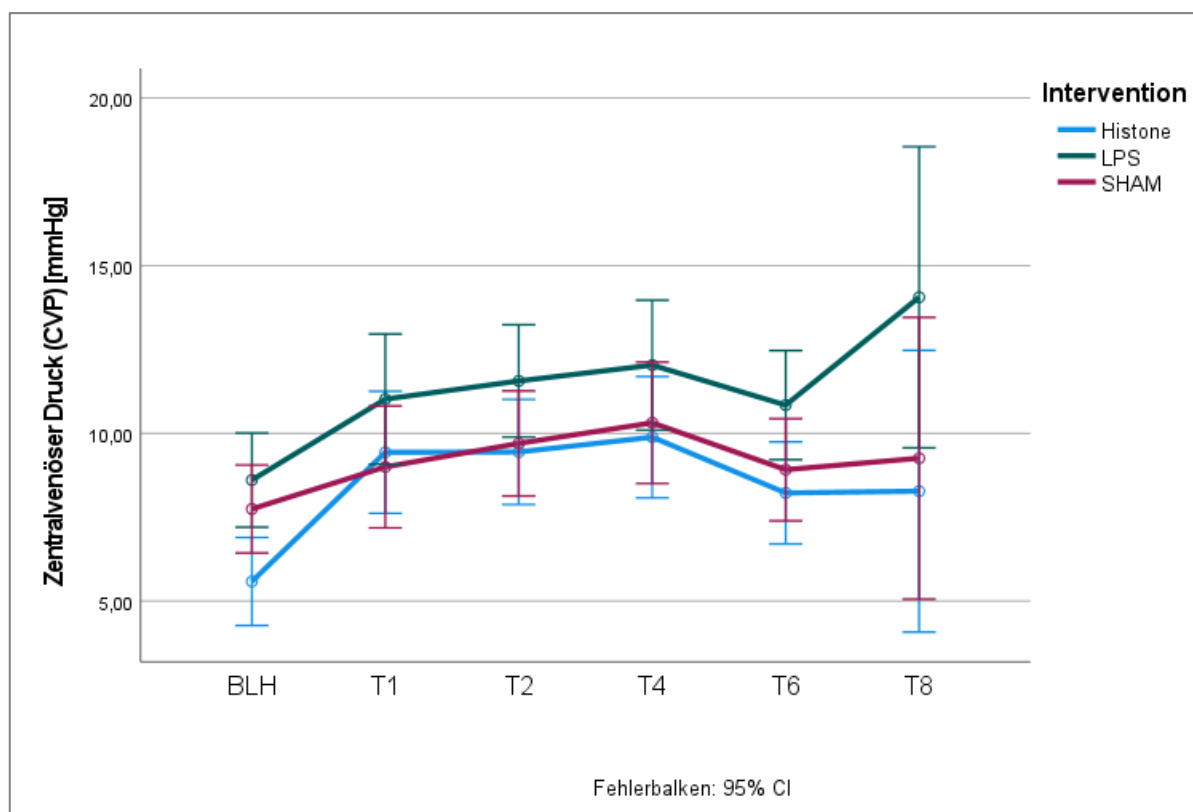


Abbildung 20: Zentralvenöser Druck über die Zeit BLH-T8

Tendenz zu steigendem CVP (BLH zu T8) in der LPS-Gruppe, in Histone- und Sham-Gruppe kein Anstieg von BLH zu T8

Der zentralvenöse Druck (ZVD) steigt während der Versuchsphase in allen Gruppen an. Es fällt auf, dass die Werte der LPS-Gruppe zu jedem Messzeitpunkt höher gegenüber der Histone- und der Sham-Gruppe sind. Die Werte der Histone-Gruppe sind hier teilweise niedriger als die der Sham-Gruppe. (LPS-BLH:  $M = 8.77$ ,  $SD = 1.05$ , LPS-T8:  $M = 14.06$ ,  $SD = 9.56$ , Sham-BLH:  $M = 7.75$ ,  $SD = 1.76$ , Sham-T8:  $M = 9.26$ ,  $SD = 3.17$ ; Histone-BLH:  $M = 5.58$ ,  $SD = 2.26$ , Histone-T8:  $M = 8.28$ ,  $SD = 2.09$ ) Da eine Verletzung der Voraussetzung der Sphärizität vorliegt (Mauchly-Test  $p = <.001$ ) wird eine Greenhouse–Geisser Korrektur der Freiheitsgrade vorgenommen. Hier kann kein statistisch signifikanter Interaktionseffekt zwischen den Messzeitpunkten des CVP und den Interventionsgruppen festgestellt werden (Greenhouse–Geisser  $F(2.97, 29.68) = 1.087$ ,  $p = .369$ ).

## 4.3.5 Herzindex

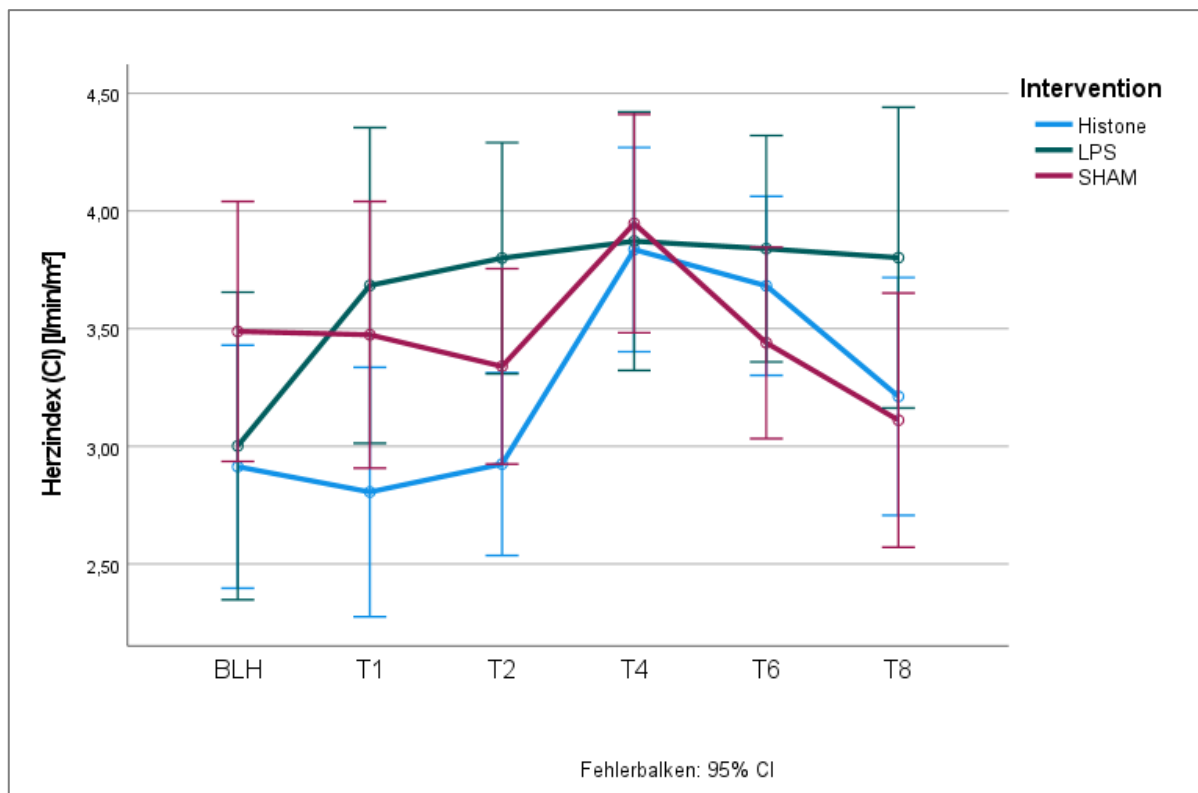


Abbildung 21: Herzindex über die Zeit BLH-T8

Tendenz zu steigendem CI (vor allem von BLH zu T1) in der LPS-Gruppe, Histon-Gruppe und Sham-Gruppe verhalten sich ähnlich, mit einem Peak zum Zeitpunkt T4

Der kardiale Index (CI) steigt in der LPS-Gruppe zunächst an und hält sich dann auf einem höheren Niveau stabil. Die Werte des Herzindex der Sham- sowie der Histon-Gruppe zeigen beide zum Zeitpunkt T4 ihre höchsten Werte und fallen dann wieder ab. Bei angenommener Sphärizität (Mauchly-Test  $p = .086$ ) kann ein statistisch signifikanter Interaktionseffekt zwischen den Messzeitpunkten des Herzindex und den Interventionsgruppen festgestellt werden ( $F(10, 85) = 2.438, p = .013$ ). Das heißt die Gruppen haben sich über die Zeit unterschiedlich verändert. Dabei ist der Haupteffekt des Innersubjektfaktors „Messzeitpunkte“ mit  $F(5, 85) = 6.720, p = < .001$  statistisch signifikant, der Haupteffekt des Zwischensubjektfaktors „Interventionsgruppe“, unabhängig von der Zeit, unterscheidet sich jedoch nicht statistisch signifikant ( $F(2, 17) = 1.432, p = .266$ ).

## 4.3.6 Funktionelle Residualkapazität

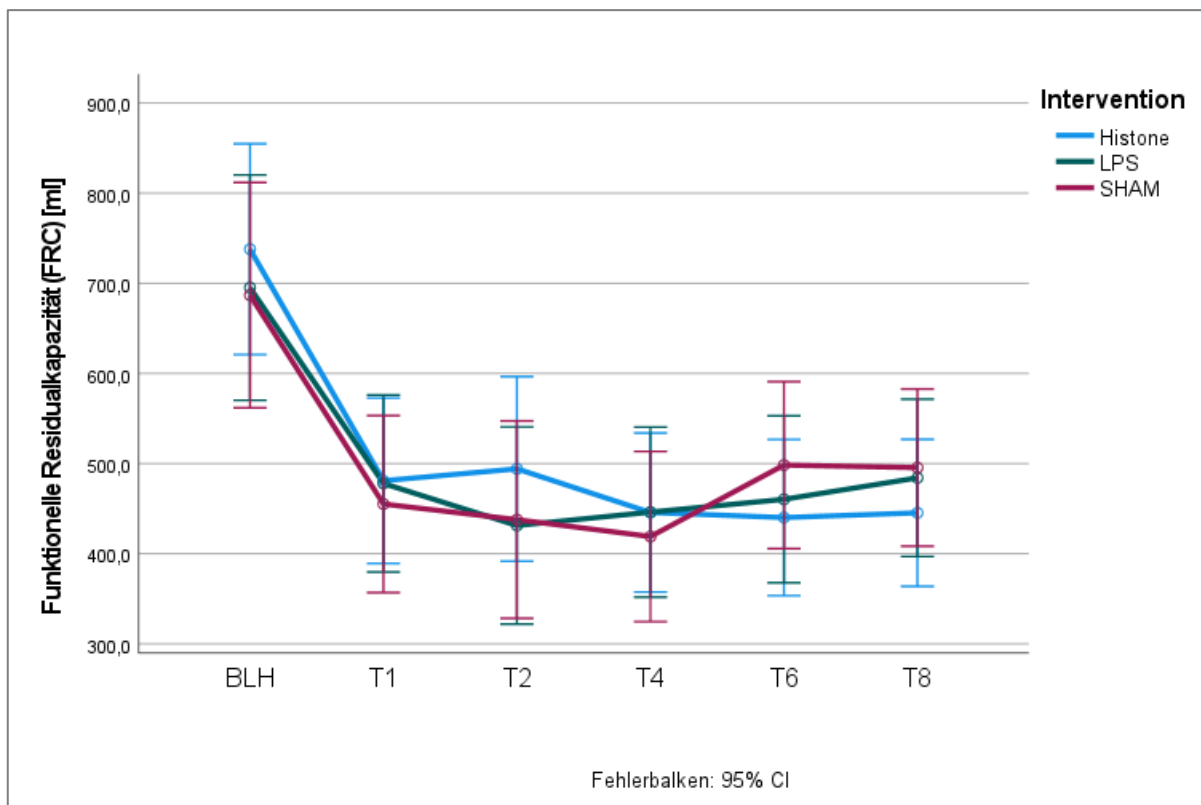


Abbildung 22: Funktionelle Residualkapazität (FRC) über die Zeit BLH-T8

Grafisch deutliche Tendenz zu fallenden Werten (vor allem von BLH zu T1) in allen Interventionsgruppen, dabei kein Gruppenunterschied

Die funktionelle Residualkapazität (FRC) fällt zwischen BLH und T8 in allen Interventionsgruppen ab, hier vor allem zwischen BLH und T1. Da eine Verletzung der Voraussetzung der Sphärizität vorliegt (Mauchly-Test  $p = <.001$ ) wird eine Greenhouse-Geisser Korrektur der Freiheitsgrade vorgenommen. Hier kann kein statistisch signifikanter Interaktionseffekt zwischen den Messzeitpunkten des FRC und den Interventionsgruppen festgestellt werden (Greenhouse-Geisser  $F(5.36, 50.88) = .895, p = .497$ ).

