

Regulation der Apoptose mononukleärer Leukozyten bei erhöhten  
Sauerstoffpartialdrücken

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

Christian Frederik Neitzel  
aus Braunschweig

2010

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Privatdozent Dr. med. Stefan Schröder
2. Gutachter: Professor Dr. med. Dipl. Biol. Birgit Stoffel-Wagner

Tag der Mündlichen Prüfung: 21.09.2009

Aus: Klinik und Poliklinik für Anästhesie und spezielle Intensivmedizin  
der Universität Bonn

Direktor: Prof. Dr. med. A. Hoefft

Meinen Eltern,  
denen ich alles verdanke.



ABKÜRZUNGEN.....	7
1. EINFÜHRUNG .....	11
<b>1.1 SAUERSTOFF-TOXIZITÄT .....</b>	<b>11</b>
<b>1.2 SAUERSTOFF-TOXIZITÄT BEIM TAUCHEN.....</b>	<b>14</b>
1.2.1 TAUCHGANGSPROFIL.....	14
1.2.2 SAUERSTOFFPARTIALDRUCK.....	15
1.2.3 SAUERSTOFF-TOXIZITÄT BEIM TAUCHEN .....	16
<b>1.3 APOPTOSEINDUKTION DURCH SAUERSTOFF .....</b>	<b>20</b>
<b>1.4 HYPOTHESE UND BEGRÜNDUNG DER DISKUSSION .....</b>	<b>27</b>
2. MATERIAL UND METHODEN.....	28
<b>2.1 MATERIAL28</b>	
2.1.1 MATERIAL .....	28
2.1.2 GERÄTE .....	33
2.1.3 SOFTWARE.....	34
<b>2.2 ÜBERBLICK 34</b>	
<b>2.3 KOLLEKTIVE 35</b>	
2.3.1 BELASTUNGSGRUPPE.....	35
2.3.2 KONTROLLGRUPPE.....	36
2.3.3 AUSSCHLUßKRITERIEN.....	38
<b>2.4 PROBENGEWINNING UND MATERIAL .....</b>	<b>38</b>
2.4.1 MRNA .....	38
2.4.2 MONONUKLEÄRE ZELLEN.....	39
2.4.3 BLUTBILD .....	40
<b>2.5 QUANTIFIZIERUNG MRNA.....</b>	<b>40</b>
2.5.1 MRNA-ISOLIERUNG .....	40
2.5.2 TRANSKRIPTION CDNA .....	41
2.5.3 QUANTIFIZIERUNG.....	42
<b>2.6 QUANTIFIZIERUNG DURCHFLUßZYTOMETRIE .....</b>	<b>42</b>
2.6.1 PROTEINEXTRAKTION .....	42

2.6.2 DURCHFLUßZYTOMETRIE .....	43
2.6.3 CLUSTER BEAD ARRAY .....	45
<b>2.7 STATISTIK</b>	<b>46</b>
<b>2.8 ETHIK</b>	<b>47</b>
<b>2.9 FÖRDERUNG</b>	<b>47</b>
3. ERGEBNISSE .....	48
<b>3.1 PROBANDENKOLLEKTIV .....</b>	<b>48</b>
3.2 MRNA .....	49
3.2.1 MRNA BCL-2 .....	49
3.2.2 MRNA BCL-XL .....	50
3.2.3 MRNA BAX .....	51
<b>3.3 CBA</b>	<b>52</b>
3.3.1 BCL-2-PROTEINEXPRESSION .....	52
3.3.2 KASPASE 3-AKTIVIERUNG .....	53
<b>3.4 LEUKOZYTEN .....</b>	<b>54</b>
4. DISKUSSION .....	55
<b>4.1 STELLENWERT DER SAUERSTOFFTOXIZITÄT FÜR DIE APOPTOSEAKTIVIERUNG.....</b>	<b>56</b>
<b>4.2 STUDIENERGEBNISSE .....</b>	<b>58</b>
<b>4.4 INTERPRETATION .....</b>	<b>61</b>
5. ZUSAMMENFASSUNG .....	66
VERZEICHNIS DER TABELLEN/ABBILDUNGEN.....	69
LITERATURVERZEICHNIS .....	70
DANKSAGUNG.....	73
LEBENSLAUF.....	75

## Abkürzungen

AIF	Apoptose induzierender Faktor
Apaf-1	apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1
AU	unskalierte Einheit
Bax	proapoptotisches Enzym
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	antiapoptotisches Enzym
Bcl-xl	antiapoptotisches Enzym
BH4	Homologiedomäne der Bcl-2-Proteinfamilie
Bid	proapoptotisches Enzym
CAD	Kaspase-aktivierte DNase
CBA	Cytometric Bead Array, Sonderform des Sandwich-ELISA mit Latexkügelchen für Durchflußzytometrie
CD95	Rezeptor der TNF-Rezeptorfamilie
CD95L	Apoptose-auslösendes Protein
cDNA	komplementäre DNA
CLP	Zökumligatur und -punktion
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Cu <sup>2+</sup>	Kupfer
d	Tiefe
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAsen	Desoxyribonukleinsäure- abbauendes Enzym
EAN	Stickstoff-Sauerstoff-Gemisch
EANx	Stickstoff-Sauerstoff-Gemisch
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluoreszenz-Durchflußzytometrie
FAS	Rezeptor der TNF-Rezeptorfamilie
FADD	FAS- assoziiertes Protein mit Todesdomäne
F <sub>i</sub> O <sub>2</sub>	inspiratorische Sauerstofffraktion
g	Erdbeschleunigung (Maßeinheit)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxyd

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HBO	hyperbare Oxygenierung
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HO-1	Hämoxygenase-1
HPRT	Hauswächter-Gen
IAP	Inhibitor von Apoptoseproteinen
IL	Interleukin
LAR V	Kreislauftauchgerät
M 920	Polykaspaseinhibitor
M-971	selektiver Kaspase-3-Inhibitor
MedGV	Medizingeräteverordnung
MNZ	periphere mononukleäre Zellen
MPBetreibVO	Medizinproduktebetreiberverordnung
Nitrox	Stickstoff-Sauerstoff-Gemisch
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid-Anionen
OH	Hydroxylradikale
P	Totaldruck
p	Partialdruck
p53	Tumorsuppressorprotein
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
p <sub>Umgebung</sub>	Umgebungsdruck
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonukleinsäure abbauendes Enzym
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen/Minute (rounds per minute)
rtPCR	Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
SchiffMedInstM	Schiffahrtmedizinische Institut der Marine
SIRS	Systemisches Entzündungssyndrom
t	Zeit
t <sub>0</sub>	Zeitpunkt des Expositionsbeginns
t <sub>1</sub>	Zeitpunkt 24 h nach Expositionsbeginn



tBid	trunkiertes Bid
TGF- $\beta$	Wachstumsfaktor (transforming growth factor)
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TÜV	Technischer Überwachungsverein
VDST	Verband Deutscher Sporttaucher e. V
ZNS	Zentrales Nervensystem
z-VAD	Polykaspaseinhibitor



## 1. Einführung

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit dem immunsupprimierenden Effekt von hyperbarem Sauerstoff im menschlichen Körper und der abgeleiteten Fragestellung, welche Rolle dabei dem programmierten Zelltod zukommt.

### 1.1 Sauerstoff-Toxizität

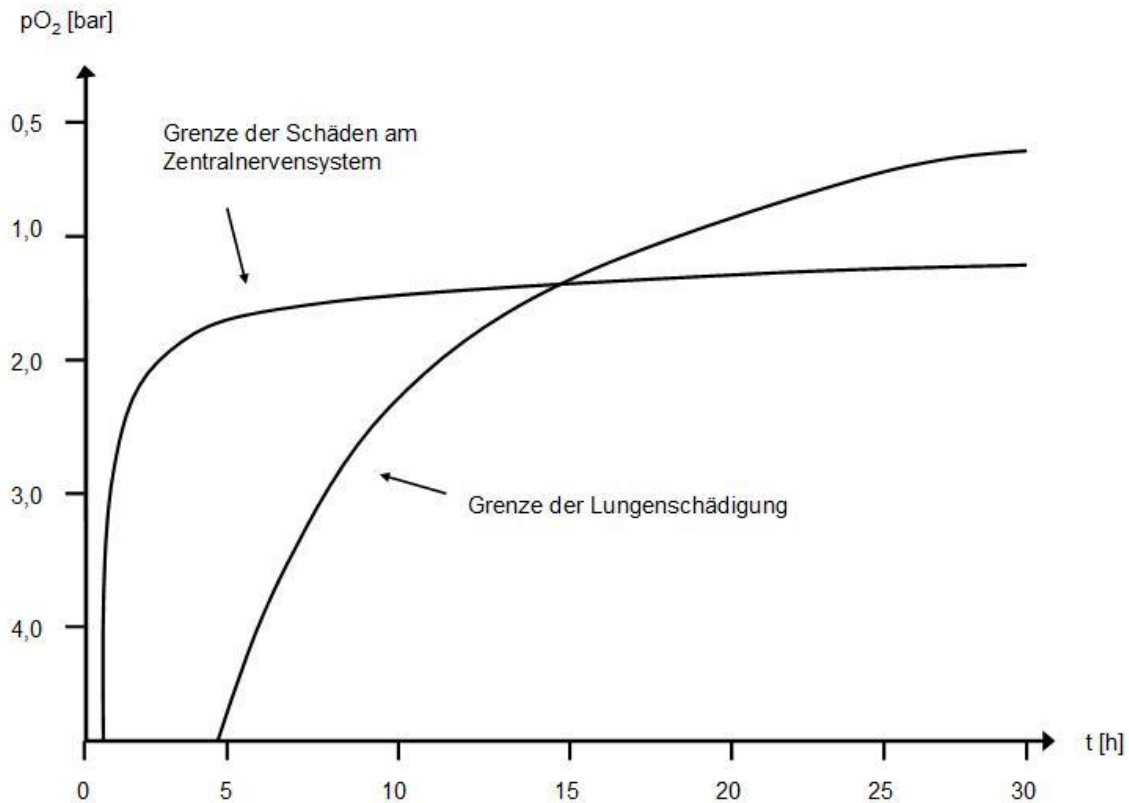
Sauerstoff ist unabdingbar notwendig für menschliches Leben. Gemäß Paracelsus' (1493-1541) „Dosis sola venenum facit“ – allein die Menge macht das Gift – kann ein Überangebot von Sauerstoff aber auch schädliche Auswirkungen im menschlichen Organismus haben.

Die erste Beschreibung einer toxischen Komponente von Sauerstoff findet sich Ende des 19. Jahrhunderts. Damals wurden am Tiermodell unter erhöhtem O<sub>2</sub>-Druck Krampfanfälle beobachtet (Bert, 1878). 1899 konnte Smith Lungenschädigungen nach längerer Atmung von reinem Sauerstoff nachweisen. Beide Pathologien wurden nach ihren Erstbeschreibern „Paul-Bert-Effekt“ und „Lorraine-Smith-Effekt“ benannt.

Wesentliche ursächliche Unterscheidungsmerkmale zwischen beiden Krankheitsbildern stellen dabei der Sauerstoffpartialdruck sowie die Expositionszeit dar. Sauerstoffinduzierte Krampfanfälle treten insbesondere abhängig vom Sauerstoffpartialdruck auf, während Lungenschäden vor allem von der Expositionszeit beeinflusst werden (Abb. 1).

Beim Lorraine-Smith-Effekt handelt es sich um eine Lungenschädigung durch Sauerstoffexposition. Als kritische Grenze gilt ein länger einwirkender pO<sub>2</sub> > 0,6 bar. Sauerstoffradikale führen durch Schädigung des Lungengewebes und des Oberflächenfaktors zu einer Verdickung der Alveolarmembran, Atelektasen- und Ödembildung und später auch zur Hyalinisierung der pulmonalen Gefäße. Physiologisch resultiert dies in einer Abnahme von Vitalkapazität und Compliance (Carl, 1997). Mit

passageren Symptomen des Lorraine-Smith-Effektes ist ab einer Expositionszeit von vier Stunden zu rechnen, ab drei Tagen besteht die Gefahr einer irreversiblen Schädigung. Höhere Sauerstoffpartialdrücke verkürzen diese Zeitspanne (Ehm, 2007).



**Abb. 1: Grenzen der Schädigung durch Sauerstoffexposition abhängig vom Sauerstoff-Partialdruck und der Expositionszeit; Vergleich zwischen Paul-Bert-Effekt (ZNS) und Lorraine-Smith-Effekt (Lunge) (nach: Ehm, 2007).**

Der Paul-Bert-Effekt hingegen ist ein akutes Krankheitsbild. Unter sehr hohen Sauerstoffpartialdrücken zwischen zwei und drei bar kommt es schon nach wenigen Minuten zu tonisch-klonischen Krampfanfällen, die klinisch epileptischen Anfällen gleichen und häufig mit einer Aura und postiktalen Phase einhergehen. Bei Persistenz der Sauerstoffexposition kann es zu epileptischen Salven bis hin zum Status epilepticus kommen (Ehm, 2007). Hinsichtlich der Vulnerabilität besteht nicht nur ein hoher

interindividueller, sondern auch ein ausgeprägter intraindividueller Unterschied. So kann der einen Sauerstoffkrampf auslösende Sauerstoffpartialdruck sich beim gleichen Probanden an verschiedenen Tagen erheblich verändern (Donald, 1992). Die kritische Grenze im Hinblick auf die ZNS-Toxizität wird in der gängigen tauchmedizinischen Fachliteratur zwischen 1,7 bar (Ehm, 2007) und 2,0 bar (Welslau, 2007) gezogen. Bei der typischen Expositionsdauer von 30 min bis zu maximal wenigen Stunden im Bereich des Sporttauchens wird als allgemeiner Konsens der Tauchsportverbände die Einhaltung eines Sauerstoffpartialdrucks von höchstens 1,4 bis 1,6 bar Sauerstoffpartialdruck als Krampfanfallsprophylaxe für ausreichend erachtet (Waldbrenner, 2007 a).

Erste Hinweise auf freie Radikale als einen möglichen wesentlichen Schädigungsmechanismus des Sauerstoffes veröffentlichten Gerschman et al. 1954. Im Gegensatz zum Sauerstoff selber, der nur ein schwaches Oxidationsmittel ist, verfügen manche seiner Metaboliten über ein hohes Oxidationspotential mit weitreichenden Schädigungsmöglichkeiten bei menschlichen Zellen (Chance et al., 1979). Aufgrund seiner hohen Reaktionsbereitschaft ist dies z. B. das von  $H_2O_2$  abgeleitete Hydroxylradikal, das eines der reaktivsten Moleküle der Biochemie darstellt (Halliwell und Gutteridge, 1989). Eine Vielzahl von Krankheiten wird mit Reaktionen freier Radikale in Verbindung gebracht (Halliwell, 1994).

Im menschlichen Organismus existieren unterschiedliche enzymatische und nichtenzymatische Antioxidationsmittel, die durch Reduktion zytoprotektiv wirken. Ein wichtiges Beispiel ist das schwefelhaltige Glutathion, das durch Reduktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser die Bildung von Hydroxylradikalen vermeidet (Robinson et al., 1992). Auch das körperfremde N-Acetylcystein hat als Glutathion-Analogon aufgrund seiner Sulfhydrylgruppe eine antioxidative Potenz und wird mit Erfolg z. B. beim Systemic Inflammatory Response Syndrom (SIRS) angewandt (Henderson und Hayes, 1994).

Das Ausmaß oxidationsinduzierter Zellschäden hängt im Wesentlichen vom Gleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen Aktivitäten im Organismus ab. Beim Überwiegen der oxidierenden Komponente kommt es zu Gewebsschäden (Smith,

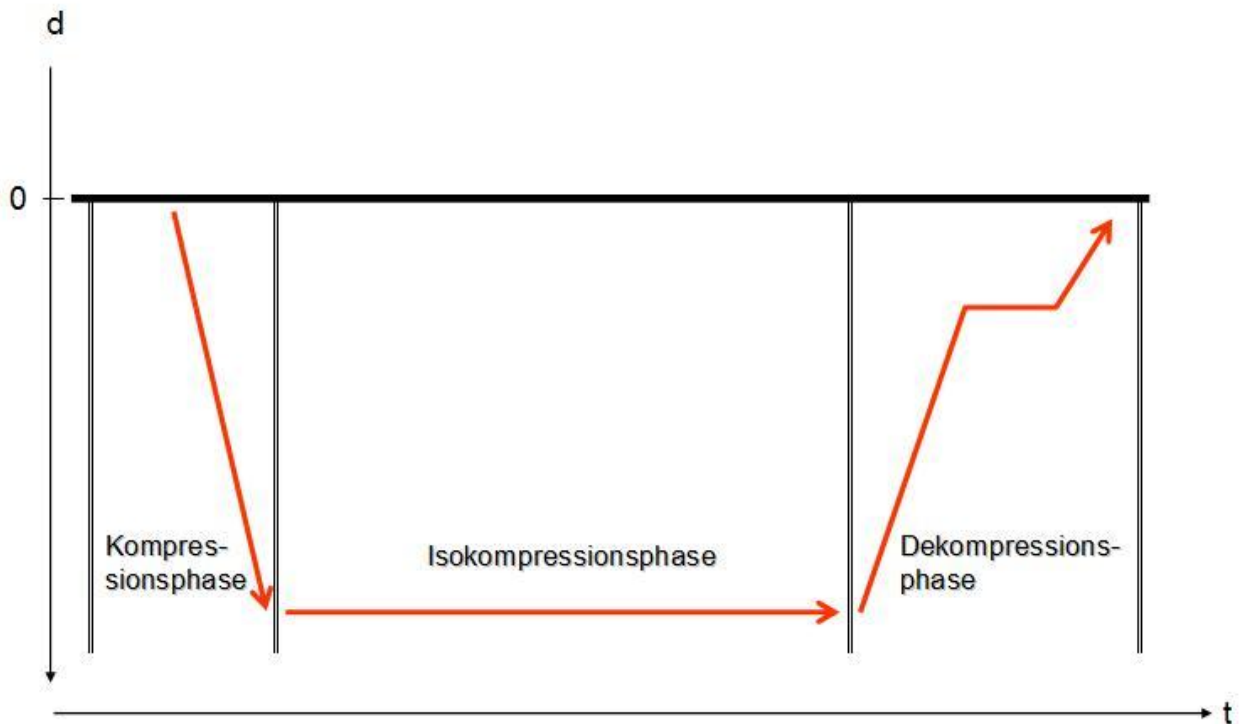
1991). Diese toxische Wirkung wird als oxidativer Stress bezeichnet (Freeman und Crapo, 1981).