## 4.3.7 Inspiratorischer Spitzendruck

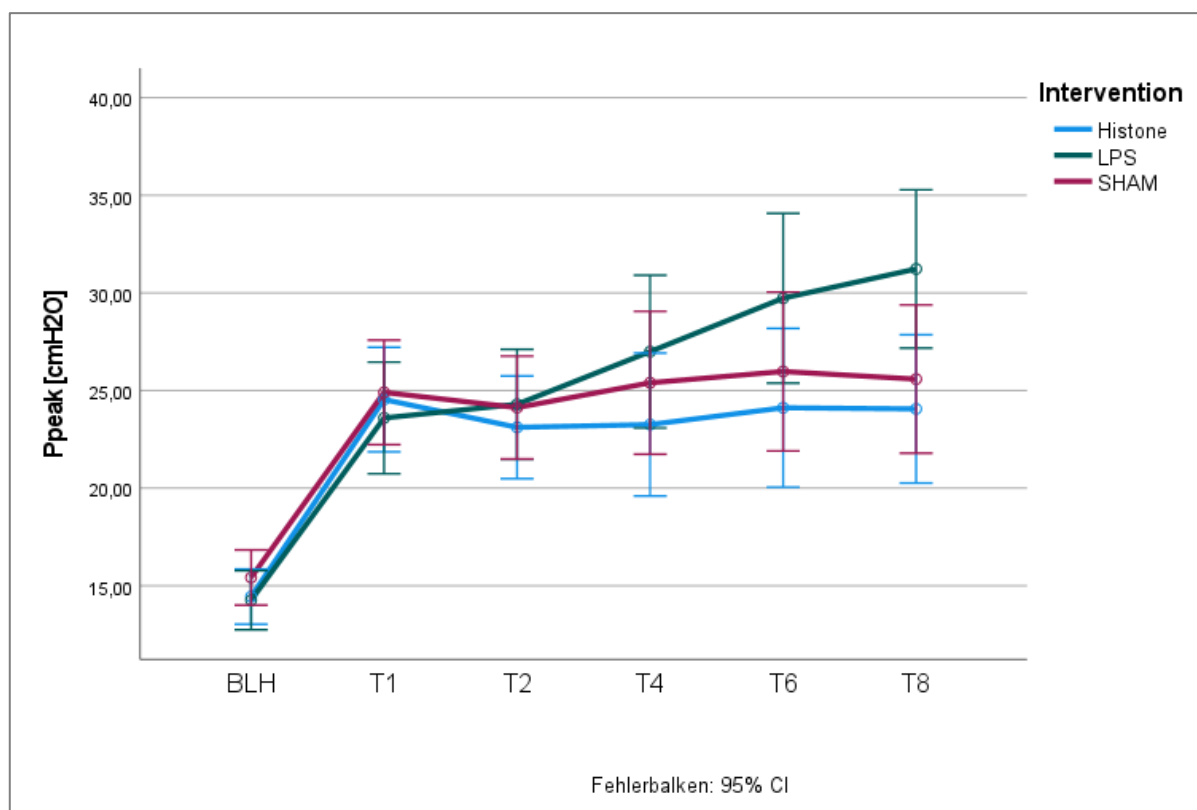


Abbildung 23: Ppeak über die Zeit BLH-T8

Grafisch deutliche Tendenz zu steigenden Werten (vor allem von BLH zu T1) in allen Interventionsgruppen, ab T2 leichte Tendenz zu höheren Werten in der LPS-Gruppe

Der Spitzendruck (Ppeak) steigt zwischen BLH und T8 in allen Interventionsgruppen an. Dabei am deutlichsten in der LPS-Gruppe. Die Werte der Histon-Gruppe liegen zu jedem Messzeitpunkt unterhalb der Werte aus der Sham-Gruppe. (LPS-BLH: M = 14.36, SD = 1.81, LPS-T8: M = 31.23, SD = 4.58, Sham-BLH: M = 15.42, SD = 2.10, Sham-T8: M = 25.59, SD = 5.76; Histone-BLH: M = 14.45, SD = 1.70, Histone-T8: M = 24.06, SD = 4.95). Da eine Verletzung der Voraussetzung der Sphärizität vorliegt (Mauchly-Test  $p = <.001$ ) wird eine Greenhouse–Geisser Korrektur der Freiheitsgrade vorgenommen. Hier kann ein statistisch signifikanter Interaktionseffekt zwischen den Messzeitpunkten des Ppeak und den Interventionsgruppen festgestellt werden (Greenhouse-Geisser  $F(3.40, 33.99) = 5.504$ ,  $p = .002$ ). Dabei ist der Haupteffekt des Innersubjektfaktors „Messzeitpunkte“ mit  $F(1.70, 33.99) = 112.060$ ,  $p = <.001$  statistisch signifikant, der Haupteffekt des Zwischensubjektfaktors „Interventionsgruppe“, unabhängig von der Zeit, unterscheidet sich jedoch nicht statistisch signifikant ( $F(2, 20) = .948$ ,  $p = .404$ ).

## 4.3.8 Horovitz-Quotient

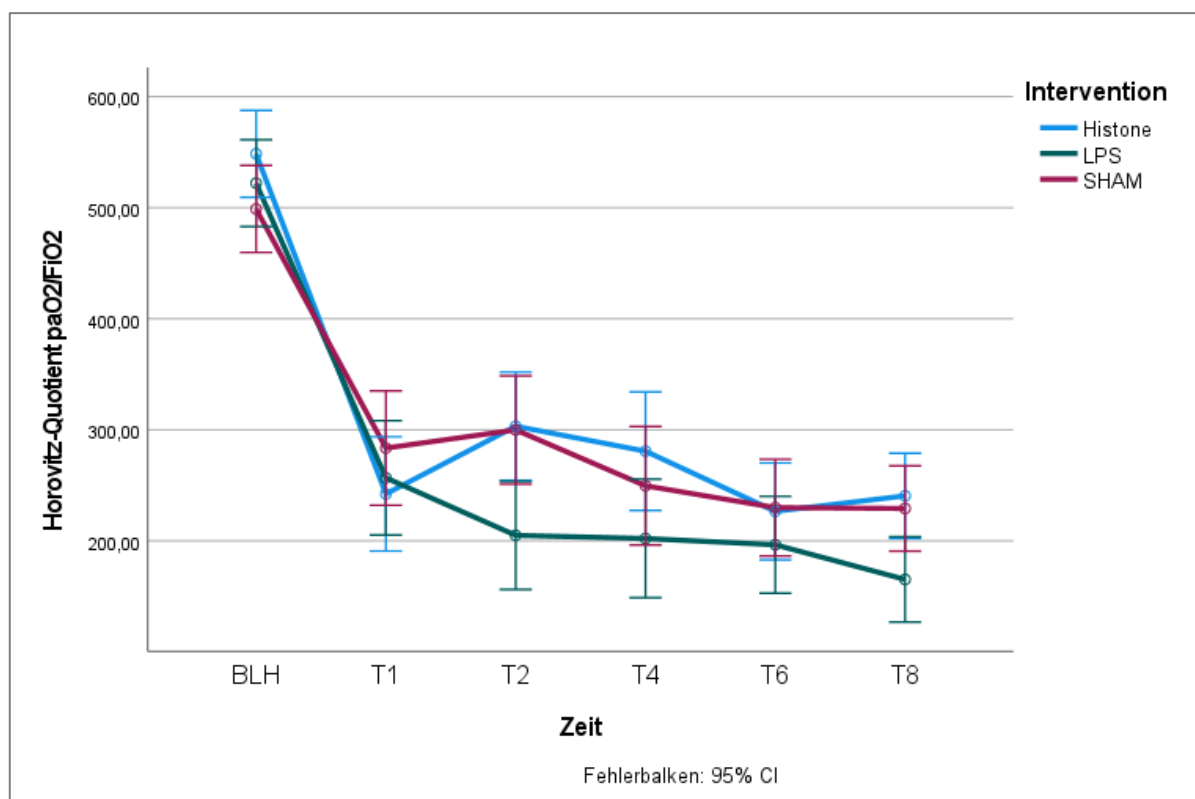


Abbildung 24: Horovitz-Quotient (PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>) über die Zeit nach Interventionsgruppen

Grafisch deutliche Tendenz zu fallenden Werten (vor allem von BLH zu T1) in allen Interventionsgruppen, dabei ab T1 tendenziell stärkerer Abfall in der LPS-Gruppe

Der Horovitz-Quotient fällt zwischen BLH und T8 in allen Interventionsgruppen ab, hier vor allem zwischen BLH und T1. Zum Zeitpunkt T8 sind die Werte der LPS-Gruppe am niedrigsten. (LPS-BLH: M = 514.37, SD = 35.35, LPS-T8: M = 165.30, SD = 35.83, Sham-BLH: M = 501.15, SD = 44.44, Sham-T8: M = 229.21, SD = 55.14; Histone-BLH: M = 549.38, SD = 59.58, Histone-T8: : M = 240.57, SD = 51.75) Bei angenommener Sphärizität (Mauchly-Test  $p = .493$ ) kann ein statistisch signifikanter Interaktionseffekt zwischen den Messzeitpunkten des Horovitz-Quotienten und den Interventionsgruppen festgestellt werden ( $F(10, 90) = 2.539, p = .010$ ). Das heißt die Gruppen haben sich über die Zeit unterschiedlich verändert. Dabei ist der Haupteffekt des Innersubjektfaktors „Messzeitpunkte“ mit  $F(5, 90) = 146,125, p = < .001$  statistisch signifikant, der Haupteffekt des Zwischensubjektfaktors „Interventionsgruppe“, unabhängig von der Zeit, unterscheidet sich jedoch nicht statistisch signifikant ( $F(2, 18) = 2.793, p = .088$ ).

## 4.3.9 Arterieller Kohlendioxidpartialdruck

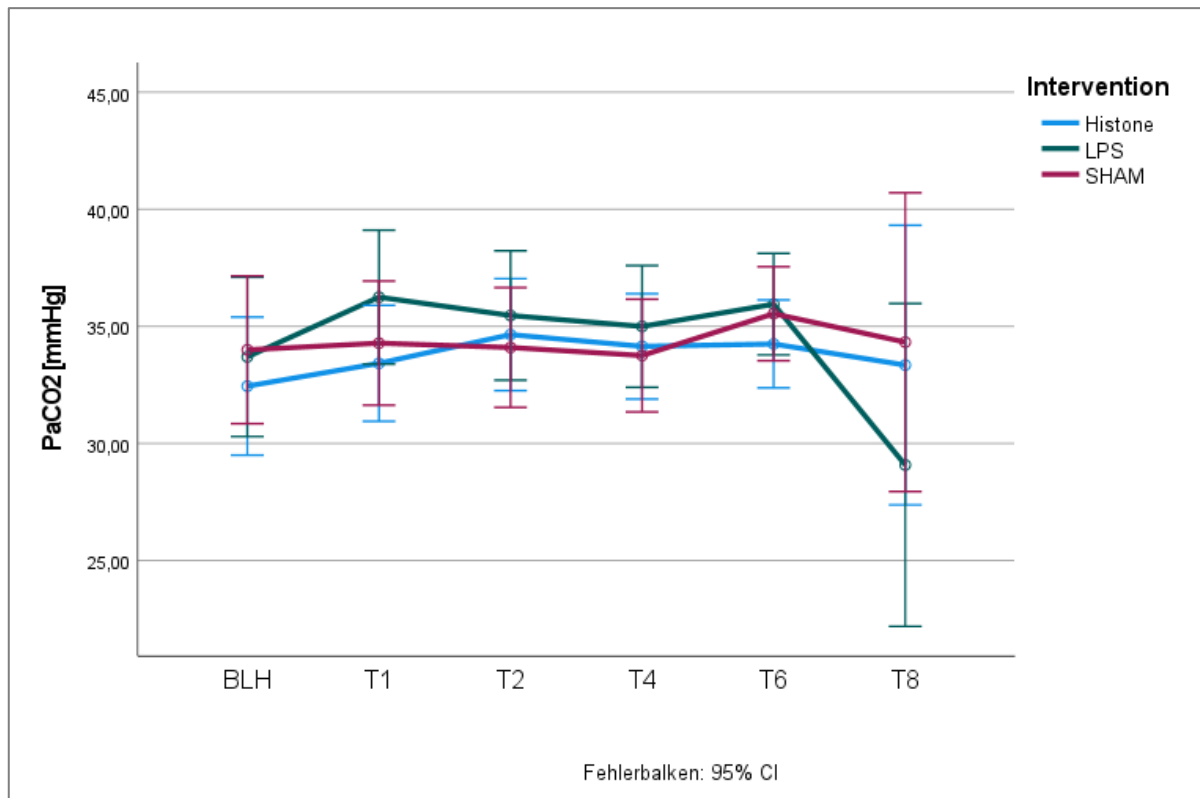


Abbildung 25: PaCO<sub>2</sub> über die Zeit nach Interventionsgruppen

Tendenz zu fallenden Werten (von T6 zu T8) in der LPS-Gruppe, sonst ähnliches Verhalten aller Gruppen

Der Kohlendioxidpartialdruck im arteriellen Blut zeigt in keiner Interventionsgruppe große Veränderungen von BLH bis T8. Zum Zeitpunkt T8 fällt der Wert in der LPS-Gruppe stark ab. In der statistischen Betrachtung ergibt sich daraus keine Signifikanz, so wird der Interaktionseffekt zwischen den Messzeitpunkten und den Interventionsgruppen mit nach Greenhouse-Geisser  $F(3.997, 35.975) = .861, p = .496$  beschrieben.

## 5 Diskussion

### 5.1 Diskussion der Methodik

#### 5.1.1 Studienmodell

Tierversuche bieten die Möglichkeit, im Rahmen eines experimentellen Settings und innerhalb der durch das spezifische Tiermodell vorhandenen Grenzen, neue Erkenntnisse über die während eines akuten Lungenschadens ablaufende Entzündungsreaktionen im Menschen zu gewinnen. Das Großtiermodell Schwein bietet dabei eine dem Menschen nahe Physiologie und Pathophysiologie. Neben der zu untersuchenden Ausprägung der Verletzung gilt es dabei auch die Entwicklung der Lungenverletzung über die Zeit im Tierversuch nachzubilden (Matute-Bello et al., 2008).

Der in dieser Studie gewählte Versuchsaufbau und dessen Durchführung orientierte sich dabei an der Behandlung eines Menschen auf der Intensivstation. Den Versuchstieren wurden zum Zwecke der Datenerhebung und Beantwortung der Forschungsfrage Zugänge in beiden Leisten eingelegt. Sie wurden durch einen Tubus mit entsprechendem Lumen von einem auch am Menschen gebräuchlichen Beatmungsgerät mit ähnlichen Druckvolumen beatmet (siehe Kapitel 3.2). Die Durchführung erfolgte über den gesamten Erhebungszeitraum durch ein konstantes Untersucher-Team, welches sich an dem zuvor erstellten Versuchsprotokoll orientierte. Durch eine im experimentellen Setting möglichst standardisierte Vorgehensweise anhand publizierte Vorstudien (Ruemmler et al., 2018, Ziebart et al., 2015) und einer in der klinischen Praxis geläufigen Herangehensweisen, sollte die Generierung von möglichst reliablen, validen und objektiven Daten geschaffen werden.

Eine genaue Fallzahlplanung und eine damit verbundene Schätzung der Effektgröße, war nicht möglich, da keine früheren Ergebnisse eines solchen Studienmodells am Schwein vorhanden waren. So wurde innerhalb eines formalen Rahmens versucht eine sinnvolle Stichprobengröße zu wählen, man orientierte sich hier an Vorstudien der Arbeitsgruppe. Nach der Ressourcengleichungsmethode („ $E = \text{Gesamtzahl der Tiere} - \text{Gesamtzahl der Gruppen}$ “) beschrieben durch Festing und Altmann kann davon ausgegangen werden, dass die hier gewählte Stichprobengröße von 24 Tieren vertretbar war (Festing and Altman, 2002). Während eine zu kleine Stichprobengröße einen tatsächlichen Effekt des Experimentes eventuell nicht aufdecken kann, führt eine zu große Stichprobe zu einer Ressourcenverschwendung (Charan and Kantharia, 2013).

Russel und Burch bieten zudem einen wichtigen Ansatz im Umgang mit Tieren für Versuchszwecke. In ihrer Arbeit fordern sie unter anderem, dass so wenig Tiere wie möglich verwendet werden, wie es mit der Erreichbarkeit der wissenschaftlichen Ziele der Studie

vereinbar ist. Dies erfordere eine möglichst präzise Methodik und Datenerfassung (Russell and Burch, 1959).

Bemerkenswert hierzu ist, dass in dieser Studie einzelne Schritte durch bereits standardisierte und vorpublizierte Verfahren getätigt wurden. Die intrabronchiale Applikation wurde über ein unter Sicht mittels Videoassistenz platziertes fiberoptisches Bronchoskop bewerkstelligt. Durch die gezielte Gabe eines Stoffes (je nach Interventionsgruppe, beispielsweise LPS) in den rechten Hauptbronchus wurde es so möglich im Schweinmodell einen kontrollierten Lungenschaden hervorzurufen (Ruemmler et al., 2021) und auch das an den Tierversuchen teilnehmende Personal konnte so ein effizientes Atemwegmanagement trainieren (Ruemmler et al., 2020). Dadurch können Atemwegskomplikationen minimiert werden und den Versuchstieren wird durch die Vermeidung mehrfacher Intubationsversuche und unnötiger Manipulation Leid erspart.

Auch die Bewertung der histologischen Lungenschnitte konnte nach einem vorpublizierten Score erfolgen (Ziebart et al., 2014a, Ziebart et al., 2015). Dabei wurde ein semiquantitativer Ansatz gewählt, wie er häufig in der präklinischen Forschung zum experimentellen Gruppenvergleich Anwendung findet (Meyerholz and Beck, 2018). Dass ein histopathologisches Korrelat in Form eines DAD vorhanden ist, tritt ungefähr bei der Hälfte der ARDS-Patienten auf, ist dann aber mit einer erhöhten Mortalität vergesellschaftet (Cardinal-Fernández et al., 2016). Detektierbare Gewebeschäden entstehen dabei vor allem bei direkten pulmonalen Ursachen (Zhang et al., 2024), wie in dieser Arbeit experimentell nachgestellt und anhand der sieben in Kapitel 3.2.7 erläuterten Parameter histologisch gemessen. Das methodische Vorgehen, aus dem Oberlappen und dem Unterlappen je zwei Proben von ventral und dorsal zu gewinnen, hat sich als vorteilhaft erwiesen, um den relevanten Gesamteindruck der jeweiligen Lunge zu bewahren. Auch Spieth et al. entnahmen in ihrer Arbeit zur Wirkung von verdampftem Perfluorhexan die Proben aus den Schweinelungen auf diese Art und beschrieben dabei die von der Schwerkraft unabhängigen, ventralen Regionen aus dem oberen Lappen und die von der Schwerkraft abhängigen, dorsalen Regionen aus dem unteren Lappen (Spieth et al., 2007).

### **5.1.2 Limitationen der Studie**

Limitationen der Studie ergeben sich aus der Studienart des experimentellen Tiermodells. Mit der Forschung an lebenden komplexen Organismen muss davon ausgegangen werden, dass es zu einer natürlichen physiologischen und anatomischen Variabilität im zu untersuchenden Kollektiv kommt. Die Versuchstiere stammen alle von einem Züchter und gehören mitunter teilweise zu einem Wurf. Durch eine möglichst homogene Versuchstiergruppe mit ähnlichem Alter (12-16 Wochen), einem ähnlichen Gewicht (28-35 kg), einem größtenteils männlichen

Geschlecht und dem bereits durch den Landwirt durchgeführten Ausschluss offensichtlicher Erkrankungen wurde versucht mögliche Störvariablen zu minimieren. Jedoch waren die Untersucher der Studie bei der Auswahl der Versuchstiere durch den Landwirt nicht vor Ort, weswegen ein *Selection Bias* nicht ausgeschlossen werden konnte. Zur Frage der Übertragung auf den Menschen, ergibt sich die Schwierigkeit, dass das ARDS und die dadurch entstehenden pulmonalen Veränderungen im Menschen oft durch Primärerkrankungen und zusätzlich durch therapeutischen Modalitäten (maschinelle Beatmung) beeinflusst werden, was in seiner Komplexität in einem Tiermodell nicht dargestellt werden kann (Matute-Bello et al., 2008).

Im Tierlabor wurde nach der standardisierten Instrumentierung und Sicherung des Versuchstieres auf randomisiert verblindete Weise das jeweilige Tier einer Interventionsgruppe zugeteilt. Angesichts der über den Studienverlauf durch Lernen verbesserten Techniken der Forscher, sei es unbedingt zu vermeiden, zunächst alle Tiere mit der zu untersuchenden Intervention und im Anschluss alle Kontrolltiere zu behandeln. Hier sollte, wie in dieser Studie umgesetzt, eine durch Randomisierung erfolgte zufällige Reihenfolge geschaffen werden, so Matute-Bello et. al in ihrem *American Thoracic Society Workshop Report* (Matute-Bello et al., 2011).

Vor dem Hintergrund, dass in Studien unter anderem an Nagetieren durch Bosmann et al., Xu et al. und weitere Autoren eine proinflammatorische Wirkung von extrazellulären Histonen gemessen werden konnte (Xu et al., 2015, Bosmann et al., 2013) beschreiben Matute-Bello et al. vorhandene Unterschiede der Tierarten: So gebe es wesentliche Artenunterschiede in der angeborenen Immunität (Matute-Bello et al., 2008). Aufgrund der verschiedenen notwendig gewordenen Anpassungen an Krankheitserreger haben sich zum Beispiel Toll-like-Rezeptoren unterschiedlich entwickelt. Hajjar et al. beschreiben dabei eine evolutionäre Divergenz dieser Rezeptoren und konnten zeigen, dass Menschen und Mäuse durch ihre Toll-like-Rezeptoren Typ 4 unterschiedliche Lipopolysaccharidstrukturen erkennen (Hajjar et al., 2002).