Erhöhter Sauerstoffpartialdruck kann eine Vielzahl von Schädigungslokalisationen bedingen. Neben den vorbeschriebenen Krankheitsbildern des Lorraine-Smith- und Paul-Bert-Effekts sind z. B. Fälle von Ablatio retinae, Zerstörung von Sehzellen und schlussendlich Erblindung beschrieben. Ebenfalls bekannt sind Erythrozytenhämolyse, Einflüsse auf endokrine Organe und Schädigungen von Niere, Myokard und Leber. In das Blickfeld der gegenwärtigen Forschung rückt zunehmend auch die Schädigung des Gefäßendothels (Clark und Thom, 2003).

## 1.2 Sauerstoff-Toxizität beim Tauchen

### 1.2.1 Tauchgangsprofil

Ideale Tauchgänge unterteilen sich in drei relevante Phasen (Abb. 2): Die Kompressionsphase, in der der Taucher auf die geplante Tauchtiefe absteigt, gefolgt von der Isopressionsphase, während der ungefähr gleichbleibende Umgebungsdrücke auf den Taucher bei gleichbleibender Tauchtiefe einwirken. Der Aufstieg zur Rückkehr an die Wasseroberfläche wird als Dekompressionsphase bezeichnet (Kromp et al., 2002 a). Da die Kompressions- und Dekompressionsphase hinsichtlich der Thematik dieser Arbeit zu vernachlässigen sind, wird im Weiteren lediglich auf die Isokompressionsphase eingegangen. Auch das tauchmedizinisch hochrelevante Feld der Gewebesättigung mit Inertgasen wird nicht vertieft.



**Abb. 2: Tauchgangsphasen eines idealen Tauchgangs;** d = Tiefe, t = Zeit; Nach Abschluss der Kompressionsphase beim Abstieg beginnt mit Erreichen der Tauchgangstiefe die Isokompressionsphase. Der Aufstieg zur Wasseroberfläche stellt die Dekompressionsphase dar.

### 1.2.2 Sauerstoffpartialdruck

Während der Isokompressionsphase stehen die Gase für einen längeren Zeitraum unter erhöhtem Druck. Ihr Effekt wird durch ihre Partialdrücke bestimmt, die relevant für physikalische, chemische und physiologische Wirkung sind (Ehm, 2007).

Der prozentuale Mengenanteil von Sauerstoff ist z. B. für die Vigilanz von nachrangiger Bedeutung. So atmeten beim Druckkammer-Experiment „Physalie VI“ der Firma COMEX, Marseille, Probanden bei einer simulierten Tiefe von 610 m über einen Zeitraum von 80 min ein Gasmisch mit einem Sauerstoffanteil  $F_{iO_2}=0,65\%$  ohne Bewusstseinsstörungen (Rostain und Charpy, 1976). Unter atmosphärischem Druck tritt diese bereits bei  $F_{iO_2}=11\%$  auf.

Die maßgebende Größe stellt der Partialdruck des Sauerstoffes dar, der von Dalton (1766-1844) beschrieben worden ist. Der Totaldruck  $P$  eines Gasgemisches setzt sich danach zusammen aus den Partialdrücken  $p$  von  $n$  chemischen Bestandteilen zusammen:

$$P = p_1 + p_2 + p_3 + \dots + p_n$$

Analog gilt für die prozentuale Zusammensetzung:

$$F = 100\% = f_1 + f_2 + f_3 + \dots + f_n$$

Demnach liegt bei Atmosphärendruck auf Meereshöhe (ca. 1 bar) bei regulärem  $f_{iO_2}=21\%$  ein Sauerstoffpartialdruck von  $p_{O_2} = 210$  mbar an, während im Experiment „Physalie VI“ bei einem Umgebungsdruck in 610 m simulierter Tiefe von 62 bar trotz geringem  $f_{iO_2}=0,65\%$  ein  $p_{O_2}=403$  mbar anlag. Dies erklärt die fehlende Vigilanzstörung der Probanden (Ehm, 2007).

### 1.2.3 Sauerstoff-Toxizität beim Tauchen

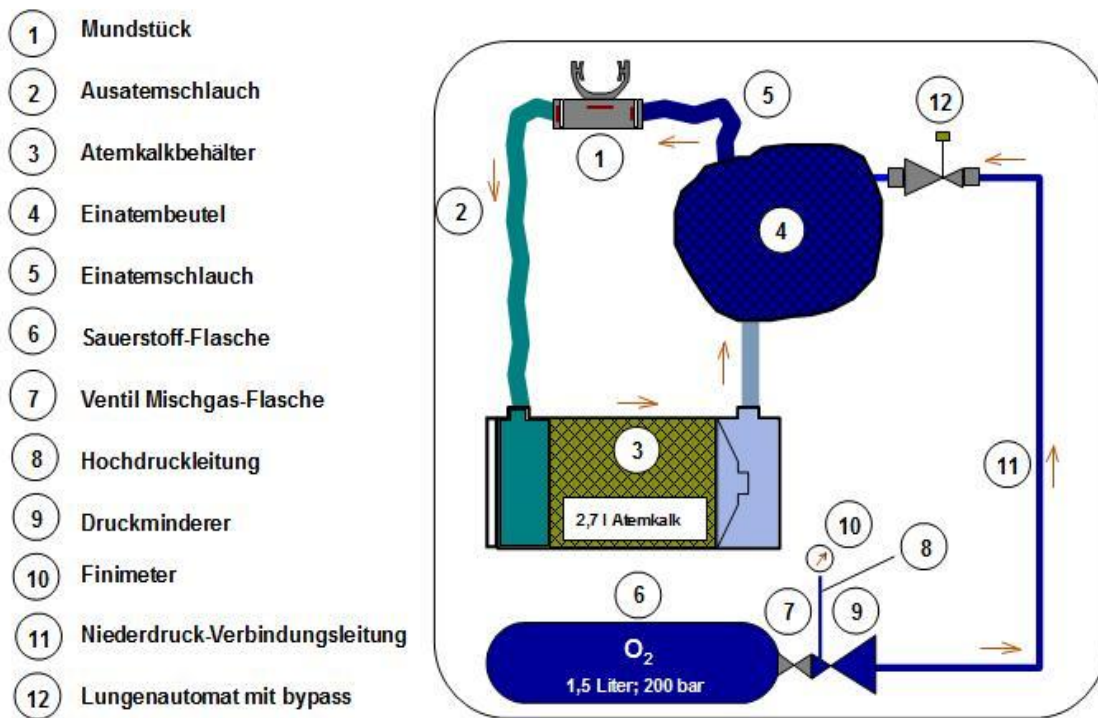
Im Bereich des Sporttauchens, wie auch des militärischen Tauchens, ist die Druckexposition zeitlich auf wenige Stunden begrenzt. Unter diesem Parameter ist nach derzeitigem Stand der Forschung vor allem die akute ZNS-Toxizität ab 1,7 bar Sauerstoffpartialdruck der nach oben limitierende Faktor der zumutbaren Sauerstoffexposition, während nach unten eine mangelnde Sauerstoffversorgung mit drohender Vigilanzstörung und verringerter körperlicher Leistungsfähigkeit im Bereich von 0,1-0,15 bar die Bandbreite begrenzt (Ehm, 2007).

Beim Tauchen mit Pressluft ( $f_{iO_2}=21\%$ ) wird der kritische Wert von 1,7 bar erst bei einer Tauchtiefe von 71 m erreicht. Diese Tiefe wird mit Drucklufttauchgeräten regelmäßig nicht erreicht (Kromp et al., 2002 b).



Von enormer Wichtigkeit ist dieser Sachverhalt hingegen beim professionellen Tauchen im militärischen Bereich, z. B. den Spezialisierten Einsatzkräften der Deutschen Bundesmarine:

Im Waffentaucherdienst werden verschiedene Tauchgeräte eingesetzt, die an den jeweiligen Einsatzzweck angepasst sind. Im Regelfall sind dies „Rebreather“, also Kreislauf-Tauchgeräte (Abb. 3), die als geschlossenes System die Ausatemluft nicht ins Wasser entweichen lassen, sondern den verbrauchten Sauerstoffanteil aus einer Druckluftflasche ersetzen und expiratorisches CO<sub>2</sub> in einer Atemkalkpatrone binden (Waldbrenner, 2007 b).



**Abb. 3: Schemazeichnung Kreislauf-Tauchgerät LAV V, Fa. Dräger;** die Ausatemluft wird dem Gerät wieder zugeführt (1,2) und der enthaltene CO<sub>2</sub>-Anteil reduziert (3). In Anpassung an den Umgebungsdruck wird die Ausatemluft im Einatembeutel (4) mit O<sub>2</sub> angereichert (6-9,11-12) und dem Taucher über den Einatemschlauch wieder zur Verfügung gestellt (5) (Quelle: Präsentation Fa. Dräger, 2004).

Daraus resultieren zwei Vorteile: Zum einen entweicht kein Gas, was im militärischen Umfeld die Aufklärbarkeit des Tauchers durch Minderung der Geräuschemission und Vermeidung von Blasenbildung an der Wasseroberfläche erschwert. Zum anderen verringert die Limitierung auf das Ersetzen des verbrauchten Sauerstoffes die Menge des mitzuführenden Atemgasvorrates erheblich, was in einer längeren Einsatzdauer unter Wasser oder einer erhöhten Zuladung sonstiger Ausrüstung resultiert.



**Abb. 4:** Waffentaucher der Bundesmarine mit LAR V (Quelle: Fa. Dräger, 2004)

Die Bundesmarine verwendet zurzeit diverse Kreislaufgeräte. Standardmodell der Kampfschwimmer ist das 1975 eingeführte Dräger LAR V (Abb. 4), ein reines Sauerstoffkreislaufgerät, das weltweit bei Spezialeinheiten in großer Zahl eingesetzt wird. Im Hinblick auf die hohe akute Kreislauftoxizität sind hiermit allerdings lediglich Tauchgänge bis 7 m Wassertiefe möglich (Abb. 5), wo ein Umgebungsdruck von 1,7 bar herrscht. Bei reinem Sauerstoff als Atemgas ist in dieser Tiefe die Grenze zur ZNS-Toxizität erreicht (Dräger, 2001).

Neuere Geräte, wie z. B. das LAR VII-Kombi, LAR V-advanced oder Divex Stealth-EOD-M, verwenden statt 100% O<sub>2</sub> ein Stickstoff-Sauerstoff-Gemisch. Durch Anpassung der Gasfraktionen an die geplante oder tatsächliche Tauchtiefe kann sowohl im Vorfeld durch Auswahl entsprechender Mischgase, als auch während des Tauchganges durch eine Geräteautomatik ein pO<sub>2</sub> << 1,7 bar sicher eingehalten werden. Dadurch vergrößert sich die Einsatztiefe beträchtlich auf bis zu 54 m (Koch, 2007).

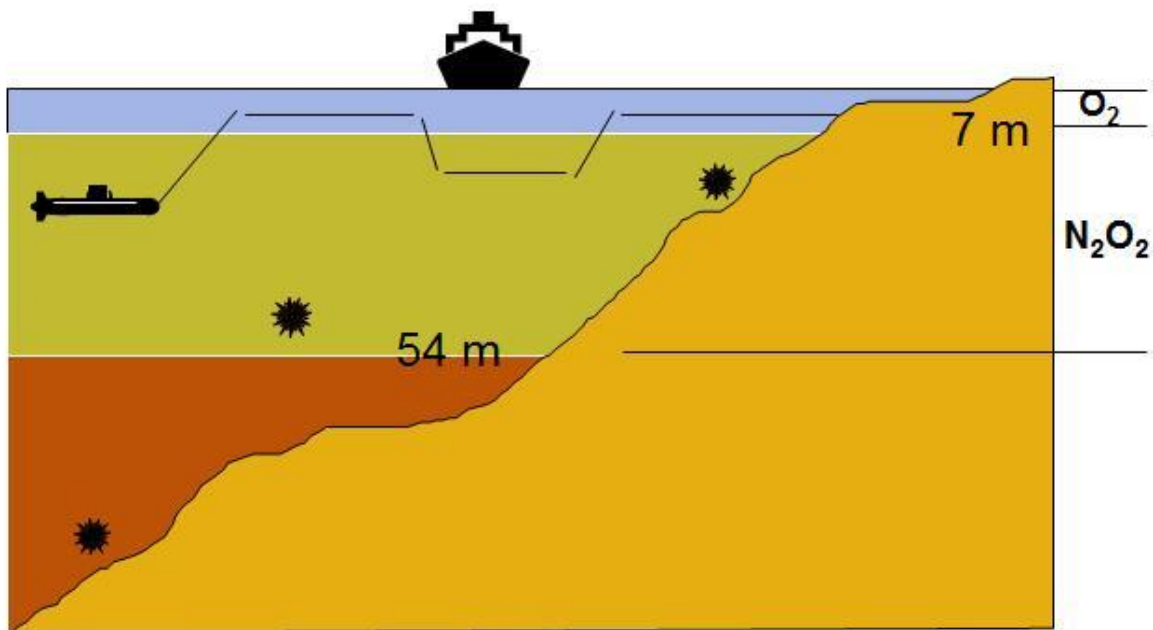


Abb. 5: Maximale Tauchtiefe mit reinem Sauerstoff und Sauerstoff-Stickstoff-Gemisch in Kreislauf-Tauchgeräten: Die maximale Tauchtiefe mit reinem Sauerstoff beschränkt sich auf 7 m, womit erhebliche Einschränkungen der Einsatzoptionen einhergehen. Sauerstoff-Stickstoff-Gemische hingegen erlauben einen Einsatz von Tauchern bis zu Tiefen von 54 m, was das Spektrum deutlich erweitert (nach: Präsentation Fa. Dräger, 2004).

Auch im Tauchsport gewinnt die Verwendung von Stickstoff-Sauerstoff-Gemischen unter dem Begriff „Nitrox“ (aus „Nitrogenium“ und „Oxygenium“) oder EAN bzw. EANx (Enriched Air Nitrox, gefolgt vom prozentualen Sauerstoffanteil) an Bedeutung. Streng genommen ist auch Raumluft ein Stickstoff-Sauerstoff-Gemisch, jedoch findet der

Begriff erst ab  $fiO_2=32\%$  Verwendung. Gewöhnlich liegen Nitrox-Gemische zwischen 32 und 40%  $O_2$ -Anteil (Waldbrenner, 2007 a).

Nitrox-Gemische ermöglichen durch Reduktion der Aufsättigung mit dem Inertgas Stickstoff eine längere Isokompressionsphase oder schaffen bei konservativ langer Isokompressionsphase einen Sicherheitspuffer zur Vermeidung von Dekompressionsunfällen, was ihre zunehmende Popularität erklärt (Waldbrenner, 2007 a).

Andererseits erreichen Taucher bei Verwendung von EANx 40, bereits bei einer Tauchtiefe von 32,5 m die statistisch ermittelte ZNS-Toxizitätsgrenze von 1,7 bar  $pO_2$ . Im Rahmen der Tauchausbildung wird eine maximale Tauchtiefe für den Freizeittauchbereich von 40 m vermittelt, wo ein  $pO_2 = 2,0$  bar herrschen würde (Ehm, 2007). Zur Verwendung von Nitrox sind daher spezielle Einweisungskurse vorgesehen, die Sporttaucher auf diese Problematik hinweisen (Kromp et al., 2002 b).

### 1.3 Apoptoseinduktion durch Sauerstoff

In jüngster Zeit finden sich vermehrt Hinweise, dass eine erhöhte Sauerstoffexposition eine Immunsuppression verursachen kann, die durch die Induktion von Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, bei Lymphozyten bedingt ist (Weber et al., 2006).

Im menschlichen Körper werden durch Apoptose täglich ca.  $60 \times 10^9$  Zellen eliminiert und durch neu gebildete ersetzt (Reed, 2002). Es handelt sich dabei um einen physiologischen Prozess, der zur Anpassung des Gewebes an wechselnde Belastungen und zur Regeneration (Reed, 2002), zum Abbau überflüssiger Zellen, z. B. im Rahmen der Embryonalentwicklung (Meier et al., 2000), und der Entfernung schädlicher Zellen, wie z. B. Tumorzellen genutzt wird. Das Versagen des Apoptosemechanismus oder die Fähigkeit von Tumorzellen, diesem durch Mutationen zu entgehen, führt zur Krebserkrankung (Evan und Vousden, 2001).