Und auch das MPS, bestehend aus Makrophagen und Makrophagenvorläufern, variiert. Dabei kommen *pulmonale intravaskuläre Makrophagen* (PIM) bei einigen Arten, darunter auch Schweinen, vor; beim Menschen sollen sie jedoch nicht Teil des MPS sein (Warner, 1996). PIMs können dabei helfen, mit systemischem physiologischem Stress wie Sepsis umzugehen, so Schneberger et al (Schneberger et al., 2012). Dies würde bedeuten, dass eine intrabronchial applizierte Noxe im Schwein weniger Reaktion auslöst als im Menschen. Auch Zhang et al. beschreiben das Vorhandensein von PIMs bei Wiederkäuern und Schweinen und gehen davon aus, dass diese Tiermodelle durch intravenös zugeführte Endotoxine anfälliger

für Lungenschäden seien (Zhang et al., 2024). Hier bedarf es weiterer Untersuchungen mit neuen methodischen Ansätzen.

Auf der Basis dessen sollte an dieser Stelle die rein intrabronchiale Applikationsart zur Diskussion kommen, da auch die Versuchstiere mit LPS-Behandlung als Positivkontrolle wenig statistisch signifikante Veränderung gezeigt hatten. Li und Wei kritisieren in diesem oft gewählten methodischen Ansatz eine zu milde Schadensausprägung und schlagen in ihrer Studie mit LPS nach der „Two-Hit-Hypothese“ vor, LPS intravenös und intratracheal zu verabreichen (Li and Wei, 2009). Tiba et al. verglichen drei Gruppen von Lungenschadesmodellen an Schweinen. Eine indirekte, septische Lungenschädigung stellten die Forscher mittels intravenöser Injektion von *Escherichia coli* dar; eine direkte Lungenschädigung wurde mittels Hyperoxie, Barotrauma und Aspiration von Magensäure erzeugt und die dritte Gruppe wurde in kombinierter Weise mit allen zuvor genannten Stoffen exponiert. Mit einem  $p = 0,02$  der Gruppe 3 (direkt und indirekt) gegenüber 1 (indirekt) und einem  $p = 0,03$  der Gruppe 3 gegenüber der Gruppe 2 (direkt) konnten die Forscher durch die kombinierte direkte und indirekte Auslösung einer Lungenschädigung statistisch signifikante Unterschiede bezüglich des Horovitz-Quotienten, der radiologisch dargestellten Infiltration, sowie dem histopathologisch erhobenen Lungenschaden mittels DAD-Score ermitteln (Tiba et al., 2021). Hieraus könnte geschlossen werden, dass in dieser Studie die Exposition durch die rein intrabronchiale Applikation zu schwach war, um eine eindeutigen Schaden in den Schweinelungen messen zu können.

Die verwendete Histonmischung, bestehend aus allen Isomeren, wurde mit einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  verwendet. Dies war eine verhältnismäßig hohe Konzentration. Silva et al. verwendeten in ihrer Studie zu neurotoxischen und immunmodulierenden Wirkung von extrazellulären Histonen Konzentrationen von 2, 10 und 50  $\mu\text{g/ml}$  und konnten vor allem für 50  $\mu\text{g/ml}$  signifikante Veränderungen erkennen (Da Silva et al., 2024).

Zudem sollte die Zusammensetzung und Mischung der Histonlösung kritisch beurteilt werden. So wurde in dieser Studie eine Mischung aller Isomere (H1, H2A, H2B, H3, H4) verwendet und es ist davon auszugehen, dass alle Isomere „gleichermaßen“ in der Lösung vorhanden waren. In anderen Studien versuchte man, Wirkungen einzelner Isomer-Typen zu identifizieren. So konnte herausgefunden werden, dass die Phagozytose apoptotischer Zellen in Gegenwart von H3 und H4 Histonen deutlich verringert war, nicht aber durch H1 Histone. Dies sorgte für eine Aufrechterhaltung der Entzündung und für eine gestörte Organfunktion (Friggeri et al., 2012). Dass die Untereinheiten H3 und H4 eine Verstärkung der Endotheldysfunktion von menschlichen Lungenarterien-Zellen verursachten, konnte durch Kim et. al gezeigt werden In seiner Studie verwendete er gereinigte rekombinante humane Histon-Untereinheiten H1, H2A, H2B, H3 und H4 von Cayman Chemical (Ann Arbor, MI) und eine Histonmischung aus

Kalbsthymus von Sigma (St. Louis, MO) (Kim et al., 2022). Wildhagen et al. konnten zeigen, dass der Spiegel des Histonisomers H3 in Sepsis-Patienten erhöht war und positiv mit der Mortalität korrelierte (Wildhagen et al., 2015). Eine neurotoxische Wirkung durch das Histonisomer H1 konnten Gilthorpe et al. in ihrer Studie an Nagetieren zeigen (Gilthorpe et al., 2013). Diese scheinbar stärkere proinflammatorische Wirkung einzelner Histon-Isomere konnte im Rahmen des methodischen Aufbaus dieser Studie nicht detektiert und nachgebildet werden. Hier ist in zukünftigen Studien zu prüfen, inwiefern die Mischung aller Histon-Isomere oder nur einzelne Histon-Isomere relevant für die Förderung der Entzündungsreaktionen im Rahmen eines akuten Lungenschadens sind.

Während der 8-stündigen Überwachungsphase wurden kontinuierlich Kreislauf- und Beatmungsparameter erhoben. Unmittelbar nach T8 wurde das Versuchstier euthanasiert und die Entnahme der Lunge mit dem Gewinnen der Gewebeproben erfolgte. So wurde ein Ist-Zustand des Lungengewebes von circa acht bis neun Stunden nach intrabronchialer Applikation des jeweiligen Agens erfasst. Tiba et al. konnten in ihrer Studie am Schweinemodell nach 12 Stunden einen progressiven Rückgang des  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Verhältnisses im Sinne eines schweren ARDS verursachen (Tiba et al., 2021). In ihrer Studie zu Histon-vermittelten Wirkungen an Blutzellen von septischen Patienten wählten Ekaney et al. einen Beobachtungszeitraum von 24 h. Mit einer Histonkonzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  kam es zum Zelltod von Monozyten und Endothelzellen (Ekaney et al., 2014). Vor dem Hintergrund, dass die histologischen Veränderungen in der Lunge im Rahmen eines ARDS in Phasen ablaufen, kann man kritisieren, dass hier ein längerer Beobachtungszeitraum eventuell mehr Veränderungen aufgezeigt hätte.

Die histologische Auswertung anhand des zuvor beschriebenen Lungenschadensscores erfolgte durch einen geschulten Untersucher. Hierfür wurden über mehrere Monate unter immer gleichen Bedingungen die insgesamt 23 Lungenschnitte (ein Versuchstier wurde nach T6 ausgeschlossen) ausgewertet. An zwei bis drei Tagen pro Woche wurden die Lungenschnitte von drei bis vier Versuchstieren mithilfe eines Mikroskops anhand des Scores mit den sieben Parameter mit Werten zwischen Null bis Fünf analysiert. Der jeweilige histologisch aufgearbeitete Schnitt wurde dabei in vier, sich nicht überlappenden, Bereichen bewertet und zusätzlich wurde ein Überblickswert erhoben. Aufgrund der konstanten Eigenschaft der zu untersuchenden histologischen Merkmale konnte mittels erneuter mikroskopischer Betrachtung einzelner Schnitte zu einem späteren Zeitpunkt die Zuverlässigkeit der Messmethode überprüft werden. Eine verallgemeinernde Aussage ist vor dem Gesichtspunkt der alleinigen Auswertung des Lungenschadens jedoch nicht zu treffen. Für zukünftige Studien könnte die Erhebung der Daten durch mehrere Untersucher zur Gewinnung konkordanter Ergebnisse im Sinne der Interrater-Reliabilität von Vorteil sein. Auch

das Gremium der *American Thoracic Society* hat sich in ihrem Workshop mit den Merkmalen und Messungen experimenteller akuter Lungenverletzungen in Tiermodellen auseinandergesetzt. Aus ihrem Bericht geht hervor, dass zwar ein einheitlicher validierter histologischer Score noch nicht besteht, jedoch „eine verblindete Bewertung der Lungenverletzungsmerkmale in mehreren sich nicht überschneidenden Bereichen mit einer klaren methodischen Beschreibung jeder Maßnahme bevorzugt werde“ (Kulkarni et al., 2022). Dies deckt sich mit dem methodischen Vorgehen in dieser Arbeit.

Vor dem Hintergrund, dass in allen Interventionsgruppen wenig statistisch signifikante Unterschiede gezeigt werden konnten, wurden neue methodische Ansätze formuliert und angewandt. So beschäftigten sich nachfolgende Studien aus unserer Arbeitsgruppe mit dem Schaffen eines experimentellen Modells für einen endotoxämischen Schock bei Schweinen durch LPS-Infusion (Urmann et al., 2023) oder schafften einen Vergleich zwischen verschiedenen ARDS-Modelle in Schweinen (Rissel et al., 2022). Die Überlegungen durch Xu et al., extrapulmonale Faktoren wie Sepsis oder eine Pankreatitis könnten zunächst das Endothel beeinträchtigen und darüber dann zu einem Lungenödem führen, stärkt vermutlich die methodische Wahl der intravenösen Applikation, mit der Hoffnung eine stärkere Reaktion zu detektieren. Hier können auch andere Stoffe neben LPS als experimenteller ARDS-Auslöser im Tiermodell dienen, zum Beispiel Ölsäure (Xu et al., 2023).

Trotz der Tatsache, dass Artenunterschiede verschiedener Versuchstiere vorhanden sind und diese relevante Auswirkungen auf die Ergebnisse von Studien und eventuell daraus erfolgenden Empfehlungen haben können, besteht weiterhin die Notwendigkeit Tiermodelle zum Verständnis der Pathophysiologie des akuten Lungenschadens zu nutzen. Denn bisher gibt es keinen vergleichbaren Ersatz an komplexen biologischen Systemen die Pathophysiologie von Lungenverletzungen weiter zu verstehen und neue therapeutische Eingriffe zu finden und zu testen. Es bedarf dabei dringend einer Weiterentwicklung standardisierter Kriterien für eine Lungenschadens-Definition im Tiermodell (Matute-Bello et al., 2008).

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

### 5.2.1 Histologie

Die histologisch aufgearbeiteten Lungenschnitte aus den vier Regionen beider Lungenflügel der 23 Versuchstiere zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Schadensausprägung je nach Intervention.

In der Betrachtung des TDS (Kapitel 4.1.1, Abbildung 10) ist der gemittelte Schaden in der LPS-Gruppe tendenziell am stärksten ausgeprägt. Hierbei wurden die histologisch erhobenen

Werte der sieben Parameter in den vier Bereichen der Lungenproben je Interventionsgruppe zu einem Wert zusammengefasst. Auffällig ist, dass der TDS in der Sham-Gruppe eine Tendenz zur stärkeren Ausprägung hat als in der Histon-Gruppe (Sham:  $M = 330.38$ ,  $SD = 63.480$  und Histone:  $M = 298.63$ ,  $SD = 90.535$ ). Im Folgenden soll hierzu die Ausprägung der einzelnen Parameter näher beleuchtet werden.

Zunächst fällt auch im Rahmen der Erhebung des PDS bestätigend zum TDS eine tendenziell stärkere Ausprägung in der ARD-Gruppe auf als in der Histon- und der Sham-Gruppe. Diese Tendenz zur stärkeren Ausprägung betrifft vor allem die Parameter *Inflammatorische Infiltration* und *Interstitielles Ödem*. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Ausprägung der beiden Parameter durch die LPS-Wirkung zu erklären ist.

Im Gegensatz dazu hat *Alveoläres Ödem* in der Sham-Gruppe eine Tendenz zur stärkeren Ausprägung als in den anderen beiden Interventionsgruppen. Nach Protokoll haben alle Interventionsgruppen insgesamt 200 ml Flüssigkeit erhalten. In der Sham-Gruppe wurde dieses Volumen, aufgeteilt in 4 x 50 ml, ohne vorheriges Lösen eines weiteren Agens verabreicht. Inwiefern und ob eine Lösung von Sterofundin mit der Histonmischung bzw. dem LPS-Pulver im Gegensatz zu reinem Sterofundin eine andere Wirkung auf die Entstehung eines alveolären Ödems hat, bleibt ungeklärt. Vor dem Hintergrund der rein intrabronchialen Gabe der Agenzien wäre zu erwarten gewesen, dass vor allem das alveoläre Ödem zunächst in jeder Gruppe ähnlich stark ausgeprägt wäre.

In allen drei Gruppen, unabhängig von der Intervention, fällt zudem auf, dass die Parameter *Inflammatorische Infiltration*, *Epithelschaden* und *Interstitielles Ödem* am stärksten ausgeprägt sind. Auch das Ergebnis der Expertenbefragung innerhalb des Workshops der *American Thoracic Society* beinhaltet auf die Frage nach dem histologischen Nachweis einer Gewebeverletzung der Lunge eine *Füllung des Alveolarraums*, eine *alveoläre Epithelschädigung* und eine *neutrophile Infiltration* (Kulkarni et al., 2022).

Hecker et al. verdeutlichen, dass je nach Auslöser die Schädigung primär vom Epithel (bei direktem, pulmonalem Insult) oder primär vom Endothel (extrapulmonaler Insult, Sepsis) ausgeht. In unserer Studie haben wir durch die intrabronchiale Applikation einen pulmonalen Insult versucht nachzubilden, folglich müsste die histologische Ausprägung vorhanden sein. Die Forscher beschreiben zudem den Epithelschaden, das dadurch bedingte Ödem aufgrund einer beeinträchtigten Entfernung von Flüssigkeit aus dem Alveolarraum und die Endothelaktivierung mit Infiltration von Entzündungszellen (Hecker et al., 2008), was sich in der Ausprägung der Schadensparameter in unserer Studie widerspiegelt.

Außerdem fällt auf, dass die Parameter *Überblähung* und *Mikroatelektasen* in allen drei Interventionsgruppen nahezu ähnliche Werte zeigen. Hier muss beachtet werden, dass der

Schaden zumindest teilweise auch durch die Entnahme der Lungen und die Anfertigung der Lungenproben verursacht werden konnte. Vor der Entnahme wurde die Lunge gebläht und durch Abklemmen der Luftwege und in geblähtem Zustand entnommen, um das Lungengewebe gut darstellen zu können. Hierbei kann der Parameter *Überblähung* in unterschiedlich starker Ausprägung in jeder Lunge verändert worden sein, da nicht überprüft werden kann, inwiefern jede Lunge mit einem ähnlichen Inhalt an Luft-Volumen entnommen wurde und so für die histologische Aufarbeitung fixiert wurde.

Und so kann auch der in allen Interventionsgruppen ausgeprägte Parameter des *Epithelschadens* durch die methodische Vorgehensweise manipuliert worden sein. Eine maschinelle Beatmung schafft durch hohe Tidalvolumina aufgrund der alveolären Überdehnung einen Lungenschaden. (Webb and Tierney, 1974).

Betrachtet man die Schadensausprägung des Lungenschadens je nach Lungenlappen, dargestellt durch den LDS, fällt auf, dass in jeder Interventionsgruppe der Unterlappen tendenziell stärker betroffen ist als der Oberlappen. Wahrscheinlich ist, dass die kontinuierliche Rückenlage der Versuchstiere zu einer stärkeren Belastung der Unterlappen-Areale führte. Auch Spieth et al. konnten in ihrer Studie an Schweinen zur Wirkung von Perfluorhexan zeigen, dass die dorsalen, von der Schwerkraft abhängigen, Lungenareale eine verstärkte Schadensausprägung zeigten (Spieth et al., 2007). Albert und Hubmeyer zeigten in ihrer Untersuchung dass die Bauchlage die komprimierende Wirkung des Herzens auf die Lunge reduziert und so vor allem die dorsale Lungenventilation und dementsprechend auch das dorsale Lungenventilations-Perfusions-Verhältnis deutlich verbesserte (Albert et al., 1987).

### 5.2.2 Molekularbiologie

Interessanterweise verhält es sich bei der Expression von TNF- $\alpha$  und IL-6 in allen drei Interventionsgruppen so, dass es in den ventralen Regionen tendenziell zu einer stärkeren Expression gekommen ist. Durch die stärkere Kompression, aufgrund der Rückenlage und den damit verbundenen Stress auf das Lungengewebe in den dorsalen Bereichen hätte eine ebenfalls stärkere Expression der Zytokine in den dorsalen Regionen erwartet werden können. Yoshida et al. beschreiben in ihrer Arbeit mit Schweinen, dass die Bauchlage einen kraftabhängigen Lungenschaden aufgrund des auf die Lunge einwirkenden Stress reduzieren könne (Yoshida et al., 2022).

In ihrer Studie zur Wirkung von extrazellulären Histonen in Mäusen und Ratten konnten Bosmann et al. eine statistisch signifikant gesteigerte Expression von IL-6 und TNF- $\alpha$  und weiteren proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen messen. Die nachweislich mit dem menschlichen ARDS in Zusammenhang stehenden Mediatoren IL-6 und TNF- $\alpha$  waren dabei nach intrapulmonaler Verabreichung von Kalbsthymus-Histonen in C57BL/6J-Mäusen

gemessen worden (Bosmann et al., 2013, Matthay et al., 2019). Und auch Ekaney et al. konnten in ihrer Untersuchung durch Stimulation von menschlichen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC) und menschlichen monozytischen Zellen (MM6) mithilfe von Kalbsthymushistonen, besonders bei Histonkonzentrationen von 50 µg/ml einen statistisch signifikanten Anstieg mehrerer Zytokine, darunter auch TNF- $\alpha$ , IL-6 messen (Ekaney et al., 2014).

Vergleicht man die drei Interventionsgruppen dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Expression von TNF- $\alpha$ , so fällt eine Tendenz zu gesteigerter Expression in der LPS-Gruppe auf. Im Lungengewebe der mit Histonen behandelten Schweine konnten dabei keine statistisch signifikanten Ergebnisse detektiert werden.

### 5.2.3 Kreislauf- und Beatmungsparameter

Die Reaktion der Versuchstiere auf die intrabronchial applizierten Substanzen wurde durch ein intensivmedizinisches Monitoring überwacht. Die Werte der BLH-Messung konnten so anschließend mit den Werten der innerhalb und nach der Überwachungsphase (T1- T8) erhobenen Daten vergleichend untersucht werden.

Die Parameter des Kreislaufes beinhalteten die HF, den MAD, den PAP, den ZVD, sowie den CI. Betrachtet man zunächst die LPS-Gruppe, so zeigten die behandelten Versuchstiere Tendenzen zu typischen, in der Literatur beschriebenen proinflammatorischen Veränderungen im Sinne einer systemischen Entzündungsreaktion. Zwei Organsysteme des sequenziellen Organfehlfunktion-Scores (SOFA-Score) wurden über die erhobenen Daten abgedeckt. Hierzu zählen die Atemtätigkeit und das Herz-Kreislauf-System. Erwähnenswert ist dabei die statistisch signifikante Erhöhung der HF in der LPS-Gruppe zum Zeitpunkt T8 im Gegensatz zur Sham-Gruppe ( $p = 0.026$ ) sowie der tendenziell niedrigere MAD (Mdiff (zu Histon-Gruppe) = 14.43,  $p = 0.057$ ) und der statistisch signifikant erhöhte PAP der LPS-Gruppe gegenüber der Sham-Gruppe (Mdiff = 8.51, SD = 3.20,  $p = .048$ ).

Doursout et al. konnten in ihrer Studie mit Schweinen, als durch LPS-induzierte Schockmodelle, eine nach drei Stunden signifikante Abnahme des MAD um 31%, eine mit 28% signifikant erhöhte HF, sowie einen nach einer Stunde um 25% signifikant erhöhten PAP messen. Die Forscher induzierten in ihrer Untersuchung zur Verteilung von Isoformen der NO-Synthasen das LPS jedoch intravenös (Doursout et al., 2008). Dieser methodische Unterschied wurde bereits diskutiert und fällt an dieser Stelle erneut auf.

In der Betrachtung der der Kreislauf-Parameter der Histon-Gruppe zeigten die zugeteilten Tieren ebenfalls eine Tendenz zu erhöhten HF-Werten im Gegensatz zur Gruppe der Sham-Schweine, jedoch ohne statistische Signifikanz. Der MAD war bis zum Zeitpunkt T4 etwas

niedriger als in der Sham-Gruppe. Der PAP der mit Histonen behandelten Tiere war über den gesamten Zeitpunkt tendenziell höher als in der Sham-Gruppe. Insgesamt waren die Werte der Sham-Gruppe und der Histon-Gruppe hinsichtlich der erhobenen Kreislaufparameter aber ähnlich und zeigen, dass die intrabronchiale Gabe von Histonen in den Versuchstieren nur wenig Einfluss auf die Kreislaufparameter hatte.

Eine Beeinflussung der Ergebnisse unabhängig von den interventionellen Methoden war die Gabe von kreislaufunterstützenden Medikamenten, wenn der MAD < 60 mmHg gemessen wurde. Die kreislaufunterstützende Wirkung und somit die Beeinflussung der Vitalparameter ist bereits lange bekannt (Buckley et al., 1979).

Und auch die Gabe von Propofol und Fentanyl im Rahmen der Anästhesie über den gesamten Überwachungszeitraum kann die hämodynamischen Ergebnisse unabhängig von der Intervention beeinflusst haben. Levrik et al. zeigten in ihrer Studie mit Schweinen zum Vergleich kardiovaskulärer Reaktionen im Rahmen einer Anästhesie, dass es durch die Anwendung von Fentanyl im Gegensatz zu Dexmedetomidin zu niedrigeren Werten des MAD sowie der HF kam (Lervik et al., 2018). Somit kann eine Reaktion der Versuchstiere auf die Agenzien durch die Anästhesie mittels Propofol und Fentanyl gedämpft worden sein.

Die statistisch untersuchten Beatmungsparameter umfassten den Horovitz-Quotienten, den PaCO<sub>2</sub>, den Ppeak, sowie die FRC. Der Horovitz-Quotient wurde in allen Interventionsgruppen über den Zeitraum T1 - T8 statistisch signifikant schlechter ( $F(5, 90) = 146,125, p = < .001$ ). Zum Zeitpunkt T8 war der durchschnittliche Horovitz-Quotient der LPS-Gruppe bei  $M = 165.30$ , was einem moderaten ARDS entspricht. Einen signifikanten Unterschied zwischen den Interventionsgruppen gab es dabei nicht. Die Tendenz zu niedrigeren Werten in der LPS-Gruppe ist ab dem Zeitpunkt T2 bis T8 grafisch zu beobachten. Auch Lim et al. beschreiben in ihrer Studie die Veränderung des PaO<sub>2</sub> /FiO<sub>2</sub> -Verhältnis als eine der wichtigsten Beobachtungen im LPS-induzierten ARDS-Modell. (Lim et al., 2023).

Dass sich die Lungenfunktion der Tiere auch in der Sham-Gruppe über den Überwachungszeitraum verschlechterte, kann außerdem durch das Instillationsvolumen mitbegründet sein. Tendenziell hohe Werte bei den Parametern *Alveoläres Ödem* und *Interstitielles Ödem* in der histologischen Schadensausprägung, wie bereits diskutiert, unterstreichen dies.