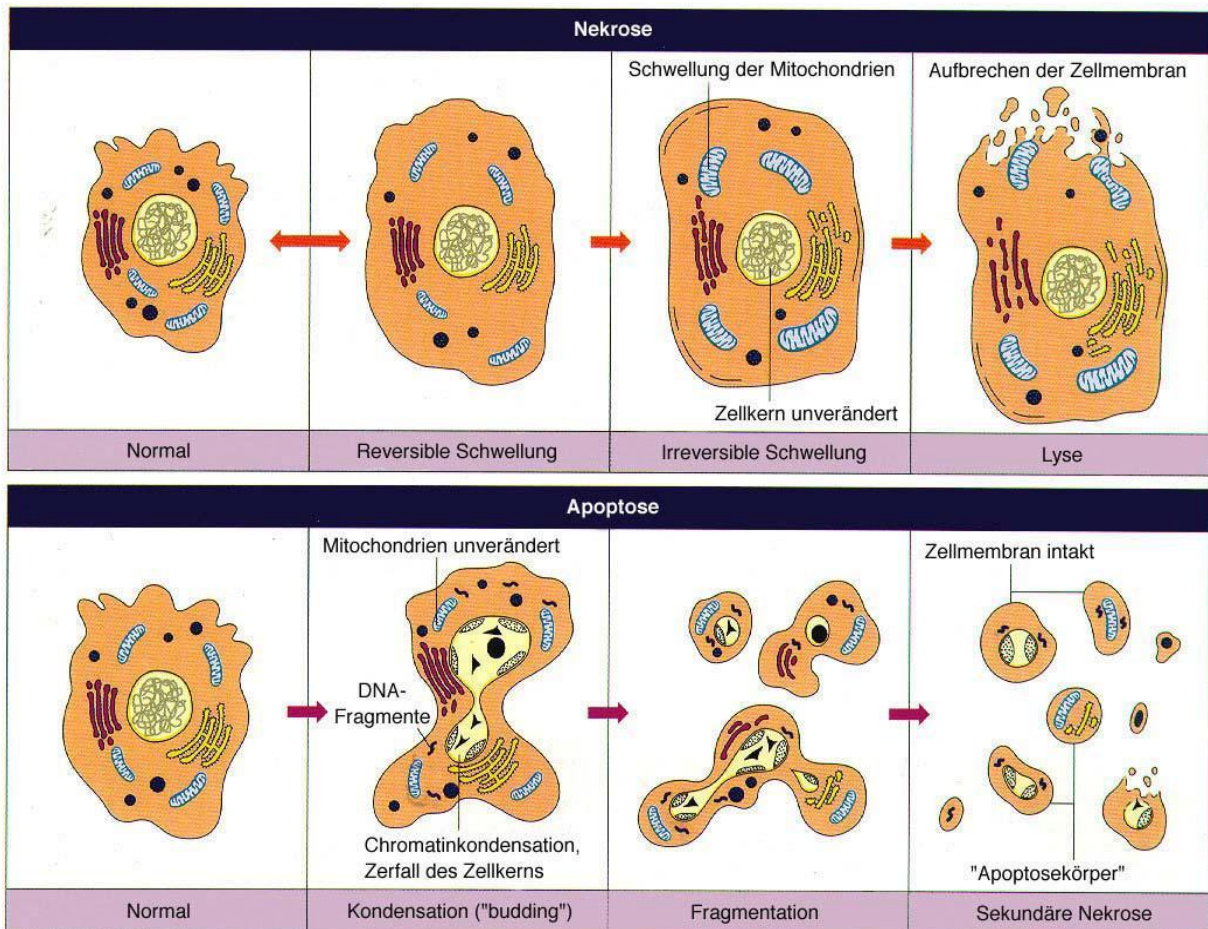
1972 beschrieben Kerr et al. erstmals diesen morphologisch deutlich von der Nekrose abgrenzbaren Zelltod, für den sie den Begriff „Apoptose“ einführten (s. Tab 1).

**Tab. 1: Abgrenzung von Nekrose und Apoptose;** + tritt auf, - tritt nicht auf, ↑ Zunahme, ↓ Abnahme; Nekrose zeichnet sich maßgeblich durch eine Zunahme des Zellvolumens mit anschließender Membranperforation und Entleerung des Zellinhaltes ins Interstitium mit konsekutiver Induktion einer lokalen Entzündungsreaktion aus. Apoptose mindert das Zellvolumen und führt die Zelle einem geordneten Abraum durch Phagozytose zu, wodurch eine Inflammation unterbleibt.

Parameter	Nekrose	Apoptose
Lokale Entzündungsreaktion	+	-
Phagozytose betroffener Zellen	-	+
Zellvolumen	↑	↓
Chromatinkondensation	-	+
Zeiose	-	+
Membranperforation	+	-

Typisch für die Apoptose ist dabei die Beobachtung, dass sie bei einzelnen Zellen im sonst gesunden Gewebe vorkommt, während bei Nekrose immer eine Vielzahl von benachbarten Zellen betroffen sind.

Nekrotische Zellen platzen und entleeren dabei den gesamten Zellinhalt (Abb. 6), der zahlreiche hochaktive Substanzen wie Zytokine, Sauerstoffradikale und Enzyme enthält. Diese lösen lokal eine inflammatorische Antwort aus (Leist und Jaattela, 2001).



**Abb. 6: Morphologische Unterschiede zwischen Nekrose und Apoptose.** Nekrose als Zelltod nach Schädigung durch eine Noxe führt zur Volumenzunahme und Membranperforation. Apoptose führt die Zelle geplant nach Chromatinkondensation und Fragmentation in Apoptosekörper der Phagozytose zu. Aus: Wyllie, A.H. (1998). "Cell death - apoptosis and necrosis". In: Apoptosis and Cell Proliferation, 2. Aufl., Boehringer Mannheim, Mannheim: S. 2-3.

Apoptotische Zellen dagegen werden geordnet abgebaut und lösen keine Entzündungsreaktion aus. Bei noch erhaltener Zellmembran werden proinflammatorische Substanzen intrazellulär abgebaut. Die Expression von Signalmolekülen, wie Phosphatidylserin, markiert die Zellen für den Abraum durch Makrophagen (Anderson et al., 2003).

Die Apoptose stellt also eine Möglichkeit für den Organismus dar, einzelne Zellen gezielt durch Phagozytose zu eliminieren, ohne das umliegende Gewebe durch Entzündung zu schädigen (Leist und Jaattela, 2001).

Im Gegensatz zur Nekrose bleiben Zellmembran und Zellorganellen bei der Apoptose bis zum eigentlichen Abraum durch Fresszellen intakt. Das Zellvolumen verringert sich initial. Der Zellstoffwechsel läuft über lange Zeit weitgehend unbeeinträchtigt weiter. Der Zellkern schrumpft durch Chromatinverdichtung (Pyknose). Weiterhin lassen sich mikroskopisch Ausstülpungen und abgeschnürte membranumschlossene Vesikel an der Zellmembran identifizieren, das sog. „membrane blebbing“. (Leist und Jaattela, 2001). Im Zellkern selber werden kalzium- und magnesiumabhängige DNAsen aktiviert, die die DNA in charakteristische Bruchstücke zerlegen (Wyllie, 1980)

## Kaspasen

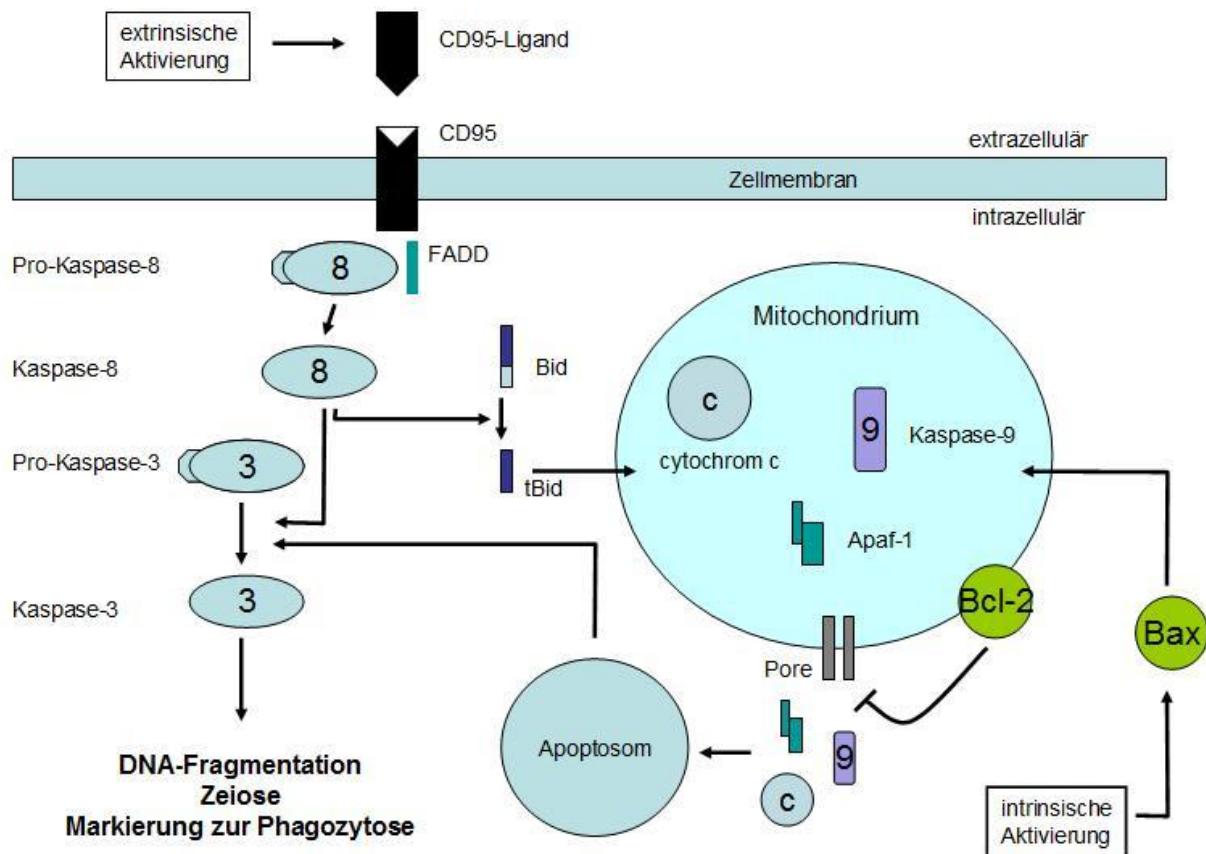
Das Todessignal zur Aktivierung der Apoptose wird durch Enzyme aus der Familie der Kaspasen aufgenommen (Initiatorphase) und in einer Kaspasen-gestützten Signaltransduktionskaskade weitergeleitet (Abb. 7). Über die Aktivierung von Effektor-kaspasen wird der Abbau von relevanten Proteinen im Rahmen der Apoptose initiiert (Effektor- und Degradationsphase) (Hengartner, 2000).

Bisher sind 14 verschiedene Kaspasen bekannt. Alle Enzyme der Kaspasenfamilie sind ähnlich aufgebaut und schneiden ihre Substrate nach der Aminosäure Aspartat. Die Substratspezifität wird durch die sterische Konformation um das aktive Zentrum, das immer Cystein enthält, bestimmt (Thornberry und Lazebnik, 1998).

## Initiatorphase

Bei der Initiatorphase unterscheidet man zwei Vorgänge: Den extrinsischen und den intrinsischen Weg. Die extrinsische Aktivierung (Typ I-Apoptose) erfolgt über Rezeptoren der Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptorfamilie, bei der intrinsischen

Aktivierung (Typ II-Apoptose) kommt es aufgrund noch nicht sicher geklärter Mechanismen zur Ausschüttung von proapoptotischen Substanzen aus dem Mitochondrium der Zelle. Auf beide Möglichkeiten wird im weiteren Verlauf des Textes eingegangen.



**Abb. 7: Vereinfachte Darstellung der Signaltransduktion der Apoptose.** Dabei werden inhibitorische Moleküle der Pro-Kaspase-8 abgetrennt. Kaspase 8 leitet das Signal im Zytosol und ins Mitochondrium weiter.

Die Initiierung der Kaspasenkaskade kann über verschiedene Moleküle erfolgen, z. B. p53, CD95, TNF- $\alpha$ , Glucokortikoide oder den Entzug von Wachstumsfaktoren. Entsprechende Rezeptoren für diese Liganden, sog. Todesrezeptoren, befinden sich auf den Zellmembranen, z. B. CD95(FAS) oder Tumornekrosefaktorrezeptor (Krammer, 2000). Sobald der Ligand von CD95, CD95L, an den zugehörigen Rezeptor bindet, rekrutiert dieser intrazellulär das Adaptermolekül FADD („Fas-associated death domain



protein“) und mehrere Moleküle Prokaspase-8 (Green und Ferguson, 2001). Durch Abspaltung des inaktiven Teiles wird Kaspase-8 aktiviert und schneidet ein Fragment aus Kaspase-3. Diese Aktivierung von Kaspase 3 leitet die Effektorphase ein (Hengartner, 2000).

### Effektorphase

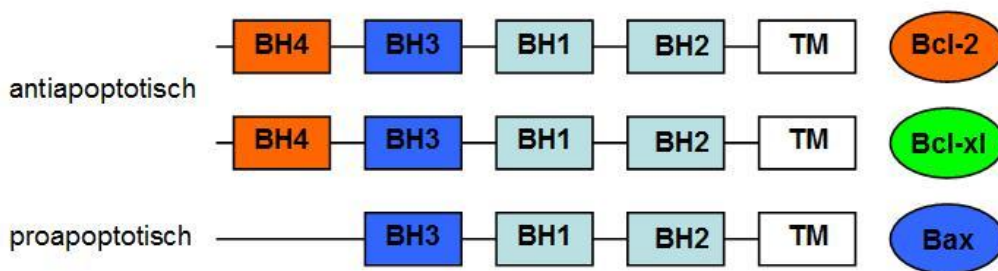
Die Effekte der aktivierten Kaspase-3 auf die apoptotische Zelle sind mannigfaltig: Die Zeiose (Membranveränderungen) erfolgt aufgrund des Abbaus des Zytoskeletts durch Kaspase-3 (Kothakota et al., 1997). Die DNA wird durch die Kaspase-aktivierte DNase (CAD) in apoptosetypische Fragmente zerlegt (Enari et al., 1998). Externalisierung von Phosphatidylserin als Phagozytosemarker für Makrophagen erfolgt durch das Enzym Scramblase, das ebenfalls kaspaseaktiviert ist (Frasch et al., 2000).

### Mitochondrium

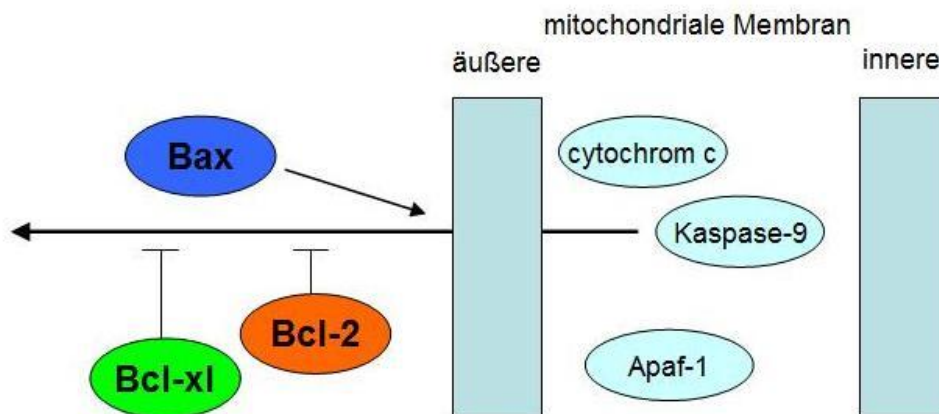
Das Mitochondrium verfügt über hochpotente Modulationsmöglichkeiten in der Apoptose und stellt somit einen wichtigen alternativen Zweig zur reinen Kapsenkaskade dar (Martinou und Green, 2001).

Kaspase-8 kann die Transduktionskaskade durch Spaltung des Proteins Bid im Zytosol über das entstehende trunkierte Bid (tBid) in das Mitochondrium umleiten. Innerhalb des Mitochondriums befinden sich z. B. Apaf-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1), Kaspase 9 und Zytocrom-c. Diese bilden nach Ausschüttung ins Zytosol das Apoptosom, einen Multienzymkomplex, der über eine Kaspase-3-Aktivierung direkt proapoptisch wirkt. Dadurch können Zellen, die die Typ I-Apoptose alleine nicht initiieren können, das Mitochondrium zur Signalverstärkung nutzen (Hengartner, 2000). Die Freisetzung der genannten Apoptosom-Komponenten erfolgt möglicherweise durch Öffnung des mitochondrialen „permeability transition pore complex“, eines porenbildenden Komplexes. Die Porenöffnung in der mitochondrialen Membran wird durch Proteine der Bcl-2-Familie kontrolliert (Zamzami und Kroemer, 2001).

Diese Enzymfamilie besteht aus mind. 25 Molekülen, die durch Homologiedomänen definiert werden (Abb. 8). Je nach Integration der BH4-Domäne wirken die Proteine der Bcl-2-Familie pro- oder antiapoptotisch (Abb. 8). In Molekülen der Gruppen I (wie z.B. Bcl-2) und II (z. B. Bcl-xl) ist die BH4-Domäne vorhanden, die Enzyme wirken antiapoptotisch durch Hemmung einer Membranöffnung (Abb. 9). Hingegen haben die Mitglieder der Gruppe III, wie z. B. Bax, einen proapoptotischen Effekt durch Antagonisierung von Bcl-2 und Induktion der mitochondrialen Membranöffnung (Wang et al., 1994).



**Abb. 8:** Schematische Darstellung der Domänenstruktur der Bcl-2 Familie: Bax als proapoptotischem Molekül fehlt die BH4-Domäne.



**Abb. 9:** Wirkung der Proteine der Bcl-2-Familie. Bax wirkt proapoptotisch durch Steigerung der Permeabilisierung der mitochondrialen Membran. Bcl-2 und Bcl-xl antagonisieren diesen Effekt und verhindern damit die Emission proapoptotischer Faktoren, wie z. B. Cytochrom c, APAF-1 und AIF, ins Cytosol.

Um einen ungewollten Zelltod zu verhindern, verfügt die Zelle über vielfältige Mechanismen zur Regulation des Apoptoseprozesses. Eine der zahlreich vorhandenen Rückkopplungsschleifen stellt z. B. die Hemmung des Apoptosoms durch inhibitorische Proteine, „inhibitor of apoptosis proteins“ (IAPs), dar. Diese Proteine können ihrerseits wieder durch das im Mitochondrium bereitgestellte Protein Smac/Diablo aufgehalten oder in ihrer Wirkung abgeschwächt werden (Salvesen und Duckett, 2002).

#### 1.4 Hypothese und Begründung der Diskussion

Ein hoher Sauerstoffpartialdruck kann den menschlichen Organismus auf unterschiedliche Weisen schädigen. Ein nicht abschließend erforschter Mechanismus scheint dabei die Einleitung von Apoptose in immunkompetenten Zellen zu sein.

Bisher wurde Apoptoseinduktion unter erhöhten Sauerstoffpartialdrücken nur an Tiermodellen oder in vitro beobachtet. Entsprechende Studien unter Einbeziehung menschlicher Probanden wurden bisher nicht veröffentlicht.

Wir stellen daher die Hypothese auf, dass erhöhter Sauerstoffpartialdruck beim Menschen eine temporäre Schädigung von Immunzellen durch Induktion von programmiertem Zelltod auslösen kann. Im Einzelnen sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Induziert hyperbare Sauerstoffexposition eine erhöhte Expression des proapoptotischen Enzyms Bax?
2. Bewirkt hyperbare Sauerstoffexposition eine verminderte Expression der antiapoptotischen Enzyme Bcl-2 und Bcl-xl?
3. Bewirkt hyperbare Sauerstoffexposition eine erhöhte Apoptoseinduktion durch vermehrte Aktivierung von Kaspase-3?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Material

Artikel	Bestell-Nr.	Firma
Cell Lysis Buffer	559759	Becton Dickinson GmbH Tullastr. 8-12 69126 Heidelberg
Protein Inhibitor Cocktail	554779	Becton Dickinson GmbH Tullastr. 8-12 69126 Heidelberg
PAXgene Blood RNA Kit (50)	762131	QIAGEN GmbH QIAGEN Strasse 1 40724 Hilden
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	762165	QIAGEN GmbH QIAGEN Strasse 1 40724 Hilden
First strand cDNA Synthes.Kit	11483188	Roche Deutschland GmbH Emil-Barell-Str. 1 79639 Grenzach-Wyhlen
Protein Inhibitor Cocktail	554779	Becton Dickinson GmbH Tullastr. 8-12 69126 Heidelberg

Annexin V FITC	556419	Becton Dickinson GmbH Tullastr. 8-12 69126 Heidelberg
BD Imag Buffer	552362	Becton Dickinson GmbH Tullastr. 8-12 69126 Heidelberg
BD Imag Buffer T Lymphocyte Enrichment	557874	Becton Dickinson GmbH Tullastr. 8-12 69126 Heidelberg
Mitoscreen	551302	Becton Dickinson GmbH Tullastr. 8-12 69126 Heidelberg
Human Apoptosis CBA Kit	557816	Becton Dickinson GmbH Tullastr. 8-12 69126 Heidelberg
LC-FastStart DNA Master Plus SyBR Green I	3515885	Roche Deutschland GmbH Emil-Barell-Str. 1 79639 Grenzach- Wyhlen
LC-h-HPRT Housekeeping Gene Set	3261891	Roche Deutschland GmbH Emil-Barell-Str. 1 79639 Grenzach- Wyhlen

Cell death Detection Elisa <sup>Plus</sup>	1774425	Roche Deutschland GmbH Emil-Barell-Str. 1 79639 Grenzach- Wyhlen
Ficoll-Paque <sup>TM</sup> Plus (100ml)	17-1440- 02	Amersham plc Amersham Place Little Chalfont Buckinghamshire HP7 9NA United Kingdom
PBS (Phosphate Buffered Saline,dry powder)	P 3744	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Industriestrasse 25, Postfach CH-9471 Buchs SG Schweiz
Leucosep für 3-6 ml (50 Stück/Pack)	7163290	Greiner Bio-One AG Bad Haller Straße 32 A-4550 Kremsmünster Österreich
Heparin S-Monovetten (7,5ml) 50St./Pack	01. 1613. 100	SARSTEDT AG & Co. Rommelsdorfer Straße 51582 Nümbrecht
EDTA S-Monovetten (9ml K3E)	02. 1066. 001	SARSTEDT AG & Co. Rommelsdorfer Straße 51582 Nümbrecht
EDTA S-Monovetten (2,7ml K3E)	05. 1167	SARSTEDT AG & Co. Rommelsdorfer Straße 51582 Nümbrecht

Serologische Pipetten (5ml) 50St./Pack		Greiner Bio-One AG Bad Haller Straße 32 A-4550 Kremsmünster Österreich
Serologische Pipetten (10ml) 50St./Pack		Greiner Bio-One AG Bad Haller Straße 32 A-4550 Kremsmünster Österreich
Desinfektionsmittel - Cutasept F (250ml)		BODE Chemie GmbH & Co. KG Melanchthonstraße 27 22525 Hamburg
Sarstedt Aufbewahrungsboxen	64997	SARSTEDT AG & Co. Rommelsdorfer Straße 51582 Nümbrecht
Falcon-Tubes (15ml) 50St./Pack		Greiner Bio-One AG Bad Haller Straße 32 A-4550 Kremsmünster Österreich
Falcon-Tubes (50ml) 20St./Pack	LAME 110503	Greiner Bio-One AG Bad Haller Straße 32 A-4550 Kremsmünster Österreich
Ethanol 96% (1 Liter)	1. 00971. 1000	Merck KGaA Frankfurter Str. 250 64293 Darmstadt
Einmalspritzen (5ml) 100St./Pack	10012037	Becton Dickinson GmbH Tullastr. 8-12 69126 Heidelberg

Handschuhe Latex, puderfrei M	LAME 999112	Axygen Scientific, Inc. 33210 Central Avenue Union City, CA 94587 USA
Handschuhe Latex, puderfrei L	LAME 999113	Axygen Scientific, Inc. 33210 Central Avenue Union City, CA 94587 USA
Pipettenspitzen 1000µl Tips steril (96er Pack) MAXYMum Recovery	LAME 110048	Axygen Scientific, Inc. 33210 Central Avenue Union City, CA 94587 USA
Pipettenspitzen 100µl Tips steril (96er Pack) MAXYMum Recovery	LAME 110045	Axygen Scientific, Inc. 33210 Central Avenue Union City, CA 94587 USA
Reaktionsgefäße 1,5ml (500St./Beutel)	LAME 115093	Axygen Scientific, Inc. 33210 Central Avenue Union City, CA 94587 USA
Trockeneis		Praxair Hans-Böckler-Straße 1 40476 Düsseldorf
Infusionszubehör Venofix		B. Braun Melsungen AG Carl-Braun-Straße 1 34212 Melsungen

Die aufgeführten Kits wurden nach Angaben des Herstellers verwandt. Die Produktion des Human Apoptosis CBA Kit, Nr. 557816, Fa. Becton Dickinson, wurde im Verlauf der Studie eingestellt. Der Artikel ist nicht mehr zu beziehen.



## 2.1.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Starmed 2200/5,5	HAUX Life Support GmbH Descostr. 19 76307 Karlsbad-Ittersbach
Hydra 2000	HAUX Life Support GmbH Descostr. 19 76307 Karlsbad-Ittersbach
Labofuge 400R	Heraeus Holding GmbH Heraeusstraße 12-14 63450 Hanau
Biofuge fresco	Heraeus Holding GmbH Heraeusstraße 12-14 63450 Hanau
Pipetten	Eppendorf AG Barkhausenweg 1 22339 Hamburg
FACSCalibur (Durchflußzytometer)	Becton Dickinson GmbH Tullastr. 8-12 69126 Heidelberg
Pipettierhilfen	Eppendorf AG Barkhausenweg 1 22339 Hamburg
MS2 Mini Shaker	IKA <sup>®</sup> Werke GmbH & Co. KG Janke & Kunkel-Str. 10 79219 Staufen

Die Druckkammerfahrten der Belastungsgruppe wurden in einer Tauchsimulationskammer der Firma HAUX, Typ Hydra 2000, am Schiffahrtsmedizinischen Institut der Marine (SchiffMedInstM) in Kronshagen durchgeführt.

Die Anlage erfüllt die Bedingungen zur Patientenbehandlung gemäß TÜV, MedGV und MPBetreibVO und ist zusätzlich durch bundeswehrinterne Prüfbehörden auditiert.

Die Kontrollgruppe durchlief ihre Druckkammerfahrten in einer HBO-Behandlungskammer der Firma HAUX, Typ Decomat plus, am HBO-Zentrum Euregio in Aachen. Die Druckkammer ist vom Germanischen Lloyd zertifiziert und nach den Richtlinien des Verbandes deutscher Druckkammerbetreiber (VDD) für die Patientenbehandlung zugelassen. Die Anlage erfüllt ebenfalls die Bedingungen gemäß TÜV, MedGV und MPBetreibVO.

### 2.1.3 Software

Word 2003	Microsoft
Excel 2003	Microsoft
Powerpoint 2003	Microsoft
Windows Vista	Microsoft
Prism 5.00 Windows	GraphPad

## 2.2 Überblick

Die Untersuchung ist eine prospektive Studie, die experimentell die Auswirkungen von Expositionen unterschiedlicher Sauerstoffpartialdrücke auf die Apoptose bei mononukleären Zellen des menschlichen Immunsystems zwischen einer Belastungs- und einer Kontrollgruppe vergleichen soll.

Beide Gruppen sollen in einer Druckkammer ein identisches Tauchgangsprofil über 30 min bei 1,8 bar Überdruck durchlaufen. Dies entspricht einem Umgebungsdruck von  $p_{\text{Umgebung}}=2,8$  bar oder einer theoretischen Tauchtiefe von 18 m. In der Belastungsgruppe soll dabei reiner Sauerstoff ( $f_i\text{O}_2=1,0$ ) als Atemgas verwendet werden, so dass ein  $p\text{O}_2=2,8$  bar anläge. Die Kontrollgruppe soll Raumluft ( $f_i\text{O}_2=0,21$ ) mit einem resultierenden  $p\text{O}_2=0,59$  bar atmen.

Vor Versuchsbeginn erfolgt die taucherärztliche Untersuchung nach den Richtlinien der Bundeswehr (Belastungsgruppe) bzw. der Deutschen Gesellschaft für Tauch- und Überdruckmedizin e. V. (Kontrollgruppe).

Alle Probanden sollten nach Teilnahme an der Druckkammerfahrt bis zur zweiten Blutentnahme keine erneute hyperbare Sauerstoffexposition erfahren. Desweiteren sollten keine Einnahme von Alkoholika oder körperliche Anstrengungen erfolgen.

Im Vorfeld des Versuches wurden die Probanden ausführlich über die Studie und bestehende gesundheitliche Risiken aufgeklärt und haben nach entsprechender Bedenkzeit schriftlich eingewilligt. Die Durchführung der Studie wurde vom Ethikrat der Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn genehmigt.

## 2.3 Kollektive

### 2.3.1 Belastungsgruppe

Die Belastungsgruppe rekrutiert sich aus Soldaten der Bundeswehr, die im Rahmen einer freiwilligen Bewerbung für die Ausbildung als Kampfschwimmer oder Minentaucher einen Sauerstoff-Toleranztest mit dem oben angeführten Tauchgangsprofil absolvieren müssen. Eine Tauchtauglichkeitsuntersuchung wird dabei jeweils im Vorfeld der Druckkammerfahrt durch das SchiffMedInstM in Kronshagen durchgeführt. Die Druckkammerfahrt findet in der Druckkammer des SchiffMedInstM (Abb. 10) statt.

Die Rekrutierung erfolgt im Vorfeld des unabhängig von der Studie geplanten Sauerstoff-Toleranztests. Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig.



**Abb. 10:** Druckkammer Haux Hydra 2000 des Schiffahrtsmedizinischen Institutes der Marine

### 2.3.2 Kontrollgruppe

Die Einschlusskriterien für Probanden der Kontrollgruppe orientieren sich an den durch die Marinetaucher vorgegebenen Rahmenbedingungen. Eingeschlossen werden gesunde männliche Sporttaucher im Alter von 18 bis 50 Jahren mit gültigem Attest über eine Tauchtauglichkeit gemäß den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Tauch- und Überdruckmedizin e.V. Die Rekrutierung der Probanden erfolgt durch Aushänge und mündliche Informationsweitergabe innerhalb von Tauchsportvereinen und Rettungstaucherguppen.

Sporttaucher sind nach den Richtlinien des Verbandes Deutscher Sporttaucher e. V. (VDST) regelmäßig in ärztlicher Kontrolle. Eine ärztliche Untersuchung auf Tauchtauglichkeit sollte bis zu einem Lebensalter von 40 Jahren zumindest alle drei Jahre erfolgen, darüber jährlich. Sie beinhaltet bei Erstuntersuchung eine Röntgenübersichtsaufnahme des Thorax in zwei Ebenen sowie eine spirometrische und ergometrische Diagnostik. Weiterführende Untersuchungen werden im Einzelfall vom untersuchenden Arzt veranlasst.

Aufgrund der Erfahrungen im Sporttauchen sind die Probanden mit den Rahmenbedingungen einer Überdruckexposition vertraut und erfüllen die gesundheitlichen Voraussetzungen.

Die Druckkammerfahrten der Kontrollgruppe erfolgten in der Druckkammer des HBO-Zentrums Euregio, Aachen (Abb. 11, 12).



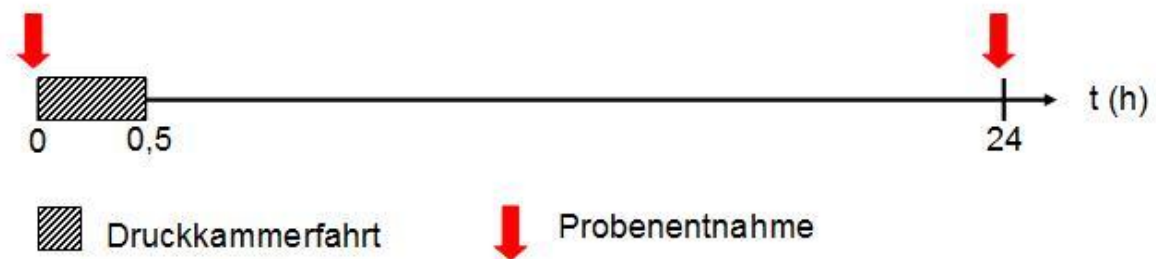
**Abb. 11, 12:** Druckkammer Haux Starmed 2200/5,5 des HBO-Zentrums Euregio, Aachen.

### 2.3.3 Ausschlußkriterien

Von der Teilnahme an der Studie werden Probanden ausgeschlossen, die an akuten oder chronischen Erkrankung leiden, insbesondere Infektionen der oberen Atemwege oder der Ohren. Weiterhin führt die regelmäßige Einnahme von Medikamenten oder Alkoholgenuß innerhalb von 24 h vor der Exposition (v. a. wegen der erhöhten Gefahr der Entwicklung eines hyperoxischen Krampfanfalls) zum Ausschluß.

### 2.4 Probengewinnung und Material

Bei jedem Probanden wurden unmittelbar vor der Druckkammerfahrt (Zeitpunkt  $t_0$ ) und 24 h nach Expositionsbeginn ( $t_1$ ) Blutproben entnommen (Abb. 13). Die Verarbeitung der Proben erfolgte vor Ort unmittelbar nach Blutentnahme (s. u.). Bei anfallenden Wartezeiten wurden die Proben auf Eis zwischengelagert.



**Abb. 13: Zeitachse der Probenentnahme;** Bei  $t_0=0$  h erfolgte die Probenentnahme unmittelbar vor Druckkammerfahrt, bei  $t_1=24$  h die Entnahme nach Exposition

#### 2.4.1 mRNA

Zum Zeitpunkt  $t_0$  und  $t_1$  wurde jeweils eine Vollblutprobe zur Bestimmung der mRNA-Expression von Bcl-2, Bcl-xl und Bax entnommen. Zur Stabilisierung erfolgte unmittelbar nach Entnahme der Transfer von jeweils 5 ml Vollblut in „Blood RNA Tubes“ der Firma PAXGene. Ein darin enthaltenes Reagenz schützt RNA-Moleküle vor dem Abbau durch RNAsen und reduziert die Induktion der Genexpression. Die Lagerung der Proben bis zur Messung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.4.2 Mononukleäre Zellen

An beiden Zeitpunkten wurde jeweils heparinisiertes Vollblut entnommen, um daraus periphere mononukleäre Zellen (MNZ) zu gewinnen.

Die Separation erfolgte mittels Leucosep®-System nach Anleitung. Es nutzt ein Röhrchen mit Trennscheibe sowie Ficoll-Isopaque® als Trennlösung. Durch Zentrifugation sammeln sich Erythrozyten und Granulozyten unterhalb der Filterscheibe im Ficoll-Isopaque®-Röhrchen, während die MNZ oberhalb davon einen deutlich sichtbaren Ring bilden. Dieser kann dann gezielt abpipettiert werden.

Hierzu wurden 3 ml Ficoll-Isopaque in Ficoll-Röhrchen gegeben und 30 Sekunden bei 1000 g abzentrifugiert. Anschließend wurden 3 ml Vollblut zugegeben. Durch eine Zentrifugation bei 1000 g für 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Absetzen der mononukleären Zellen zwischen Plasma und Ficoll in einer typischen Schichtung im Ficoll-Röhrchen erreicht. Nachfolgend konnte der Plasmaüberstand abpipettiert und verworfen werden und die MNZ vorsichtig abpipettiert und in ein weiteres Gefäß übertragen werden. Nach Resuspendierung mit 10 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung wurde für 10 Minuten bei 250 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum bis auf 1 ml abpipettiert und verworfen. Nach vorsichtigem Aufschütteln des verbleibenden Restes wurde diese Resuspendierung mit Verwerfen des abzentrifugierten Überstandes zweimal wiederholt.

### 2.4.3 Blutbild

Zur Kontrolle der Leukozytenzahlen wurden zum Zeitpunkt  $t_0$  und  $t_1$  EDTA-Proben entnommen, um größere Einflüsse der hyperbaren Umgebung auf die absoluten Leukozytenpopulationen festhalten zu können. Die Bestimmung erfolgte im Routinelabor der Universität Bonn bzw. des SchiffMedInstM am Tag der Probenentnahme.

## 2.5 Quantifizierung mRNA

### 2.5.1 mRNA-Isolierung

Die in den im Kit enthaltenen „PAXGene Blood RNA Tubes“ stabilisierten Proben wurden nach Auftauen gemäß der Anleitung mehrmals gewaschen und anschließend zur Gewinnung der Proteine zentrifugiert. Nach einem Waschschrift erfolgte die Inkubation mit einer Proteinase zur Verdauung von Proteinen und anschließend eine Zentrifugation durch eine Homogenisier-Spinsäule, wodurch das Zellysat homogenisiert und restliche Zelltrümmer entfernt wurden.