Der PaCO<sub>2</sub>-Wert zeigt keine statistisch signifikante Änderung in den Interventionsgruppen. Die leicht höheren Werte in der LPS-Gruppe bis zum Zeitpunkt T6 sind nur grafisch darstellbar. Der Ppeak fällt durch einen statistisch signifikanten Anstieg über die Zeit in allen drei Interventionsgruppen auf. Dabei vor allem von BLH zu T1, was die methodisch bedingte

pulmonale Belastung der intrabronchialen Intervention zunächst in allen Gruppen beschreibt. Besonders zum Ende des Überwachungszeitraumes hin (ab T6), fällt auf, dass die Ppeak-Werte der LPS-Gruppe tendenziell höher sind. Dies verdeutlicht, dass LPS eine Rolle in der Entwicklung höherer Ppeak-Werte zu spielen scheint. Auch die systemische Reaktion im Rahmen einer bakteriellen Infektion geht mit hohen Spitzendrücken einher (de Freitas et al., 2014).

Die FRC ergibt sich aus den Werten des Residualvolumens und des expiratorischen Reservevolumens. Letzteres kann im Rahmen eines ARDS reduziert sein (Hecker et al., 2008). In dieser Untersuchung fällt auf, dass die FRC in allen drei Interventionsgruppen tendenziell abnimmt und auch hier, passend zu den Ppeak-Verläufen, den stärksten Abfall zwischen BLH und T1 hat.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Vor dem Hintergrund der noch immer hohen Mortalität gilt es, das Krankheitsbild ARDS in seiner Pathophysiologie noch mehr zu verstehen. Die Erkenntnisse aus den Forschungen *in vitro*, im Nagetiermodell, als auch retrospektiv zeigen eine relevante Rolle von extrazellulären Histonen in der alveolären Entzündungsreaktion. Die vorliegende Dissertation beschreibt eine darauf aufbauende Studie am Schwein als Großtiermodell. Durch den Vergleich von drei Interventionsgruppen sollte erstmals im Großtier eine Wirkung von intrabronchial applizierten extrazellulären Histonen im Gegensatz zu intrabronchial appliziertem LPS untersucht werden. Der Versuch wurde durch die Behandlung von 24 Schweinen gestaltet, die in drei Interventionsgruppen mit je acht Tieren eingeteilt waren (bis T6, dann n= 7 in der LPS-Gruppe).

Die Histon-behandelten Schweine zeigten dabei keine statistisch signifikanten proinflammatorischen Reaktionen durch die intrabronchial applizierten Histone. Besonders in der histologisch betrachteten Schadensausprägung der Lungenschnitte konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den mit Sterofundin-behandelten Schweinen (Sham-Gruppe) gezeigt werden, dabei konnten jedoch Tendenzen beobachtet werden. Der überblickende Wert des TDS ist hier in der LPS-Gruppe höher als in der Histon- und der Sham-Gruppe. In der Betrachtung der einzelnen Schadensparameter sind in der LPS-Gruppe die Werte von interstitiellem Ödem und inflammatorischer Infiltration stärker ausgeprägt als in den anderen beiden Gruppen. Das alveoläre Ödem ist in der Sham-Gruppe am stärksten ausgeprägt. Der LDS zeigt eine Tendenz zur stärkeren Ausprägung des Lungenschadens im Unterlappen aller drei Interventionsgruppen. In der Einzelparameter-Betrachtung von inflammatorischer Infiltration fällt hier eine Tendenz zu erhöhten Werten vor allem im Unterlappen der LPS-Gruppe auf.

Molekularbiologisch zeigt sich eine Tendenz zur erhöhten Expression von TNF- $\alpha$  und IL-6 in der LPS-Gruppe, folgend von den Werten in der Histon-Gruppe.

Die während des Überwachungszeitraumes erhobenen Daten von Kreislauf und Spirometrie/Lungenfunktion der Tiere zeigten in der Histon-Gruppe keine statistisch signifikanten Unterschiede zur Sham- oder zur LPS-Gruppe. Dabei gab es aber Tendenzen zu erhöhten Werten der HF, des MAD und des PAP im Gegensatz zur Sham-Gruppe. In der Betrachtung der LPS-Gruppe fielen vereinzelte statistische Signifikanzen auf, aber vor allem Tendenzen zu einer erhöhten HF, einem erhöhten PAP, einem erhöhten ZVD, einem erhöhten CI, einem erhöhten Ppeak, sowie einem niedrigeren Horovitz-Quotienten und einem niedrigeren MAD auf.

Insbesondere die proinflammatorische Wirkung durch LPS konnte, wenn auch nur tendenziell, erfasst werden. Die mit extrazellulären Histonen behandelte Gruppe zeigte dabei ähnliche Ergebnisse wie die Sham-Gruppe. Es konnte somit keine statistisch signifikante proinflammatorische Wirkung von extrazellulären Histonen in der Schweinelunge gezeigt werden. Diese Ergebnisse können demnach die Ergebnisse der Vorstudien nicht bestätigen (Bosmann et al., 2013).

Der Überwachungszeitraum mit acht Stunden sollte in zukünftigen Studien verlängert werden, um die eventuell später auftretenden Reaktionen der Versuchstiere auf die jeweilige Intervention genügend detektieren zu können. Auch könnte man erwägen, die Histone, sowie die LPS-Lösung intravenös und intrabronchial zu applizieren, um die systemische Reaktion der Versuchstiere stärker darstellen zu können.

Insgesamt konnten die erhobenen Daten die proinflammatorische Wirkung extrazellulärer Histone in Kleintiermodellen nicht bestätigen. Dies macht die Ergebnisse dennoch unverzichtbar, da diese die dringende Notwendigkeit weiterer Forschung im Bereich des ARDS verdeutlichen. Zur vollständigen Klärung der Rolle von extrazellulären Histonen in der pathophysiologischen Kaskade des Lungenschadens bedarf es weiterer Untersuchungen.

## 7 Literaturverzeichnis

- ABRAMS, S. T., ZHANG, N., MANSON, J., LIU, T., DART, C., BALUWA, F., WANG, S. S., BROHI, K., KIPAR, A., YU, W., WANG, G. & TOH, C. H. 2013. Circulating histones are mediators of trauma-associated lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 187, 160-9.
- ALBERT, R. K., LEASA, D., SANDERSON, M., ROBERTSON, H. T. & HLASTALA, M. P. 1987. The prone position improves arterial oxygenation and reduces shunt in oleic-acid-induced acute lung injury. *Am Rev Respir Dis*, 135, 628-33.
- ALLAM, R., SCHERBAUM, C. R., DARISIPUDI, M. N., MULAY, S. R., HÄGELE, H., LICHTNEKERT, J., HAGEMANN, J. H., RUPANAGUDI, K. V., RYU, M., SCHWARZENBERGER, C., HOHENSTEIN, B., HUGO, C., UHL, B., REICHEL, C. A., KROMBACH, F., MONESTIER, M., LIAPIS, H., MORETH, K., SCHAEFER, L. & ANDERS, H. J. 2012. Histones from dying renal cells aggravate kidney injury via TLR2 and TLR4. *J Am Soc Nephrol*, 23, 1375-88.
- ALVA, V. & LUPAS, A. N. 2019. Histones predate the split between bacteria and archaea. *Bioinformatics*, 35, 2349-2353.
- ARAZNA, M., PRUCHNIAK, M. P., ZYCINSKA, K. & DEMKOW, U. 2013. Neutrophil extracellular trap in human diseases. *Adv Exp Med Biol*, 756, 1-8.
- ARENTS, G., BURLINGAME, R. W., WANG, B. C., LOVE, W. E. & MOUDRIANAKIS, E. N. 1991. The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 10148-52.
- AURIEMMA, C. L., ZHUO, H., DELUCCHI, K., DEISS, T., LIU, T., JAUREGUI, A., KE, S., VESSEL, K., LIPPI, M., SEELEY, E., KANGELARIS, K. N., GOMEZ, A., HENDRICKSON, C., LIU, K. D., MATTHAY, M. A., WARE, L. B. & CALFEE, C. S. 2020. Acute respiratory distress syndrome-attributable mortality in critically ill patients with sepsis. *Intensive Care Med*, 46, 1222-1231.
- BANAVASI, H., NGUYEN, P., OSMAN, H. & SOUBANI, A. O. 2021. Management of ARDS - What Works and What Does Not. *Am J Med Sci*, 362, 13-23.
- BHATTACHARYYA, S., MATTIROLI, F. & LUGER, K. 2018. Archaeal DNA on the histone merry-go-round. *Febs j*, 285, 3168-3174.
- BHAUMIK, S. R., SMITH, E. & SHILATIFARD, A. 2007. Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat Struct Mol Biol*, 14, 1008-16.
- BIDNE, K. L., DICKSON, M. J., ROSS, J. W., BAUMGARD, L. H. & KEATING, A. F. 2018. Disruption of female reproductive function by endotoxins. *Reproduction*, 155, R169-r181.
- BLANCA, M. J., ALARCÓN, R., ARNAU, J., BONO, R. & BENDAYAN, R. 2017. Non-normal data: Is ANOVA still a valid option? *Psicothema*, 29, 552-557.
- BLENNERHASSETT, J. B. 1985. Shock lung and diffuse alveolar damage pathological and pathogenetic considerations. *Pathology*, 17, 239-47.
- BOEHME, S., HARTMANN, E. K., TRIPP, T., THAL, S. C., DAVID, M., ABRAHAM, D., BAUMGARDNER, J. E., MARKSTALLER, K. & KLEIN, K. U. 2019. PO(2) oscillations induce lung injury and inflammation. *Crit Care*, 23, 102.
- BOSMANN, M., GRAILER, J. J., RUEMMLER, R., RUSSKAMP, N. F., ZETOUNE, F. S., SARMA, J. V., STANDIFORD, T. J. & WARD, P. A. 2013. Extracellular histones are essential effectors of C5aR- and C5L2-mediated tissue damage and inflammation in acute lung injury. *FASEB J*, 27, 5010-21.
- BRINKMANN, V., REICHARD, U., GOOSMANN, C., FAULER, B., UHLEMANN, Y., WEISS, D. S., WEINRAUCH, Y. & ZYCHLINSKY, A. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303, 1532-5.
- BROCCARD, A. F., SHAPIRO, R. S., SCHMITZ, L. L., RAVENSCRAFT, S. A. & MARINI, J. J. 1997. Influence of prone position on the extent and distribution of lung injury in a high tidal volume oleic acid model of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*, 25, 16-27.
- BROWER, R. G., MATTHAY, M. A., MORRIS, A., SCHOENFELD, D., THOMPSON, B. T. & WHEELER, A. 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, 1301-8.
- BUCKLEY, N. M., GOOTMAN, P. M., YELLIN, E. L. & BRAZEAU, P. 1979. Age-related cardiovascular effects of catecholamines in anesthetized piglets. *Circ Res*, 45, 282-92.
- CARDINAL-FERNÁNDEZ, P., BAJWA, E. K., DOMINGUEZ-CALVO, A., MENÉNDEZ, J. M., PAPAIZIAN, L. & THOMPSON, B. T. 2016. The Presence of Diffuse Alveolar Damage on Open Lung Biopsy Is Associated With Mortality in Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Chest*, 149, 1155-64.
- CHARAN, J. & KANTHARIA, N. D. 2013. How to calculate sample size in animal studies? *J Pharmacol Pharmacother*, 4, 303-6.
- CHEN, P. & LI, G. 2010. Dynamics of the higher-order structure of chromatin. *Protein Cell*, 1, 967-71.
- CHEN, R., KANG, R., FAN, X. G. & TANG, D. 2014. Release and activity of histone in diseases. *Cell Death Dis*, 5, e1370.
- CONCEIÇÃO-SILVA, F., REIS, C. S. M., DE LUCA, P. M., LEITE-SILVA, J., SANTIAGO, M. A., MORROT, A. & MORGADO, F. N. 2021. The Immune System Throws Its Traps: Cells and Their Extracellular Traps in Disease and Protection. *Cells*, 10.
- DE FREITAS, G. R., DA FONSECA-NETO, O. C., PINHEIRO, C. L., ARAÚJO, L. C., BARBOSA, R. E. & ALVES, P. 2014. Relationship between Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) and intra-abdominal pressure in intensive care unit. *Arq Bras Cir Dig*, 27, 256-60.
- DELANGE, R. J. & SMITH, E. L. 1971. Histones: structure and function. *Annu Rev Biochem*, 40, 279-314.
- EKANEY, M. L., OTTO, G. P., SOSSDORF, M., SPONHOLZ, C., BOEHRINGER, M., LOESCHE, W., RITTIRSCH, D., WILHARM, A., KURZAI, O., BAUER, M. & CLAUS, R. A. 2014. Impact of plasma histones in human sepsis and their contribution to cellular injury and inflammation. *Crit Care*, 18, 543.
- ENGEL, M., NOWACKI, R. M. E., JONKER, E. M., OPHELDERS, D., NIKIFOROU, M., KLOOSTERBOER, N., ZIMMERMANN, L. J. I., VAN WAARDENBURG, D. A. & KRAMER, B. W. 2020. A comparison of four different models of acute respiratory distress syndrome in sheep. *Respir Res*, 21, 209.
- FESTING, M. F. & ALTMAN, D. G. 2002. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. *Ilar j*, 43, 244-58.
- FRIGGERI, A., BANERJEE, S., XIE, N., CUI, H., DE FREITAS, A., ZERFAOUI, M., DUPONT, H., ABRAHAM, E. & LIU, G. 2012. Extracellular histones inhibit efferocytosis. *Mol Med*, 18, 825-33.
- FRYDMAN, G. H., TESSIER, S. N., WONG, K. H. K., VANDERBURG, C. R., FOX, J. G., TONER, M., TOMPKINS, R. G. & IRIMIA, D. 2020. Megakaryocytes contain extranuclear histones and may be a source of platelet-associated histones during sepsis. *Sci Rep*, 10, 4621.
- GILTHORPE, J. D., OOZEER, F., NASH, J., CALVO, M., BENNETT, D. L., LUMSDEN, A. & PINI, A. 2013. Extracellular histone H1 is neurotoxic and drives a pro-inflammatory response in microglia. *F1000Res*, 2, 148.
- GIOANNINI, T. L. & WEISS, J. P. 2007. Regulation of interactions of Gram-negative bacterial endotoxins with mammalian cells. *Immunologic research*, 39, 249-260.
- HAJJAR, A. M., ERNST, R. K., TSAI, J. H., WILSON, C. B. & MILLER, S. I. 2002. Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. *Nat Immunol*, 3, 354-9.
- HECKER, M., WALMRATH, H. D., SEEGER, W. & MAYER, K. 2008. Clinical Aspects of Acute Lung Insufficiency (ALI/TRALI). *Transfus Med Hemother*, 35, 80-88.
- HSIEH, I. N., DELUNA, X., WHITE, M. R. & HARTSHORN, K. L. 2021. Histone H4 directly stimulates neutrophil activation through membrane permeabilization. *J Leukoc Biol*, 109, 763-775.
- KAO, K. C., HU, H. C., CHANG, C. H., HUNG, C. Y., CHIU, L. C., LI, S. H., LIN, S. W., CHUANG, L. P., WANG, C. W., LI, L. F., CHEN, N. H., YANG, C. T., HUANG, C. C. & TSAI, Y. H. 2015. Diffuse alveolar damage associated mortality in selected acute respiratory distress syndrome patients with open lung biopsy. *Crit Care*, 19, 228.

- KATZENSTEIN, A., BLOOR, C. M. & LEIBOW, A. A. 1976a. Diffuse alveolar damage--the role of oxygen, shock, and related factors. A review. *The American journal of pathology*, 85, 209.
- KATZENSTEIN, A. L., BLOOR, C. M. & LEIBOW, A. A. 1976b. Diffuse alveolar damage--the role of oxygen, shock, and related factors. A review. *Am J Pathol*, 85, 209-28.
- KIM, J., BAALACHANDRAN, R., LI, Y., ZHANG, C. O., KE, Y., KARKI, P., BIRUKOV, K. G. & BIRUKOVA, A. A. 2022. Circulating extracellular histones exacerbate acute lung injury by augmenting pulmonary endothelial dysfunction via TLR4-dependent mechanism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 323, L223-L239.
- KOCH, R. 1884. Koch's Vortrag über die Cholera. *Fortschr. Med*, 16, 121-135.
- KOSSEL, A. 1928. *The protamines and histones*, Longmans, Green.
- KULKARNI, H. S., LEE, J. S., BASTARACHE, J. A., KUEBLER, W. M., DOWNEY, G. P., ALBAICETA, G. M., ALTEMEIER, W. A., ARTIGAS, A., BATES, J. H. T., CALFEE, C. S., DELA CRUZ, C. S., DICKSON, R. P., ENGLERT, J. A., EVERITT, J. I., FESSLER, M. B., GELMAN, A. E., GOWDY, K. M., GROSHONG, S. D., HEROLD, S., HOMER, R. J., HOROWITZ, J. C., HSIA, C. C. W., KURAHASHI, K., LAUBACH, V. E., LOONEY, M. R., LUCAS, R., MANGALMURTI, N. S., MANICONE, A. M., MARTIN, T. R., MATALON, S., MATTHAY, M. A., MCAULEY, D. F., MCGRATH-MORROW, S. A., MIZGERD, J. P., MONTGOMERY, S. A., MOORE, B. B., NOËL, A., PERLMAN, C. E., REILLY, J. P., SCHMIDT, E. P., SKERRETT, S. J., SUBER, T. L., SUMMERS, C., SURATT, B. T., TAKATA, M., TUDER, R., UHLIG, S., WITZENRATH, M., ZEMANS, R. L. & MATUTE-BELLO, G. 2022. Update on the Features and Measurements of Experimental Acute Lung Injury in Animals: An Official American Thoracic Society Workshop Report. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 66, e1-e14.
- LERVIK, A., RASZPLEWICZ, J., RANHEIM, B., SOLBAK, S., TOVERUD, S. F. & HAGA, H. A. 2018. Dexmedetomidine or fentanyl? Cardiovascular stability and analgesia during propofol-ketamine total intravenous anaesthesia in experimental pigs. *Vet Anaesth Analg*, 45, 295-308.
- LI, X., YE, Y., PENG, K., ZENG, Z., CHEN, L. & ZENG, Y. 2022. Histones: The critical players in innate immunity. *Front Immunol*, 13, 1030610.
- LI, Y., WAN, D., LUO, X., SONG, T., WANG, Y., YU, Q., JIANG, L., LIAO, R., ZHAO, W. & SU, B. 2021. Circulating Histones in Sepsis: Potential Outcome Predictors and Therapeutic Targets. *Front Immunol*, 12, 650184.
- LI, Y. & WEI, H. 2009. Lipopolysaccharide "two-hit" induced refractory hypoxemia acute respiratory distress model in rats. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 29, 470-5.
- LORENTE, J. A., CARDINAL-FERNÁNDEZ, P., MUÑOZ, D., FRUTOS-VIVAR, F., THILLE, A. W., JARAMILLO, C., BALLÉN-BARRAGÁN, A., RODRÍGUEZ, J. M., PEÑUELAS, O., ORTIZ, G., BLANCO, J., PINHEIRO, B. V., NIN, N., DEL CARMEN MARIN, M., ESTEBAN, A. & THOMPSON, T. B. 2015. Acute respiratory distress syndrome in patients with and without diffuse alveolar damage: an autopsy study. *Intensive Care Med*, 41, 1921-30.
- LU, Y. C., YEH, W. C. & OHASHI, P. S. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42, 145-151.
- MARIÑO-RAMÍREZ, L., KANN, M. G., SHOEMAKER, B. A. & LANDSMAN, D. 2005. Histone structure and nucleosome stability. *Expert Rev Proteomics*, 2, 719-29.
- MATTHAY, M. A., ARABI, Y., ARROLIGA, A. C., BERNARD, G., BERSTEN, A. D., BROCHARD, L. J., CALFEE, C. S., COMBES, A., DANIEL, B. M., FERGUSON, N. D., GONG, M. N., GOTTS, J. E., HERRIDGE, M. S., LAFFEY, J. G., LIU, K. D., MACHADO, F. R., MARTIN, T. R., MCAULEY, D. F., MERCAT, A., MOSS, M., MULARSKI, R. A., PESENTI, A., QIU, H., RAMAKRISHNAN, N., RANIERI, V. M., RIVIELLO, E. D., RUBIN, E., SLUTSKY, A. S., THOMPSON, B. T., TWAGIRUMUGABE, T., WARE, L. B. & WICK, K. D. 2024. A New Global Definition of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, 209, 37-47.
- MATTHAY, M. A., ZEMANS, R. L., ZIMMERMAN, G. A., ARABI, Y. M., BEITLER, J. R., MERCAT, A., HERRIDGE, M., RANDOLPH, A. G. & CALFEE, C. S. 2019. Acute respiratory distress syndrome. *Nat Rev Dis Primers*, 5, 18.

- MATUTE-BELLO, G., DOWNEY, G., MOORE, B. B., GROSHONG, S. D., MATTHAY, M. A., SLUTSKY, A. S. & KUEBLER, W. M. 2011. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 44, 725-38.
- MATUTE-BELLO, G., FREVERT, C. W. & MARTIN, T. R. 2008. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 295, L379-99.
- MESTAS, J. & HUGHES, C. C. 2004. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol*, 172, 2731-8.
- MEYERHOLZ, D. K. & BECK, A. P. 2018. Fundamental Concepts for Semiquantitative Tissue Scoring in Translational Research. *Ilar j*, 59, 13-17.
- MYSZOR, I. T. & GUDMUNDSSON, G. H. 2023. Modulation of innate immunity in airway epithelium for host-directed therapy. *Front Immunol*, 14, 1197908.
- NOVA, Z., SKOVIEROVA, H. & CALKOVSKA, A. 2019. Alveolar-Capillary Membrane-Related Pulmonary Cells as a Target in Endotoxin-Induced Acute Lung Injury. *Int J Mol Sci*, 20.
- PARSEGHIAN, M. H. & LUHRS, K. A. 2006. Beyond the walls of the nucleus: the role of histones in cellular signaling and innate immunity. *Biochem Cell Biol*, 84, 589-604.
- QUINTEL, M., HEINE, M., HIRSCHL, R. B., TILLMANN, R. & WESSENDORF, V. 1998. Effects of partial liquid ventilation on lung injury in a model of acute respiratory failure: a histologic and morphometric analysis. *Crit Care Med*, 26, 833-43.
- RAETZ, C. R., ULEVITCH, R. J., WRIGHT, S. D., SIBLEY, C. H., DING, A. & NATHAN, C. F. 1991. Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. *Faseb j*, 5, 2652-60.
- RANIERI, V. M., RUBENFELD, G. D., THOMPSON, B. T., FERGUSON, N. D., CALDWELL, E., FAN, E., CAMPOROTA, L. & SLUTSKY, A. S. 2012. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *Jama*, 307, 2526-33.
- RIETSCHEL, E. T. & CAVAILLON, J. M. 2003. Richard Pfeiffer and Alexandre Besredka: creators of the concept of endotoxin and anti-endotoxin. *Microbes Infect*, 5, 1407-14.
- RISSEL, R., RENZ, M., MOHNKE, K., RIEDEL, J., RITTER, K., ZIEBART, A., RUEMLER, R., HARTMANN, E. K. & KAMUF, J. 2022. Comparison of two porcine acute lung injury models: a post-hoc analysis. *Intensive Care Med Exp*, 10, 37.
- RUEMLER, R., ZIEBART, A., BRITTEN, E., KAMUF, J., GARCIA-BARDON, A. & HARTMANN, E. K. 2021. Targeted fibre-optical intrabronchial lipopolysaccharide administration in pigs - a methodical refinement for improved accuracy in respiratory research. *Vet Anaesth Analg*, 48, 26-34.
- RUEMLER, R., ZIEBART, A., MOELLMANN, C., GARCIA-BARDON, A., KAMUF, J., KUROPKA, F., DUENGES, B. & HARTMANN, E. K. 2018. Ultra-low tidal volume ventilation-A novel and effective ventilation strategy during experimental cardiopulmonary resuscitation. *Resuscitation*, 132, 56-62.
- RUEMLER, R., ZIEBART, A., OTT, T., DIRVONSKIS, D. & HARTMANN, E. K. 2020. Flexible fibreoptic intubation in swine - improvement for resident training and animal safety alike. *BMC Anesthesiol*, 20, 206.
- RUSSELL, W. M. S. & BURCH, R. L. 1959. *The principles of humane experimental technique*, Methuen.
- RYU, J. H., KIM, C. H. & YOON, J. H. 2010. Innate immune responses of the airway epithelium. *Mol Cells*, 30, 173-83.
- SCHNEBERGER, D., AHARONSON-RAZ, K. & SINGH, B. 2012. Pulmonary intravascular macrophages and lung health: what are we missing? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 302, L498-503.
- SCHROMM, A. B., BRANDENBURG, K., LOPPNOW, H., MORAN, A. P., KOCH, M. H., RIETSCHEL, E. T. & SEYDEL, U. 2000. Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion. *Eur J Biochem*, 267, 2008-13.
- SILK, E., ZHAO, H., WENG, H. & MA, D. 2017. The role of extracellular histone in organ injury. *Cell Death Dis*, 8, e2812.
- SILVA, I. A. N., GVAZAVA, N., BÖLÜKBAS, D. A., STENLO, M., DONG, J., HYLLEN, S., PIERRE, L., LINDSTEDT, S. & WAGNER, D. E. 2022. A Semi-quantitative Scoring