Eine RNA-Spinsäule band im nächsten Schritt selektiv an einer Silicagel-Membran die in der Lösung enthaltene RNA. Kontaminationsreste wurden durch mehrere Waschschriftte entfernt. Eine Inkubation mit DNase entfernte evtl. vorhandene Reste von DNA.

In einem ersten Schritt erfolgte die RNA-Isolierung entsprechend der Anleitung des „PAX-Gene Blood RNA Kit“ der Firma PAXGene. Hierzu wurden die PAXGene-Röhrchen zunächst bei 4500 rpm in einer Mikrozentrifuge für zehn Minuten zentrifugiert, der Überstand dekantiert, das verbleibende Pellet vorsichtig aufgeschüttelt und mit fünf ml RNase-freiem Wasser resuspendiert. Nach Verschluss mit einem neuen Deckel wurden Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes wiederholt. Nach Zugabe von 360  $\mu$ l BR1-Puffer wurde das Pellet darin resuspendiert. Anschließend wurde die Lösung in einen neuen Behälter umgefüllt und 300  $\mu$ l BR2-Puffer sowie 40  $\mu$ l Proteinase



K hinzugefügt. Nach Durchmischung erfolgte die Inkubation für zehn Minuten bei 55 ° C und 1400 rpm. Anschließend wurde für drei Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand zusammen mit 350 µl Ethanol 96% in ein neues Gefäß gefüllt und nachfolgend hiervon 700 µl in eine Filtersäule gefüllt. Nach kurzer Zentrifugation bei 12000 rpm für eine Minute wurden 700 µl BR-3 Puffer auf die Säule pipettiert und wiederum bei 12000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch einmal mit 500 µl BR 4-Puffer bei 12000 rpm für eine Minute und einmal mit 500 µl BR 4-Puffer bei 13000 rpm für eine Minute wiederholt. Anschließend wurde die Filtersäule in das Eluationsgefäß des Kits gestellt und zweimal hintereinander zuerst je 40 µl BR 5-Puffer direkt auf die Filtermembran pipettiert und dann das Gefäß bei 12000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Das gewonnene Eluat wurde jetzt fünf Minuten bei 65° C inkubiert, kurz abzentrifugiert und jeweils 8,2 µl in „cDNA-Tubes“ abgefüllt.

### 2.5.2 Transkription cDNA

Anschließend wurde die resuspendierte, gereinigte RNA mittels Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion („real time-Polymerase Chain Reaction“, rtPCR) relativ quantifiziert. Dazu wurde RNA mittels des „1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)“ der Fa. Roche nach Anleitung unter Verwendung von „Random Primer p(dN)6“ revers in cDNA transkribiert. Als Hauswächter-Gen („Housekeeping Gene“) wurde HPRT verwendet.

Hierzu wurde das in den vorhergehenden Schritten gewonnene Eluat pro „cDNA-Tube“ mit 11,8 µl einer Mischung aus 2 µl 10x Reaktions-Puffer, 4 µl 25 mM Mg<sup>2</sup>Cl, 2 µl Desoxynukleotid-Mischung, 2 µl „Random Primer p(dN)6“, 1 µl RNase-Inhibitor und 0,8 µl AMV Reverse Transkriptase des o. g. Kits auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Alle Pipettierschritte erfolgten auf Eis. Nach einer vorsichtigen Durchmischung erfolgte die Inkubation bei Raumtemperatur für zehn Minuten, um dem Primer die Bindung an die vorliegende RNA zu ermöglichen. Bei der anschließenden Inkubation bei 42 °C für 60 Minuten wurde die vorliegende RNA in cDNA umgeschrieben. Dann wurde die Transkriptase durch eine kurze Erhitzung auf 99 °C für fünf Minuten inaktiviert. Nach einer Abkühlung auf Eis für fünf Minuten wurden 80 µl destillierten Wassers pro „cDNA-Tube“ zugegeben.

### 2.5.3 Quantifizierung

Die so gewonnene cDNA wurde mittels des „BCA Protein Assay Kit“ zur Quantifizierung der mRNA-Expression von Bcl-2, Bcl-xl und Bax genutzt. Dazu wurden gemäß der in der Anleitung beschriebenen Mikroplatten-Prozedur die Proben mit einem  $\text{Cu}^{2+}$  und Bicinchoninsäure (BCA)-haltigen Reagenz gemischt, auf eine Probenplatte übertragen und inkubiert. Eine Reduktionsreaktion der BCA mit Kupfer und den vorhandenen Proteinen führt zu einer Chelatkomplexbildung. Dieser Chelatkomplex hat eine hohe Lichtabsorptionsfähigkeit bei 562 nm Wellenlänge, deren Ausmaß linear zur Proteinkonzentration steigt. Dadurch ist die quantitative Bestimmung der mRNA-Expression mittels eines entsprechenden Plattenlesers möglich.

Die Mikroplattenprozedur wurde mit einem Proben/BCA-Reagenzien-Verhältnis von 1:4 durchgeführt. Hierzu wurden in das Probenfeld der jeweiligen Mikroplatte 25  $\mu\text{l}$  gelöster cDNA-Proben pipettiert und mit 100  $\mu\text{l}$  des BCA-Reagenz aufgefüllt und die Mikroplatte anschließend vorsichtig für 30 Sekunden durchmischt. Nach Inkubation bei 37° C für 30 Minuten und anschließender Abkühlung auf Raumtemperatur konnte mittels Absorptionsmessung bei 562 nm Wellenlänge im Vergleich zum Standard die Proteinkonzentration quantitativ bestimmt werden.

## 2.6 Quantifizierung Durchflußzytometrie

### 2.6.1 Proteinextraktion

Die im Anschluß an die Probenentnahme gewonnenen MNZ wurden unmittelbar danach mit dem „Human Apoptosis Kit“ der Firma Becton-Dickinson, Heidelberg, zur Gewinnung der intrazellulären Proteine nach Anleitung lysiert und konserviert.

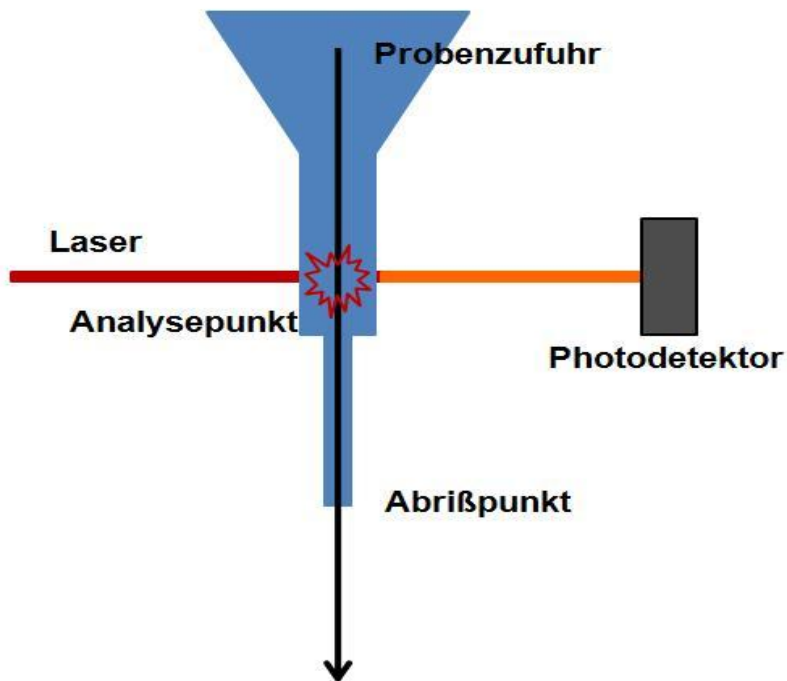
Dazu wurde den MNZ zunächst 1,5 ml eines Proteininhibitors zugegeben, der in verbrauchsfertiger Verdünnung 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Benzamidin-HCL, sowie jeweils 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$

Phenantrolin, Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin A und 1 mM PMSF enthält. Dadurch wurden während einer 30 minütigen Inkubation auf Eis die vorher separierten MNZ lysiert und Proteasen inhibiert. Während der Inkubation erfolgte in zehnminütigen Abständen die kurze Durchmischung mittels eines Vortex-Gerätes. Anschließend wurden 1,5 ml Lösung mit den darin enthaltenen hochmolekularen Zellfragmenten abpipettiert und in Eppendorf-Hütchen bei 12500 rpm in einer Mikrozentrifuge für 10 Minuten abzentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstandes wurden die Eppendorf-Hütchen für den Transport auf Trockeneis und anschließend bei -80° C gelagert. Sie dienen später zur Messung der Apoptoseenzyme Bcl-2 und aktivierter Kaspase-3.

### 2.6.2 Durchflußzytometrie

Die aus den separierten mononukleären Zellen gewonnenen Proben wurden zur Messung der Expression des mitochondrialen Proteins Bcl-2 und der Aktivierung des Apoptose-Schlüsselenzyms Kaspase-3 genutzt. Die Analyse erfolgte nach Herstellerangaben mit dem „Cytometric Bead Array“ (CBA) der Firma Becton-Dickinson, Heidelberg mittels Durchflußzytometrie.

Die Durchflußzytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS) ist ein Verfahren, mit dem automatisiert Aussagen über Zellgrößen und ihre Komplexität (z. B. intrazelluläre Vesikel) getroffen werden können. Hierzu werden in Lösung befindliche Zellen nacheinander durch eine Kapillare gesaugt und passieren einzeln einen Laserstrahl (Abb. 14).



**Abb. 14: Durchflußzytometrie;** Probenzufuhr durch eine Kapillare und Passage eines Laserstrahls am Analysepunkt. Erfassung von Streulicht und Fluoreszenzemissionen durch Photodetektoren.

Durch das Auftreffen auf die Zelle wird das Licht gestreut und die Streuung durch multiple Photodetektoren registriert. Es handelt sich hierbei um einen physikalischen Prozess, die Wellenlänge des Lichtes wird nicht verändert. Das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt maßgeblich vom Volumen der Zelle ab. Die Brechung des Lichtes im annähernd rechten Winkel, die vor allem von der Zellstruktur im Inneren abhängt, wird als Seitwärtsstreulicht (Sideward scatter, SSC) bezeichnet und ist ein Maß für die Granularität und Zellkernstruktur der Zelle. Mit diesen Parametern ist z. B. eine Differenzierung von Blutzellen gut möglich.

Die Fluoreszenz-Durchflußzytometrie ist eine Erweiterung dieses Verfahrens, das mit hoher Analysegeschwindigkeit und Empfindlichkeit die Fluoreszenzmarkierungen von Zellen oder, wie im Falle der hier verwendeten Latexkügelchen („Beads“), Partikeln erkennen und damit quantifizieren kann. Grundlage der Messung ist die Antigen-

Antikörper-Reaktion, die mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper durchgeführt wird. Im Sinne eines Sandwich-Essays bilden die Latexkügelchen dabei die Trägerplatte, indem sie mit spezifischen Antikörpern versehen werden, die die zu messenden Proteine binden. In einem weiteren Schritt erfolgt dann eine Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern, die gegen ein anderes Epitop des zu messenden, an die Beads gebundenen Proteins gerichtet sind. Jedem Zielprotein wird dabei eine spezifische Fluoreszenzfarbe zugeordnet.

Die so markierten Beads können im FACS-Gerät quantitativ gemessen werden. Hierzu werden die Kügelchen in einer Suspension durch hydrodynamische Fokussierung an einem Laserstrahl mit auf das Absorptionsspektrum der Fluoreszenzantikörper abgestimmter Wellenlänge vorbeigeleitet. Trifft der Laserstrahl auf einen zugeordneten Fluoreszenzfarbstoff, wird dieser kurzzeitig auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen auf ihr Ursprungsniveau zurück, wobei Energie in Form von Photonen abgegeben wird. Da beim Absorptionsübergang immer mehr Energie aufgenommen wird, als beim Fluoreszenzübergang emittiert wird, ist das abgestrahlte Licht langwelliger als das Anregungslicht. Dieses spezifische Emissionsspektrum wird von einem entsprechend ausgerichteten Photodetektor registriert. Die emittierte Photonenmenge verhält sich dabei proportional zur Menge der mit Fluoreszenzantikörpern markierten Proteine. Eine gleichzeitige Messung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe ist möglich, weil sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen, aber über jeweils spezifische Emissionsspektren verfügen. Dadurch kann die Quantifizierung von bcl-2 und aktivierter Kaspase-3 parallel in der Durchflußzytometrie aus der gleichen Lösung erfolgen.

### 2.6.3 Cluster Bead Array

Nach Auftauen der bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Proben lagen die Zielproteine bereits in Lösung vor. Es folgte die Inkubation mit zytometrischen Latexkügelchen (Beads). Die Beads waren nach Anleitung mit Antikörpern gegen die zu untersuchenden Proteine Bcl-2 und aktivierte Kaspase-3 versehen worden. Anschließend wurden je 50  $\mu\text{l}$  der Lösung mit vorbereiteten Beads mit 50  $\mu\text{l}$  der Probenlösung gemischt und eine Stunde bei

Raumtemperatur inkubiert, um die Bcl-2 und aktivierte Kaspase-3 an die Antikörper binden zu lassen. Dann erfolgte ein Waschschrift mit 0,5 ml Waschpuffer und Zentrifugation bei 200 g für fünf Minuten. Der Überstand wurde verworfen und 50 µl des „Human Apoptosis PE Detection Reagent“ zugegeben. Es handelt sich dabei um monoklonale Antikörper, die gegen ein anderes Epitop des gleichen Proteins gerichtet und mit jeweils unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen versehen sind. Nach Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtabschluß wurden wiederum 0,5 ml Waschpuffer zugegeben und die Lösung bei 200 g für fünf Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 300 µl Waschpuffer resuspendiert und die fertigen Proben in der Fluoreszenz-Durchflußzytometrie nach kurzem Aufschütteln gemessen.

Als Kalibrator wurden im „Human Apoptosis Kit“ bereitgestellte Standardlösungen beider Proteine verwandt.

## 2.7 Statistik

Aus dem Blut der Probanden wurden in dieser Studie die folgenden Variablen getestet:

- |                    |                        |
|--------------------|------------------------|
| mRNA-Expression:   | - Bcl-2                |
|                    | - Bax                  |
|                    | - Bcl –xl              |
| Proteinexpression: | - Bcl-2                |
|                    | - aktivierte Kaspase-3 |

Als globales Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  festgelegt. Nach Bonferroni wurde bei insgesamt fünf Testungen aus derselben Probandengruppe für multiples Testen korrigiert und entsprechend das Signifikanzniveau der einzelnen Tests bei  $p < 0,01$  bestimmt. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler wurden angegeben.

Bei den ermittelten Werten der einzelnen mRNA-Expressionen wurde der Quotient der Messergebnisse  $t_0$  und  $t_1$  als Maß für die relative Veränderung in beiden Gruppen gebildet. Dadurch sind unterschiedliche Mittelwerte der beiden Gruppen zu den Zeitpunkten der Probenentnahmen besser zu vergleichen, da lediglich der Faktor der Veränderung innerhalb der Gruppen verglichen wird. Als Einheit wurde [AU], „arbitrary unit“, gewählt. Ein Quotient von 1, also keine stattgehabte Veränderung, wurde dabei im Sinne einer „normalized ratio“ als [AU] festgelegt. Die Ergebnisse der Belastungs- und der Kontrollgruppe wurden anschließend mittels eines ungepaarten t-Tests mit Welch-Korrektur aufgrund unterschiedlicher Varianzen getestet.

Die Meßergebnisse der Expression von Bcl-2 und der Aktivierung der Kaspase-3 zum Zeitpunkt  $t_0$  wurden von denen zum Zeitpunkt  $t_1$ , ebenfalls im Sinne des Vergleiches der relativen Veränderung innerhalb der beiden Gruppen, subtrahiert und die Ergebnisse der Belastungs- und der Kontrollgruppe anschließend mittels eines ungepaarten t-Tests mit Welch-Korrektur aufgrund unterschiedlicher Varianzen getestet.

## 2.8 Ethik

Die Zulassung der Studie wurde beim Ethikrat der Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn fristgerecht beantragt und die Durchführung genehmigt (Aktenzeichen: 50/05). Die Untersuchungen wurden auf Grundlage der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (1983) durchgeführt.

## 2.9 Förderung

Das Forschungsprojekt wurde gefördert vom Bundesministerium der Verteidigung, vertreten durch das Sanitätsamt der Bundeswehr, Dezernat I 2.3, Dachauer Str. 128, 80637 München. Es erfolgte Verwaltungshilfe durch die Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung e.V. Postfach 20 07 33, 80007 München.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Probandenkollektiv

Insgesamt wurden gemäß den unter 2.1.2 genannten Kriterien  $n_{\text{gesamt}}=61$  Probanden in die Studie eingeschlossen, davon  $n_{\text{Belastung}}=29$  in der Belastungsgruppe und  $n_{\text{Kontrolle}}=32$  in der Kontrollgruppe. Dabei ergab sich die in Tabelle 2 dargestellte demographische Verteilung. Die Kollektive unterscheiden sich im Altersmedian signifikant.

**Tab. 2: Demographische Verteilung der Probandengruppen.** Im Altersmedian unterschieden sich Belastungsgruppe und Kontrollgruppe signifikant.