- System for Green Histopathological Evaluation of Large Animal Models of Acute Lung Injury. *Bio Protoc*, 12.
- SPIETH, P. M., GULDNER, A. & GAMA DE ABREU, M. 2017. [Acute respiratory distress syndrome : Basic principles and treatment]. *Anaesthetist*, 66, 539-552.
- SPIETH, P. M., KNELS, L., KASPER, M., DOMINGUES QUELHAS, A., WIEDEMANN, B., LUPP, A., HÜBLER, M., NETO, A. G., KOCH, T. & GAMA DE ABREU, M. 2007. Effects of vaporized perfluorohexane and partial liquid ventilation on regional distribution of alveolar damage in experimental lung injury. *Intensive Care Med*, 33, 308-14.
- TALBERT, P. B. & HENIKOFF, S. 2021. Histone variants at a glance. *J Cell Sci*, 134.
- TIBA, M. H., MCCracken, B. M., LEANDER, D. C., COLMENERO, C. I., NEMZEK, J. A., SJODING, M. W., KONOPKA, K. E., FLOTT, T. L., VANEPPS, J. S., DANIELS, R. C., WARD, K. R., STRINGER, K. A. & DICKSON, R. P. 2021. A novel swine model of the acute respiratory distress syndrome using clinically relevant injury exposures. *Physiol Rep*, 9, e14871.
- TOMASHEFSKI, J. F., JR. 2000. Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med*, 21, 435-66.
- TSUNO, K., MIURA, K., TAKEYA, M., KOLOBOW, T. & MORIOKA, T. 1991. Histopathologic pulmonary changes from mechanical ventilation at high peak airway pressures. *Am Rev Respir Dis*, 143, 1115-20.
- URMANN, A., MOHNKE, K., RIEDEL, J., HAIN, J., RENZ, M., RISSEL, R., DUENGES, B., RUEMLER, R. & ZIEBART, A. 2023. Lipopolysaccharide Infusion as a Porcine Endotoxemic Shock Model. *J Vis Exp*.
- WARNER, A. E. 1996. Pulmonary intravascular macrophages. Role in acute lung injury. *Clin Chest Med*, 17, 125-35.
- WEBB, H. H. & TIERNEY, D. F. 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.
- WILDHAGEN, K. C., WIEWEL, M. A., SCHULTZ, M. J., HORN, J., SCHRIJVER, R., REUTELINGSPERGER, C. P., VAN DER POLL, T. & NICOLAES, G. A. 2015. Extracellular histone H3 levels are inversely correlated with antithrombin levels and platelet counts and are associated with mortality in sepsis patients. *Thromb Res*, 136, 542-7.
- XU, H., SHENG, S., LUO, W., XU, X. & ZHANG, Z. 2023. Acute respiratory distress syndrome heterogeneity and the septic ARDS subgroup. *Front Immunol*, 14, 1277161.
- XU, Z., HUANG, Y., MAO, P., ZHANG, J. & LI, Y. 2015. Sepsis and ARDS: The Dark Side of Histones. *Mediators Inflamm*, 2015, 205054.
- YOSHIDA, T., ENGELBERTS, D., CHEN, H., LI, X., KATIRA, B. H., OTULAKOWSKI, G. & FUJINO, Y. 2022. Prone Position Minimizes the Exacerbation of Effort-dependent Lung Injury: Exploring the Mechanism in Pigs and Evaluating Injury in Rabbits. *Anesthesiology*, 136, 779-791.
- ZHANG, J., GUO, Y., MAK, M. & TAO, Z. 2024. Translational medicine for acute lung injury. *J Transl Med*, 22, 25.
- ZIEBART, A., GARCIA-BARDON, A., KAMUF, J., THOMAS, R., LIU, T., SCHAD, A., DUENGES, B., DAVID, M. & HARTMANN, E. K. 2015. Pulmonary effects of expiratory-assisted small-lumen ventilation during upper airway obstruction in pigs. *Anaesthesia*, 70, 1171-9.
- ZIEBART, A., HARTMANN, E. K., THOMAS, R., LIU, T., DUENGES, B., SCHAD, A., BODENSTEIN, M., THAL, S. C. & DAVID, M. 2014a. Low tidal volume pressure support versus controlled ventilation in early experimental sepsis in pigs. *Respir Res*, 15, 101.
- ZIEBART, A., HARTMANN, E. K., THOMAS, R., LIU, T., DUENGES, B., SCHAD, A., BODENSTEIN, M., THAL, S. C. & DAVID, M. 2014b. Low tidal volume pressure support versus controlled ventilation in early experimental sepsis in pigs. *Respir Res*, 15, 101.

## 8 Anhang

### 8.1 Paraffineinbettung

Tabelle 6: Protokoll zur Paraffineinbettung

Arbeitsschritt	Verwendete Chemikalie	Dauer in Stunden [h]
Fixierung	Formalin 4%	1
	Formalin 4%	2
Entwässerung	Alkohol 70%	1
	Alkohol 80%	1
	Alkohol 96%	1
	Alkohol 100%	1
	Alkohol 100%	1,5
Intermedium	Xylol 100%	1
	Xylol 100%	1
Einbettung	Paraffinwachs	1
	Paraffinwachs	1
	Paraffinwachs	1
	Paraffinwachs	1

## 8.2 H.E.-Färbung

*Tabelle 7: H.E.-Färbeprotokoll*

Arbeitsschritt	Reagenzien	Dauer in Minuten
1	Histo-Clear II	3- 3,5
2	Histo-Clear II	3- 3,5
3	Ethanol 96%	10
4	Ethanol 96%	120
5	Ethanol 70%	120
6	Wasser	60
7	Hämatoxylin	90
8	Wasser	90
9	Hämatoxylin	90
10	Wasser	90
11	Ethanol 70%	60
12	Eosin	60
13	Ethanol 96%	60
14	Ethanol 96%	60
15	Ethanol 96%	60
16	Ethanol 96%	60
17	Histo-Clear II	60

### 8.3 Protokoll, Programm und Primer zum Zielgenachweis

Tabelle 8: Light-Cycler Protokoll

Menge	Bezeichnung
5 µl	Probes Master
0,25 µl	Primer F
0,25 µl	Primer R
3,5 µl	H <sub>2</sub> O
1 µl	cDNA

Tabelle 9: Light-Cycler Programm

Bezeichnung	Temperatur [°C]	Zeit [Sek]	Anzahl der Zyklen
Präinkubation	95	15	1
Denaturierung	95	10	1
Annealing	58	10	50
Extension	72	15	1
Denaturierung	95	5	1
Annealing	55	60	1
Melting	97, mit einem Anstieg von 2,2 °C/ Sek		
Cooling	40	10	1

Tabelle 10: Primer zum Zielgennachweis

PPIA S	CTTTCACAgAATAATTCCAggATT	Dynamo <sup>TM</sup> Color Flash  F-456L	Biozym
PPIA A	ggACAAgATgCCAggACC		
PPIA FL	ATgCTTCAggATAAAATTCTCATCATCAAA(--FL)		
PPIA CY5	(L670-)TTCTCTCCATAgATggACTTgCCACCA(--PH)		
sIL 6 S	CCAATCTgggTTCAATCAggA	Dynamo <sup>TM</sup> Color Flash  F-456L	Biozym
sIL 6 A	gTggTggCTTTgTCTggATTC		
sIL6 FL	TgTCgAggCTgTgCgAgATTAgTACCA(--FL)		
sIL6 CY5	(L670-)gCACTgATCCAgACCCTgAggCAA(--PH)		
TNFa F	CCCAGAAggAAgAgTTTCCA	Dynamo <sup>TM</sup> Color Flash  F-456L	Biozym
TNFa R	CggCTTTgACATTggCTACA		
TNFa FL	ggCCCAAggACTCAgATCATCgTC(--FL)		
TNFaCY5	(L670-)CAAACCTCAgATAAgCCCgTCgC(--PH)		
sIL1 F	ACCCTgCAgCTggAggAT	Absolute Blue qPCR SybrgreenMix AB-4166	Thermo Scientific
sIL1 R	CCTTTggAgTTTCCCAggA		

## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich von ganzem Herzen bei allen Menschen bedanken, die mir während der gesamten Zeit der Fertigstellung dieser Dissertation zur Seite standen!

Zunächst geht mein großer Dank an [REDACTED], der mich in die Arbeitsgruppe des Tier-OPs aufnahm, mir dieses Dissertationsthema zur Verfügung stellte und mir mit seiner fachlichen Kompetenz viel beigebracht hat. Ich bin sehr dankbar dafür, dass ich einen so zuverlässigen Betreuer hatte, der sich stets zeitnah zurückmeldete und immer produktives Feedback gab.

Die Zeit im Labor wurde mir vor allem durch die lustige, empathische und zugleich sehr kompetente Art von [REDACTED] versüßt, an dieser Stelle ein großes Danke an dich [REDACTED]! Auch meinen Mitdoktoranden und meiner Mitdoktorandin möchte ich danken für die gemeinsame Zeit im Labor, den stetigen Austausch und die gegenseitige Hilfe. Ich wünsche Euch alles Gute für eure ärztliche Tätigkeit!

Außerdem möchte ich meiner Familie, meinen Eltern und meinen Geschwistern danken, die mich zu dem Menschen geformt haben, der ich heute bin. Danke für euren Glauben an mich, für eure Unterstützung und Motivation!

Danke auch an meine lieben KommilitonInnen, wir haben uns gegenseitig motiviert, uns ausgetauscht und immer weiter gemacht, bis wir es dann geschafft haben! Ich bin froh euch während des gesamten Studiums und während meines Promotionsvorhabens an meiner Seite gehabt zu haben. Und ich bin sehr davon überzeugt, dass ihr alle wundervolle ÄrztInnen werdet!

Zu guter Letzt danke ich [REDACTED] und [REDACTED] für die vielen Stunden, die ihr mir den Rücken freigehalten habt, um diese Dissertation fertigzustellen. Für die vielen Tipps und Tricks, für die viele Liebe und Geborgenheit, den Rückhalt und die Ablenkung. Worte können das Gefühl der Dankbarkeit nicht beschreiben, das ich empfinde, eine so tolle eigene Familie zu haben!

## **10 Tabellarischer Lebenslauf**