	Belastungsgruppe	Kontrollgruppe
n	29	32



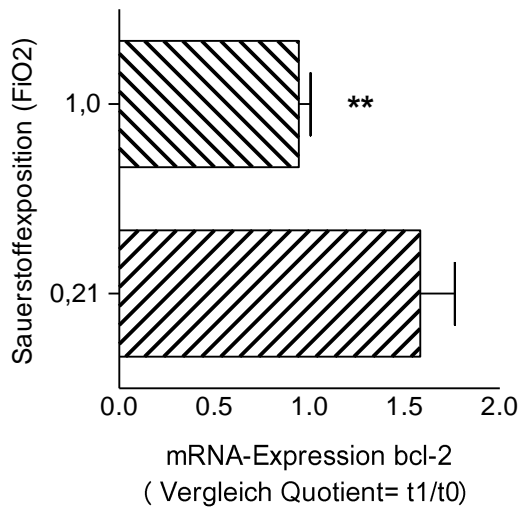
Altersmedian (18-50)	23	27
25-75% Perzentile	21-25	24-34

## 3.2 mRNA

### 3.2.1 mRNA Bcl-2

Aus entnommenen Vollblutproben wurden mittels rtPCR hinsichtlich der Expression von Bcl-2-mRNA als Quantifizierungsergebnisse für die Kontrollgruppe  $t_0=3,5681 \text{ AU} \pm 1,8587$  und  $t_1=4,5465 \text{ AU} \pm 2,2672$  ermittelt. In der Belastungsgruppe ergaben sich ein  $t_0=4,7334 \text{ AU} \pm 2,0971$  und  $t_1=4,3417 \text{ AU} \pm 1,5871$ .

Um die Modulation der mRNA-Expression für Bcl-2 zwischen beiden Gruppen vergleichen zu können, wurde als Maßstab der Änderung der Quotient aus Expression nach und vor Sauerstoffexposition gebildet (Abb. 16). Dabei zeigte sich im Bereich der Kontrollgruppe eine signifikante Hochregulierung ( $p < 0,05$ ), während diese bei der Belastungsgruppe nicht feststellbar war.

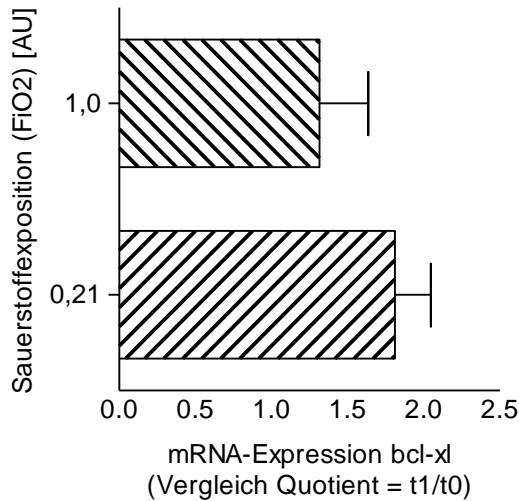


**Abb. 15: mRNA-Expression von Bcl-2:** Vergleich von Kontrollgruppe und Belastungsgruppe, die jeweils 30 Minuten bei einem Umgebungsdruck von 2,8 bar einer Sauerstofffraktion von 0,21 (Kontrollgruppe) und 1,0 (Belastungsgruppe) ausgesetzt waren, hinsichtlich der mRNA-Expression von Bcl-2 aus Vollblutproben, die vor und 24 h nach Exposition entnommen worden sind und mittels rtPCR relativ quantifiziert worden sind. Analysiert wurde der Quotient aus dem Wert 24 h nach und unmittelbar vor Exposition. \*\* entspricht  $p < 0,05$ .

### 3.2.2 mRNA Bcl-xl

Die mRNA-Expression für Bcl-xl ergab folgende relative quantifizierte Ergebnisse: Innerhalb der Kontrollgruppe  $t_0=133,6688 \text{ AU} \pm 94,8474$  und  $t_1=190,1042 \text{ AU} \pm 151,9881$  gegenüber der Belastungsgruppe mit  $t_0=92,1752 \text{ AU} \pm 67,6422$  und  $t_1=83,1683 \text{ AU} \pm 61,7338$ .

Beim Vergleich der Ergebnisse der Bcl-xl-Expression ergab sich keine relevante Änderung der mRNA-Quantifizierung. Ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen beiden Gruppen konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 17).

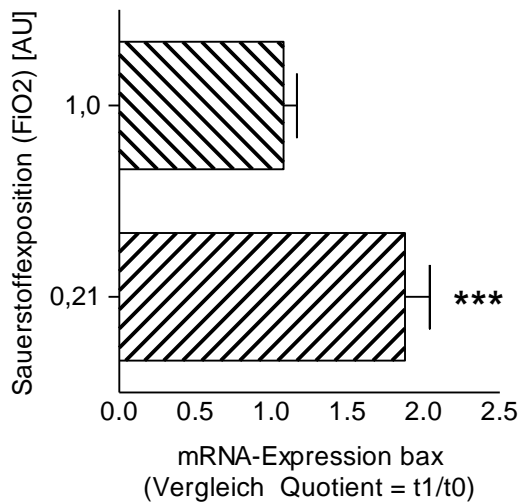


**Abb. 16: mRNA-Expression von Bcl-xl:** Vergleich von Kontrollgruppe und Belastungsgruppe, die jeweils 30 Minuten bei einem Umgebungsdruck von 2,8 bar einer Sauerstofffraktion von 0,21 (Kontrollgruppe) und 1,0 (Belastungsgruppe) ausgesetzt waren, hinsichtlich der mRNA-Expression von Bcl-xl aus Vollblutproben, die vor und 24 h nach Exposition entnommen worden sind und mittels rtPCR relativ quantifiziert worden sind. Analysiert wurde der Quotient aus dem Wert 24 h nach und unmittelbar vor Exposition.

### 3.2.3 mRNA Bax

Bei der relativen Quantifizierung der mRNA-Expression von Bax ergaben sich für die Kontrollgruppe  $t_0=15,0359 \text{ AU} \pm 10,6821$  und  $t_1=27,6042 \text{ AU} \pm 27,9059$ , für die Belastungsgruppe  $t_0=23,2048 \text{ AU} \pm 18,4123$  und  $t_1=23,2541 \text{ AU} \pm 14,9915$ .

Beim Vergleich der Quotienten aus relativer mRNA-Quantifizierung der Proben 24 h nach und unmittelbar vor der Sauerstoffexposition zeigte bei der Belastungsgruppe keinen nachweisbaren Effekt, während die Expression in der Kontrollgruppe hochsignifikant ( $p < 0,01$ ) hochreguliert war. (Abb. 18).



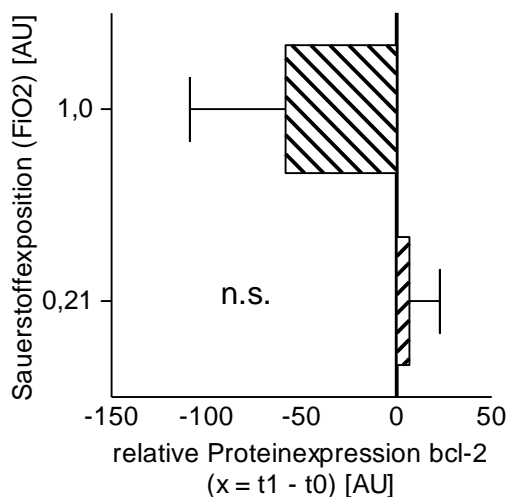
**Abb. 17: mRNA-Expression von Bax:** Vergleich von Kontrollgruppe und Belastungsgruppe, die jeweils 30 Minuten bei einem Umgebungsdruck von 2,8 bar einer Sauerstofffraktion von 0,21 (Kontrollgruppe) und 1,0 (Belastungsgruppe) ausgesetzt waren, hinsichtlich der mRNA-Expression von Bax aus Vollblutproben, die vor und 24 h nach Exposition entnommen worden sind und mittels rtPCR relativ quantifiziert worden sind. Analysiert wurde der Quotient aus dem Wert 24 h nach und unmittelbar vor Exposition. \*\*\* entspricht  $p < 0,01$ .

### 3.3 CBA

#### 3.3.1 Bcl-2-Proteinexpression

Anhand des „Apoptosis CBA-Kits“ wurden aus mononukleären Zellen Quantifizierungsergebnisse hinsichtlich der Bcl-2-Proteinexpression ermittelt. Dabei ergab sich für die Kontrollgruppe zum Zeitpunkt  $t_0=245,2941$  AU  $\pm$  131,1341, zum Zeitpunkt  $t_1=249,4941$  AU  $\pm$  148,3179. Die Belastungsgruppe wies Werte von  $t_0=905,9944$  AU  $\pm$  938,669 und  $t_1=953,5278$  AU  $\pm$  1111,0637 auf.

Die Differenz der Expression von Bcl-2 vor und nach Sauerstoffexposition  $x = t_1 - t_0$  wurde verglichen. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen Belastungsgruppe und Kontrollgruppe festgestellt werden (Abb. 14). Ein statistisch nicht absicherbarer Trend hin zu einer verminderten Bcl-2-Expression in der Kontrollgruppe scheint vorhanden.

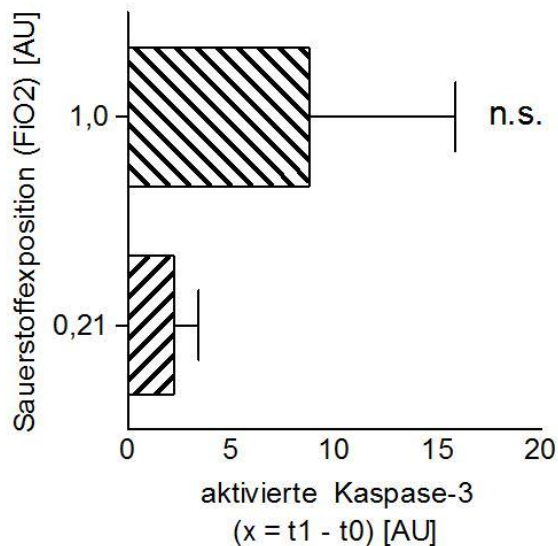


**Abb. 18: Bcl-2-Proteinexpression:** Vergleich der Expression von Bcl-2 in mononukleären Zellen aus Vollblutproben, entnommen vor und 24 h nach einer 30 minütigen Druckexposition von 2,8 bar bei einer  $F_iO_2 = 1,0$  (Belastungsgruppe) oder 0,21 (Kontrollgruppe), anhand der Differenz von vorhandenem Protein prä- und postexpositionell. n.s. entspricht  $p > 0,05$ .

### 3.3.2 Kaspase 3-Aktivierung

Die Messung der Expression von aktivierter Kaspase-3 ergab mittels CBA-Analyse für die Kontrollgruppe  $t_0=3,7882 \text{ AU} \pm 8,2522$  und  $t_1=7,0941 \text{ AU} \pm 10,7304$  sowie für die Belastungsgruppe  $t_0=33,4278 \text{ AU} \pm 33,1912$  und  $t_1=39,2056 \text{ AU} \pm 41,7026$ .

Zum Vergleich wurde die Differenz der in mononukleären Zellen aktivierten Kaspase-3 vor und nach Sauerstoffexposition gegenübergestellt. In der Belastungsgruppe zeigte sich dabei im Vergleich zur Kontrollgruppe ein Trend zur Aktivierung von Kaspase-3. Ein signifikantes Ergebnis ( $p < 0,05$ ) war aber nicht feststellbar (Abb. 15).

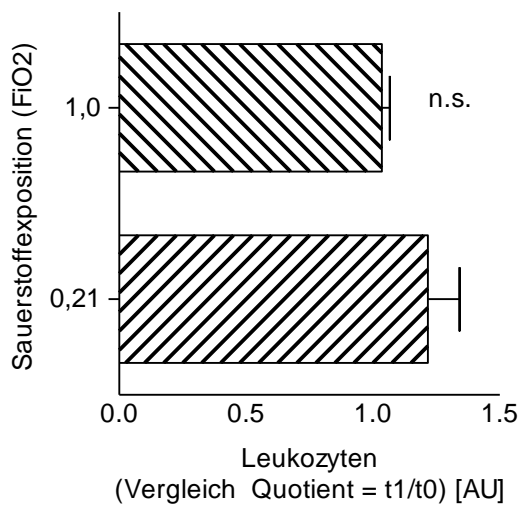


**Abb. 19: aktivierte Kaspase-3:** Vergleich der Expression von aktivierter Kaspase-3 in mononukleären Zellen aus Vollblutproben, entnommen vor und 24 h nach einer 30 minütigen Druckexposition von 2,8 bar bei einer  $\text{FiO}_2 = 1,0$  (Belastungsgruppe) oder 0,21 (Kontrollgruppe), anhand der Differenz von aktivierter Kaspase-3 prä- und postexpositionell. n.s. entspricht  $p > 0,05$ .

### 3.4 Leukozyten

Im Routinelabor wurden folgende Leukozytenwerte [ $\cdot 10^9/l$ ] aus den Vollblutproben für die Kontrollgruppe bestimmt:  $t_0=5,6812 \text{ AU} \pm 1,5543$  und  $t_1=6,38 \text{ AU} \pm 1,4612$ . Für die Belastungsgruppe ergaben sich  $t_0= 6,703 \text{ AU} \pm 1,9879$  und  $t_1=6,855 \text{ AU} \pm 1,8677$ .

Der Vergleich des Änderungsverhältnisses der Leukozytenzahlen anhand des Quotienten der Probe 24 h und unmittelbar vor Sauerstoffexposition ergab keinen signifikanten ( $p < 0,05$ ) Unterschied innerhalb oder zwischen beiden Gruppen (Abb. 19).



**Abb. 20: Leukozyten:** Vergleich der Quotienten der Leukozytenzahlen 24 h nach und unmittelbar vor Sauerstoffexposition bei 2,8 bar Umgebungsdruck. Die Belastungsgruppe atmete dabei reinen Sauerstoff, die Kontrollgruppe 21%. n.s. entspricht  $p > 0,05$ .

#### 4. Diskussion

#### 4.1 Stellenwert der Sauerstofftoxizität für die Apoptoseaktivierung

Die Exposition gegenüber erhöhten Sauerstoffpartialdrücken fördert oxidativen Stress im menschlichen Organismus. Die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“, ROS) als möglicher Ursache der Schädigung korreliert dabei proportional mit dem Sauerstoffpartialdruck (Muth et al., 2005). Die wichtigsten entstehenden ROS sind Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), Superoxid-Anionen ( $O_2^-$ ) und Hydroxylradikale ( $OH^\cdot$ ) als potentester Vertreter (Ganguly et al., 2002). Verschiedene intrazelluläre Proteine können durch Radikaleinwirkung oxidiert werden, woraus die Modifikation und Degradierung von Aminosäuren resultiert. Die durch die Oxidierung neu hinzugekommenen funktionellen Gruppen, wie Hydroxyl- und Carbonylgruppen, können als Folgereaktionen zu Proteinfragmentierung und Zerstörung der Tertiärstruktur und damit zum Verlust der Funktionalität führen (Dean et al., 1997).

In Zellkulturen konnten Kwon et al. 2003 aufzeigen, dass diese oxidative Schädigung integrale Bestandteile der Lebensfähigkeit von Zellen, wie z. B. DNA, Proteine und Membranlipide, betrifft.

Eine Störung des humanen Immunsystems durch oxidativen Stress schien möglich, nachdem Brenner et al. 1999 in vivo eine deutliche Minderung von Reaktionen auf Antigene und Allotransplantate sowie eine abgeschwächte Autoimmunreaktion nach Exposition gegenüber erhöhten Sauerstoffpartialdrücken beschrieben. Im Tiermodell war ein temporärer Abfall der T-Helfer-Lymphozyten nachweisbar (Bitterman et al., 1994). Ähnlich wie bei der HIV-Infektion wurde beim Menschen durch den dort ebenfalls nachweisbaren Abfall die CD4/CD8-Ratio der T-Zellen, also das Verhältnis der T-Helfer- zu T-Killer- bzw. T-Suppressor-Zellen, vorübergehend vermindert (Bitterman et al., 1993). Speit et al. zeigten 2000 am Menschen auf, dass durch hyperbare Sauerstoffexposition Schäden an der DNA von Immunzellen entstehen können.

Grundsätzlich sind dabei verschiedene Faktoren als mögliche Ursache anzunehmen: Die Auswirkung von ROS sind offensichtlich in Betracht zu ziehen, aber ebenso könnten Gewebeaffektionen in der Dekompressionsphase und nachfolgende Reparaturprozesse, eine Umverteilung des Blutstroms durch Druckänderungen, Katecholaminsekretion,



intravaskuläre Blasenbildung oder Kortisolsekretion die Immunkompetenz beeinflussen (Brenner et al., 1999).

Bei Ratten konnte durch wiederholte Exposition gegenüber erhöhtem Sauerstoffpartialdruck eine temporäre Immunsuppression ausgelöst werden. Die Gabe von N-Acetylcystein als Antioxidanz ließ diesen Effekt signifikant absinken, was für einen kausalen Zusammenhang mit oxidativem Stress spricht (Xu et al., 2007).

Eine enge Verbindung zwischen Apoptose und durch hyperbare Oxygenierung (HBO) induzierter Immunsuppression scheint nahe liegend, nachdem in vitro eine Apoptoseinduktion bei hämatopoetischen Zellen nachgewiesen werden konnte (Ganguly et al., 2002). Auch für Lymphozyten im Speziellen konnte am Zellmodell die Verursachung eines programmierten Zelltodes durch hyperbare Oxygenierung nachgewiesen werden (Shinkai et al., 2004). Den erheblichen Stellenwert der ROS als Verursacher der Apoptose arbeiteten Kazzaz et al. 1996 heraus.

Dennoch ist die Studienlage nicht einheitlich. So konnten Nyland et al. 1989 nachweisen, dass HBO einen stimulierenden Effekt auf das Immunsystem bei Patienten mit Multipler Sklerose hatte. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür ist die Tatsache, dass Hyperoxie als Signaltransduktor agieren kann, der in einer erhöhten Expression von antioxidativen Enzymen resultiert (Muth et al., 2005).

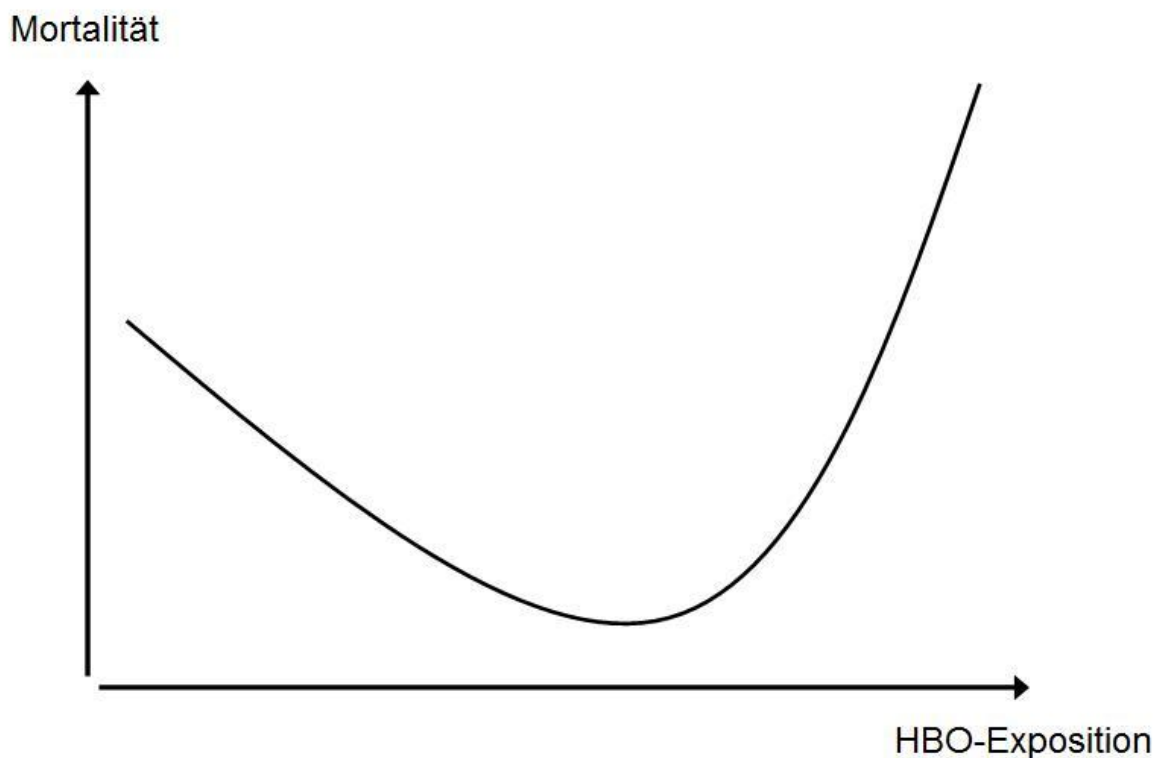
Diese Eigenschaft scheint mindestens genauso viel zum therapeutischen Effekt einer HBO, z. B. bei Sepsis, beizutragen, wie die erhöhte Sauerstoffversorgung des Gewebes und die bakterizide Potenz (Calzia et al., 2006).

Calzia et al. konnten 2006 am Tiermodell konträre Wirkungen der HBO aufzeigen. Dabei wurde bei Ratten mittels „cecal ligation and puncture“-Modell (Zökum-Ligatur und –Punktion, CLP-Modell) eine polymikrobielle Sepsis ausgelöst und die vier-Tages-Überlebensrate erfasst. Das CLP-Modell ist ein gängiges und anerkanntes Versuchsmodell für Sepsis im Tierversuch. Dabei wird durch Ligatur und Punktion des Zökums eine bakterielle Peritonitis provoziert (Hiramatsu et al., 1997)

In der durch Calzia et al. 2006 durchgeführten Studie verdoppelte sich die Überlebensrate in einer Kontrollgruppe, die zweimal am Tag einer HBO mit 2,5 bar Umgebungsdruck ausgesetzt wurde, im Vergleich zur nicht mit HBO behandelten Gruppe. Eine weitere Kontrollgruppe, bei der ebenfalls zweimal am Tag eine HBO,

allerdings mit 3 bar Umgebungsdruck, durchgeführt wurde, wies eine Mortalität von 100% innerhalb des Studienzeitraumes auf.

Madger führte 2003 für die diametral entgegengesetzten Rollen der ROS den Begriff der „Freund oder Feind“-Bedeutung („friend or foe-character“) ein. Calziga et al. spezifizierten 2006 das Phänomen im Sinne einer „therapeutischen Breite“ der HBO mit dem Begriff der „U-förmigen Verteilung“ des HBO-Effektes (Abb. 20).



**Abb. 21: U-förmige Verteilung des HBO-Effekts;** HBO-Exposition kann dabei in einem gewissen Bereich die Mortalität bei bakterieller Sepsis senken. Bei einer weiteren Erhöhung der HBO-Exposition ist allerdings mit einer Zunahme der Mortalität über das isoliert sepsisbedingte Maß hinaus zu rechnen.

#### 4.2 Studienergebnisse

Die im Rahmen dieser Studie durchgeführte hyperbare Sauerstoffexposition ergab nach derzeitigem Forschungsstand unerwartete Ergebnisse, deren endgültige Deutung erst nach Vertiefung des Verständnisses für die Vorgänge der Apoptose im Allgemeinen und der Auswirkung der HBO im Speziellen möglich sein wird.

Die quantitative Bestimmung der mRNA-Expression für das pro-apoptotisch wirkende Enzym Bax ergab im Vergleich der Proben vor und nach Sauerstoffexposition in der Kontrollgruppe mit Raumlufteexposition eine hochsignifikante Hochregulierung.

Dies entspricht der Erwartung, dass durch den erhöhten Sauerstoff-Partialdruck vermehrt reaktive Sauerstoffspezies gebildet werden, was intrazelluläre Schäden verursacht, die in Apoptose münden können.

Die mRNA-Expression des anti-apoptotischen Enzyms Bcl-2 stieg bei der Kontrollgruppe signifikant an, so dass sowohl pro-, als auch anti-apoptotische Gene vermehrt exprimiert waren.

Überraschenderweise war in der Belastungsgruppe, die einem annähernd fünf mal so großen Sauerstoffpartialdruck ausgesetzt war, keine Hochregulation von Bax nachweisbar. Eine mögliche Kompensation Apoptose-induzierender Effekte des hohen Sauerstoffpartialdrucks durch eine vermehrte Expression anti-apoptotischer Enzyme bestand aber nicht, eine Erhöhung von Bcl-2 war in der Belastungsgruppe nicht feststellbar.

Der nachgewiesene Anstieg des anti-apoptotischen Bcl-xl in beiden Gruppen wies keinen signifikanten Unterschied auf.

Die Messung der Bcl-2-Aktivität im Zytosol mittels CBA ergab für keine der Gruppen eine signifikante Abweichung, jedoch war in der Belastungsgruppe ein nicht signifikanter Trend hin zur verminderten Aktivität festzustellen.

Mittels CBA wurde in beiden Gruppen die Aktivierung von Kaspase-3 als Marker für die tatsächlich initiierte Apoptose bestimmt. Eine signifikante Änderung nach Exposition

gegenüber hyperbarem Sauerstoff war dabei nicht nachweisbar. Lediglich in der Belastungsgruppe war ein nicht signifikanter Trend hin zu einer erhöhten Aktivierung nachweisbar.

Unter Beachtung des Signifikanzniveaus ergab sich im Rahmen der hyperbaren Sauerstoffexposition innerhalb der Belastungsgruppe keine nachweisbare Änderung der Genexpression sowohl von pro-, als auch von anti-apoptotischen Faktoren. Aufgrund des sehr hohen Sauerstoffpartialdrucks wäre eine signifikante Änderung vorrangig in dieser Gruppe zu erwarten gewesen.

Die gleichzeitig nachweisbare signifikante Hochregulierung von Bcl-2 sowie die hochsignifikante Hochregulierung von Bax in der Kontrollgruppe ist überraschend.

Die Ergebnisse der Studie lassen somit die in Kapitel 2 aufgeführten Fragen wie folgt beantworten:

1. Induziert hyperbare Sauerstoffexposition eine erhöhte Expression des proapoptotischen Gens Bax?

Hyperbare Sauerstoffexposition induziert nicht grundsätzlich eine erhöhte Expression des proapoptotischen Gens Bax. In der Belastungsgruppe mit reinem Sauerstoff konnte eine Hochregulation der Expression nicht nachgewiesen werden, in der Kontrollgruppe mit Raumluft war dies aber der Fall.

2. Bewirkt hyperbare Sauerstoffexposition eine verminderte Expression der antiapoptotischen Gene Bcl-2 und Bcl-xl?

Eine hyperbare Sauerstoffexposition bewirkt keine verminderte Expression der antiapoptotischen Enzyme Bcl-2 und Bcl-xl. In der Belastungsgruppe mit reinem Sauerstoff war keine Modifizierung der Regulation nachzuweisen. In der Kontrollgruppe war eine signifikante Erhöhung der Expression nachweisbar.

3. Bewirkt hyperbare Sauerstoffexposition eine erhöhte Apoptoseinduktion durch vermehrte Aktivierung von Kaspase-3?

Eine hyperbare Sauerstoffexposition bewirkt keine nachweisbare signifikante Erhöhung der Aktivierung von Kaspase-3. Ein nicht statistisch absicherbarer Trend zu einem Anstieg der Aktivierung in der Belastungsgruppe mit reinem Sauerstoff scheint vorzuliegen.

#### 4.4 Interpretation

Eine erhöhte Sauerstoffbelastung bei 2,8 bar Umgebungsdruck für 30 Minuten löst bei Probanden deutlich nachweisbare Veränderungen auf der Ebene der Apoptosesignale aus. Eine Aktivierung von Apoptose bei MNZ durch HBO ist also prinzipiell möglich.

Hohe Sauerstoffpartialdrücke bewirken aber keine gesetzmäßige lineare Veränderung in der Expression von pro- und antiapoptotischen Genen bei steigendem  $pO_2$ . Bereits bei RaumlufTEXposition in hyperbarer Umgebung tritt eine signifikante Hochregulation des proapoptotischen Proteins Bax und eine vermehrte Expression des antiapoptotischen Bcl-2 ein. Erstaunlicherweise führte eine Exposition gegenüber reinem Sauerstoff bei gleichem Umgebungsdruck zu einer Reduktion der mRNA-Expression von Bax sowie von Bcl-2, sodass in diese Gruppe summarisch im Vergleich zur Kontrollgruppe sogar weniger Veränderungen auftraten.

Diese Beobachtung widerspricht der Hypothese, dass eine steigende Erhöhung des Sauerstoffpartialdruckes eine lineare Steigerung der Apoptoseaktivierung auf Signaltransduktionsebene bewirkt.

Es könnte sich damit um einen nichtlinearen Effekt handeln, bei dem bei moderatem Sauerstoffstress eine Apoptoseinduktion und eine konsekutive Apoptoseinhibition als Schutzreaktion induziert werden, die bei stärkerem Sauerstoffstress nicht mehr ausgebildet werden oder werden können. Da in der Belastungsgruppe keine signifikant erhöhte Aktivität von pro-apoptotischen Proteinen nachweisbar war, ist eine konsekutive Erhöhung von anti-apoptotischen Proteinen allerdings auch nicht zu erwarten. Möglicherweise findet eine Apoptoseregulation bei sehr starkem Sauerstoffstress auf anderen Zellebenen als den untersuchten statt. Denkbar wäre auch, dass die in der Belastungsgruppe vorhandene extreme Erhöhung des Sauerstoffpartialdruckes Kompensationsmechanismen in Gang setzt, die bei der im Vergleich eher moderaten Sauerstoffexposition in der Kontrollgruppe noch nicht aktiviert wurden.

Bei moderater Sauerstoffexposition in der Kontrollgruppe wurden sowohl pro-, als auch anti-apoptotische Proteine verstärkt exprimiert. Der Anstieg antagonistischer Enzyme

dürfte in einer gegenseitigen Aufhebung der Effekte enden, was durch eine ausbleibende Aktivierung der Kaspase-3 auch belegt wurde.

Bei einer drastischeren Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks innerhalb der Belastungsgruppe blieb die Aktivierung der Kaspase-3 ebenfalls aus, wobei ein nicht signifikanter Trend in Richtung Aktivierung zu verzeichnen war. Eine mögliche Apoptoseinduktion lässt sich somit nicht sicher ausschließen.

Eine weitere Auffälligkeit stellt die Tatsache dar, dass zwar das anti-apoptotische Bcl-2 bei der Kontrollgruppe signifikant anstieg, nicht jedoch das verwandte anti-apoptotische Bcl-xl. Da sowohl Bcl-2, als auch Bcl-xl als Angehörige der Bcl-2-Subfamilie mit ihrer BH4-Domäne an Apaf-1 binden und dadurch die Bildung eines Apoptosoms mit Kaspase-9 verhindern, ist dieser Unterschied nicht zu erwarten und lässt sich mit dem bekannten Apoptosemodell nicht erklären. (Pan et al., 1998)

Es sind verschiedene Ursachen für die nachgewiesenen Effekte denkbar:

Möglich ist ein Einfluss der unterschiedlichen Altersverteilungen in beiden Gruppen auf die Apoptose-modulierenden Enzyme. Da die beiden Probandengruppen sich hinsichtlich des Altersmedians signifikant unterscheiden, ist ein Einfluss hierdurch zumindest zu diskutieren.

Alway et al. haben 2003 aufgezeigt, dass im Rattenmodell bei Muskelzellen von älteren Tieren der Proteingehalt an Bax erhöht, an Bcl-2 hingegen erniedrigt ist. Durch das Übergewicht an pro-apoptotischen Enzymen ist eine erhöhte Apoptose-Aktivität in der älteren Gruppe zu erwarten. Diese Tendenz widerspricht jedoch den Beobachtungen im Rahmen dieser Studie, wo beim älteren Kollektiv ein gegensinnig veränderter Proteingehalt nachweisbar war.

Da zwar ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Altersmedians besteht, sich jedoch beide 25%-75%-Perzentile im Bereich des jungen Erwachsenenalters bewegen, ist ein deutlicher Alterseffekt in der älteren Gruppe nicht zu erwarten.

Auch der Trainingszustand kann einen nicht unwesentlichen Einfluss auf die Disposition zur Apoptose haben.

Aktuelle Daten beschreiben das Vermögen eines akuten aeroben Trainingsreizes, die Apoptoserate im Skelettmuskel zu erhöhen, während langfristiges Training das Apoptosepotential verringert (Siu et al., 2004). Ji konnte schon 1995 zeigen, dass Ausdauertraining zu einer gewebsspezifischen Erhöhung der antioxidativen Kapazität führt.

Grundsätzlich ist von einer durchschnittlich höheren körperlichen Leistungsfähigkeit in der Belastungsgruppe auszugehen, da diese Probanden im Rahmen der Vorbereitung auf die körperlich fordernden Auswahlverfahren der Marine für die Waffentaucherausbildung ein weit überdurchschnittliches regelmäßiges Pensum an Ausdauer-Trainingseinheiten absolvieren. Die Probanden der Kontrollgruppe waren zum Großteil durchschnittlich trainierte Sporttaucher. Eine genaue Erfassung der körperlichen Leistungsfähigkeit, z. B. im Rahmen einer standardisierten Ergometrie, war im Studiendesign nicht vorgesehen, so dass eine endgültige Beurteilung nicht möglich ist. Dennoch ist aufgrund einer wahrscheinlich höheren, längeren und kontinuierlicheren Trainingsbelastung von einer vermehrten Expression anti-apoptotischer Mechanismen im Kollektiv der Belastungsgruppe auszugehen.

Neben unspezifischen Effekten des Ausdauertrainings kann im speziellen auch ein verbesserter zellulärer Schutz gegen Sauerstoffradikale relevant sein.

Am Zellmodell konnten Muth et al. 2005 nachweisen, dass wiederholte HBO-Exposition die genotoxischen Effekte von Wasserstoffperoxyd weitgehend verhindern konnte, während die Zellen weiterhin nicht vor genotoxischen Effekten durch Bestrahlung geschützt waren. Dies entspricht einer spezifischen Adaption der antioxidativen Kapazitäten der Zelle. Der beschriebene Schutz hielt für mindestens sieben Tage an.

Im Rattenmodell mit durch intraperitonealer E. coli-Injektion erzeugten Sepsis wiesen mit HBO therapierte Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine erhöhte antioxidative Enzymaktivität auf, während septische Verläufe gemeinhin mit einer Verringerung der antioxidativen Kapazität einhergehen (Oter et al., 2005).

Für durch HBO induzierte DNA-Schäden wurde eine schnelle Reparatur nachgewiesen. Es kann daher vermutet werden, dass die erbgutschädigenden Effekte einer unter



therapeutischen Bedingungen erfolgten HBO repariert werden, bevor sie sich als Mutation manifestieren und eine Apoptose einleiten (Dennog et al., 1999). Eine wesentliche Rolle scheint dabei nicht nur eine erhöhte zelluläre Kapazität für Reparaturvorgänge zu spielen, sondern auch ein verbesserter Schutz vor Oxidationsschäden durch Antioxidantien (Dennog et al., 1996). Speit et al. konnten 2000 belegen, dass eine HBO zu einer schnellen, signifikanten Hochregulierung des Antioxidans Hämoxxygenase-1 (HO-1) führt. Dies führt nachweislich zu einer Minderung der durch HBO induzierten DNA-Schädigung (Rothfuss und Speit, 2002), während eine Inhibition von HO-1 die DNA-Schädigung bei HBO in vitro erhöht (Gröger et al., 2005). Es ist also denkbar, dass eine im Vorfeld erfolgte hyperbare Sauerstoffexposition, z. B. im Rahmen von Tauchgängen, einen deutlichen Einfluss auf die Enzymaktivität in beiden Gruppen genommen hat. Da in beiden Gruppen sowohl sehr aktive Sporttaucher, als auch absolute Gelegenheitstaucher vertreten waren, ist von gemischten Kollektiven hinsichtlich der Ausprägung von adaptiven antioxidativen Schutzmechanismen auszugehen. Ein Vergleich beider Gruppen unter diesem Aspekt könnte daher ggf. nicht zielführend sein. Die im näheren zeitlichen Vorfeld der Druckkammerfahrten erfolgten HBO-Expositionen sind nicht erfasst worden, so dass eine Auswertung dieses Faktors nicht möglich ist.

Der von Calzia et al. 2006 beschriebene U-förmige Verlauf des HBO-Effektes könnte gleichsinnig oder ähnlich auch im Bereich der Expression von pro- und antiapoptotischen Enzymen auftreten. So ist ein differenzierter, nicht linearer Effekt bei Steigerung der hyperbaren Sauerstoff-Exposition durchaus denkbar. Gröger et al. zeigten 2005 auf, dass ein durch HBO verursachter DNA-Schaden zeitnah repariert und Schutzmechanismen induziert werden. Ähnliche Adaptionsmöglichkeiten könnten auch im Bereich der Apoptoseregulation initiiert werden.

Im Bereich des professionellen Tauchens, aber auch zunehmend des ambitionierten Tauchsportes, finden regelmäßige Expositionen gegenüber erhöhten

Sauerstoffpartialdrücken statt. Im Sinne der initialen Hypothese dieser Arbeit ist dadurch eine gesundheitliche Schädigung nicht auszuschließen.

Denkbar ist z. B. eine temporäre, ggf. im Verlauf bei entsprechender Exposition auch fixierte Suppression des Immunsystems, die in einer erhöhten Krankheitsanfälligkeit resultieren könnte. Von Bagatellinfekten abgesehen, kann eine opportune spezifische Infektion zu erheblichen langfristigen Gesundheitsschäden führen.

Dies bedingt neben Erkrankungen bei Sporttauchern vor allem eine entsprechende Ausfallzeit von hochqualifiziertem und -spezialisiertem Personal im Bereich des gewerbsmäßigen bzw. behördlichen Tauchens. Die Erarbeitung einer adäquaten präventiven Expositionsminderung bis zur Entwicklung ggf. möglicher prophylaktischer Therapieansätze wäre die unabdingbare Konsequenz.

Zusammenfassend widersprechen die Ergebnisse der Studie aber der initialen Hypothese, dass steigende Sauerstoffpartialdrücke eine proportional zunehmende Induktion von Apoptose auslösen.

In Anbetracht der in beiden Gruppen nicht signifikanten Apoptoseinduktion dürfte ein möglicher Effekt, wenn überhaupt vorhanden, nur sehr schwach ausgeprägt sein. Zur sicheren Beurteilung müsste ein wesentlich größeres Kollektiv untersucht werden. Dabei sollten sowohl die körperliche Leistungsfähigkeit, wie auch das im Vorfeld des Versuches absolvierte Trainingspensum und die erfolgten HBO-Expositionen systematisch erfasst und in der Auswertung berücksichtigt werden.

Der nachgewiesene geringe HBO-Effekt auf die Aktivierung von Kaspase-3 als Endstrecke der Apoptosekaskade ist ein ernst zu nehmender Hinweis auf eine mögliche Schädigung des menschlichen Organismus durch Sauerstoffexposition. Die statistische Signifikanz im vorhandenen Studiendesign lässt jedoch noch keine definitive Aussage zu. Somit ergibt sich bislang kein Nachweis, dass Tauchen und HBO die Lymphozytenapoptose beim Menschen erhöhen.

## **5. Zusammenfassung**

Erhöhte Sauerstoffpartialdrücke können humane Zellen auf verschiedene Weisen schädigen. Ein wesentlicher Mechanismus ist dabei die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. In jüngster Zeit mehren sich die Anzeichen dafür, dass ein erhöhter Sauerstoffpartialdruck auch den programmierten Tod (Apoptose) von immunkompetenten Zellen auslösen kann.

Taucher sind durch die erhöhten Umgebungsdrücke einem erhöhten Sauerstoffpartialdruck ausgesetzt. Besonders im behördlichen und gewerblichen Tätigkeitsfeld, z. B. bei den Waffentauchern der Spezialisierten Einsatzkräfte der Marine, sind durch die Verwendung von speziellen Kreislauf-Tauchgeräten im Vergleich zur normobaren Umgebung bis zu siebenfach erhöhte Sauerstoffpartialdrücke gegeben. Eine immunsuppressive Wirkung durch Induktion von Apoptose erscheint somit möglich. Dies könnte in gesundheitlichen Schäden und konsekutiv verminderten Einsatzzeiten resultieren.

Diese Arbeit untersucht die Induktion von Apoptose bei mononukleären Zellen durch hohe Sauerstoffpartialdrücke in vivo. In der Studie wurde die Expression des proapoptotischen Gens Bax und der anti-apoptotischen Gene Bcl-2 und Bcl-xl, sowie der Aktivierung von Kaspase-3 als Endstreckenmarker der Apoptose jeweils unmittelbar vor und 24 h nach einer hyperbaren Sauerstoffexposition im Rahmen einer Druckkammerfahrt verglichen. Die Genexpression wurde dabei mittels mRNA-Transkription in cDNA und anschließender Quantifizierung mittels BCA Protein Essay untersucht. Die Quantifizierung der Aktivierung von Kaspase-3 und der Bcl-2-Aktivität im Serum erfolgte mittels Fluoreszenzmarkierung durch einen Cluster Bead Array in der Durchflußzytometrie.

Eingeschlossen wurden n=29 Probanden in der Belastungsgruppe, die einem  $p_{\text{Umgebung}}=2,8$  bar bei einem  $f_{\text{O}_2}=1,0$  über 30 min ausgesetzt waren, und n=32 Probanden in der Kontrollgruppe, die einem  $p_{\text{Umgebung}}=2,8$  bar bei einem  $f_{\text{O}_2}=0,21$  über 30 min ausgesetzt waren.

In der Kontrollgruppe fanden sich deutlich nachweisbare Veränderungen auf molekularer Apoptosesignalebene: Das proapoptotische Gen Bax wurde signifikant hochreguliert, ebenso erfolgte eine erhöhte Expression des antiapoptotischen Gen Bcl-2. Eine Veränderung der Aktivierung von Kaspase-3 war nicht nachweisbar.

Die deutliche Erhöhung der Sauerstoffexposition bei der Belastungsgruppe resultierte nicht in der erwartungsgemäßen Zunahme dieser Effekte. Die Expression sowohl von Bax, als auch von Bcl-2 war nicht erhöht. Ein signifikanter Anstieg der Kaspase-3-Aktivierung konnte nicht nachgewiesen werden, allenfalls ein Trend hin zu einer vermehrten Aktivierung. Für eine endgültige Bewertung müsste ein wesentlich größeres Kollektiv untersucht werden.

Die Studie zeigte, dass eine Exposition mit hohen Sauerstoffpartialdrücken prinzipiell eine Apoptose von mononukleären Zellen auslösen kann. Der Apoptose-induzierende Effekt ist, falls vorhanden, allerdings so schwach, dass sich die Frage nach der Bedeutung stellt. Dies widerspricht der initialen Hypothese, dass eine steigende Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks in vivo eine deutlich linear ansteigende Apoptoseinduktion bewirkt.

Ein möglicher Erklärungsansatz ist eine verbesserte zelluläre Kompensationskapazität gegenüber Sauerstofftoxizität bei der Belastungsgruppe durch ein höheres Ausdauertrainingspensum oder regelmäßige hyperbare Exposition. Da diese Variable im Studiendesign jedoch nicht erfasst worden ist, ist sie nicht abschließend zu bewerten. Desweiteren ist eine nicht lineare Wirkung hyperbarer Sauerstoffexposition denkbar, die in einem bisher nicht näher definierten „therapeutischen Bereich“ durch Induktion von Kompensationsmechanismen einen zumindest verminderten Apoptose-promovierenden Effekt, möglicherweise sogar Apoptose-inhibierenden Effekt haben könnte.

Verzeichnis der Tabellen/Abbildungen

- Abb. 1 Grenzen der Schädigung durch Sauerstoffexposition abhängig vom Sauerstoff-Partialdruck und der Expositionszeit
- Abb. 2 Tauchgangsphasen eines idealen Tauchgangs
- Abb. 3 Schemazeichnung Kreislauftauchgerät LAV V, Fa. Dräger
- Abb. 4 Waffentaucher der Bundesmarine mit LAR V
- Abb. 5 Maximale Tauchtiefe mit reinem Sauerstoff und Sauerstoff-Stickstoff-Gemisch in Kreislauftauchgeräten
- Abb. 6 Morphologische Unterschiede zwischen Nekrose und Apoptose
- Abb. 7 Vereinfachte Darstellung der Signaltransduktion der Apoptose
- Abb. 8 Schematische Darstellung der Domänenstruktur der Bcl-2 Familie
- Abb. 9 Wirkung der Proteine der Bcl-2-Familie
- Abb. 10 Druckkammer Haux Hydra 2000 des Schiffahrtmedizinischen Institutes der Bundeswehr
- Abb. 11 Druckkammer Haux Decomat plus des HBO-Zentrums Euregio
- Abb. 12 Druckkammer Haux Decomat plus des HBO-Zentrums Euregio
- Abb. 13 Zeitachse der Probenentnahme
- Abb. 14 Durchflußzytometrie
- Abb. 15 mRNA-Expression von Bcl-2
- Abb. 16 mRNA-Expression von Bcl-xl
- Abb. 17 mRNA-Expression von Bax
- Abb. 18 Bcl-2-Proteinexpression
- Abb. 19 aktivierte Kaspase 3-Proteinexpression
- Abb. 20 Leukozyten
- Abb. 21 U-förmige Verteilung des HBO-Effekts
- 
- Tab. 1 Abgrenzung von Nekrose und Apoptose
- Tab. 2 Demographische Verteilung der Probandengruppen

Literaturverzeichnis

1. Always SE, Degens H, Krishnamurthy G, Chaudhrai A. Denervation stimulates apoptosis but not Id2 expression in hindlimb muscles of aged rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2003; 58: 687-697
2. Anderson HA, Maylock CA, Williams JA, Paweletz CP, Shu H, Shacter E. Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 87-91
3. Bert P. La pression barometrique. *Recherches de Physiologie Experimentale* 1878 ; Masson, Paris
4. Bitterman N, Bitterman H, Kinarty A, Melamed Y, Lahat N. Effect of a single exposure to hyperbaric oxygen on blood mononuclear cells in human subjects. *Undersea Hyperb Med* 1993; 20: 197-204
5. Bitterman N, Lahat N, Rosenwald T, Kinarty A, Melamed Y, Bitterman H. Effect of hyperbaric oxygen on tissue distribution of mononuclear cell subsets in the rat. *J Appl Physiol* 1994; 77: 2355-2359
6. Brenner I, Shephard RJ, Shek PN. Immune function in hyperbaric environments, diving and decompression. *Undersea Hyper Med* 1999; 26: 27-39
7. Carl UM. Hyperbarer Sauerstoff (HBO) in der Strahlentherapie: Die Bedeutung der respiratorischen Hyperoxie. *Dtsch Arztebl* 1997; 94, 16: A-1065, B-907, C-822
8. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59: 527-605
9. Clark JM, Thom SR. Oxygen under pressure. In: Brubakk AO, Neuman TS, Hrsg. *Physiology and medicine of diving*. Edinburgh: Saunders; 2003: 379-397
10. Dean RT, Fu SL, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical mediated protein oxidation. *Biochem J* 1997; 324: 1-18
11. Dennog C, Hartmann A, Frey G, Speit G. Detection of DNA damage after hyperbaric oxygen (HBO) therapy. *Mutagenesis* 1996; 11: 605-609
12. Dennog C, Gedik C, Wood S, Speit G. Analysis of oxidative DNA damage and HPRT mutations in humans after hyperbaric oxygen treatment. *Mutat. Res.* 1999; 431: 351-359
13. Donald KW. *Oxygen and the diver*. Harley Swan, UK: The SPA Ltd; 1992
14. Dräger Safety AG & Co. KGaA „LAR VI.1 Kreislauf-Tauchgerät. Rebreather. Gebrauchsanweisung“ 1. Ausgabe, 2001
15. Ehm OF. *Tauchen noch sicherer*. Cham: Müller Rüschnikon 2007: 229-238
16. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; 391: 43-50
17. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001; 411: 342-348
18. Frasch SC, Henson PM, Kailey JM, Richter DA, Janes MS, Fadok VA, Bratton DL. Regulation of phospholipid scramblase activity during apoptosis and cell activation by protein kinase Cdelta. *J Biol Chem* 2000; 275: 23065-23073
19. Freeman BA, Crapo JD. Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *J Biol Chem* 1981; 256: 10986-10992

20. Ganguly BJ, Tonomura N, Benson M, Osborne BA, Granowitz EV. Hyperbaric oxygen enhances apoptosis in hematopoietic cells. *Apoptosis* 2002; 7: 499-510
21. Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. Oxygen poisoning and x-irradiation: A mechanism in common. *Science* 1954; 119: 623-626
22. Green DR, Ferguson TA. The role of Fas ligand in immune privilege. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 917-924
23. Gröger M, Speit G, Radermacher P, Muth CM. Interaction of hyperbaric oxygen, nitric oxide, and heme oxygenase on DNA strand breaks in vivo. *Mutat Res* 2005; 572: 167-172
24. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine*. 2. Ausg. Clarendon: Oxford University Press, 1989: 2-80
25. Halliwell B. Free radical, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence. *Lancet* 1994; 244: 721-724
26. Henderson A, Hayes P. Acetylcysteine as a cytoprotective antioxidant in patients with severe sepsis: a potential new use for an old drug. *Ann Pharmacother* 1994; 28: 1086-1088.
27. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770-776
28. Hiramatsu M, Hotchkiss RS, Karl IE, Buchman TG. Cecal ligation and puncture (CLP) induces apoptosis in thymus, spleen, lung, and gut by an endotoxin and TNF-independent pathway. *Shock* 1997; 7: 247-253
29. Ji LL. Exercise and oxidative stress: role of the cellular antioxidant systems. In: Holloszy J, Baltimore MD, Hrsg. *Exercise and Sports Science Review*. Williams & Wilkins, Philadelphia, 1995: 135–166.
30. Kazzaz JA, Xu J, Palaia TA. Cellular Oxygen Toxicity – Oxidant Injury without apoptosis. *JBioChem* 1996; 271: 15182-15186
31. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257
32. Koch A. Tauchen bei der Bundeswehr. In: Klingmann C, Tetzlaff K, Hrsg. *Moderne Tauchmedizin*. Stuttgart: Gentner, 2007: 422-427
33. Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Kohts K, Kwiatkowski DJ, Williams LT. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 1997; 278: 294-298
34. Krammer PH. CD95's most deadly mission in the immune system. *Nature* 2000; 407: 789-795
35. Kromp, Roggenbach, Bredebusch. *Praxis des Tauchens*. Bielefeld: Delius Klasing 2002: 97-98
36. Kromp, Roggenbach, Bredebusch. *Praxis des Tauchens*. Bielefeld: Delius Klasing 2002: 308-309
37. Leist M, Jaattela M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 589-598
38. Madger S. Reactive oxygen species: Toxic molecules or sparks of life? *Crit Care Med* 2003; 3: 1048-1052
39. Martinou JC, Green DR. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 63-67
40. Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature* 2000; 407: 796-801

41. Muth CM, Radermacher P, Cuzzocrea S. Hyperbaric oxygen and sepsis: time to recognize. *Intensive Care Med* 2005; 31: 1150-1152
42. Nyland H, Naess A, Eidsvik S, Glette J, Matre R, Hordnes C. Effect of hyperbaric oxygen treatment on immunological parameters in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1989; 79: 306-310
43. Pan G, O'Rourke K, Dixit VM. Caspase-9, Bcl-xl, and Apaf-1 Form a Ternary Complex. *J Biol Chem* 1998; 273: 5841-5845
44. Reed JC. Apoptosis-based therapies. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1: 111-121
45. Robinson M, Ahn MS, Rounds JD, Cook JA, Jacobs DO, Wilmore DW. Parenteral glutathione monoester enhances tissue antioxidant stores. *J Parent Ent Nutr* 1992; 16: 413-418
46. Rostain JC, Charpy JP. Effects upon the EEG of psychometric performance during deep dives in helium--oxygen atmosphere. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1976; 40: 571-584
47. Rothfuss A, Speit G. Overexpression of heme oxygenase-1 (HO-1) in V79 cells results in increased resistance to hyperbaric oxygen (HBO)-induced DNA damage. *Environ Mol Mutagen* 2002; 40: 258-265
48. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 401-410
49. Shinkai M, Shinomiya N, Kanoh S, Motoyoshi K, Kobayashi H. Oxygen stress effects on proliferation rates and heat shock proteins in lymphocytes. *Aviat Space Environ Med* 2004; 75: 109-113
50. Siu PM, Bryner RW, Martyn JK, Always SE. Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. *FASEB J* 2004; 18: 1150-1152
51. Smith CV. Correlations and apparent contradictions in assessment of oxidant stress in vivo. *Free Radic Biol Med* 1991; 10: 217-224
52. Speit G, Dennog C, Eichhorn U, Rothfuß A, Kaina B. Induction of heme oxygenase-1 and adaptive protection against the induction of DNA damage after hyperbaric oxygen treatment. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1795-1799
53. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316
54. Waldbrenner M. Tauchen mit Nitrox. In: Klingmann C, Tetzlaff K, Hrsg. *Moderne Tauchmedizin*. Stuttgart: Gentner, 2007: 104-108
55. Waldbrenner M. Technisches Tauchen. In: Klingmann C, Tetzlaff K, Hrsg. *Moderne Tauchmedizin*. Stuttgart: Gentner, 2007: 116-118
56. Wang SD, Huang KJ, Lin YS, Lei HY. Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice. *J Immunol* 1994; 152: 5014-5021
57. Weber SU, Schröder S, Schewe JC, Siekmann U, Koch A, Hoefl A, Stüber F. Hyperbaric Oxygen induces lymphocyte apoptosis through a mitochondrial mechanism. *Crit Care Med* 2006; 34 Abstract supplement: A33
58. Welslau W. Rekompansionsbehandlung. In: Klingmann C, Tetzlaff K, Hrsg. *Moderne Tauchmedizin*. Stuttgart: Gentner, 2007: 313
59. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980; 284: 555-556
60. Xu WG, Tao HY, Liu Y, Sun XJ, Jiang CL. Immune function in rats following repetitive exposures to 7 ATA air. *Aviat Space Environ Med* 2007; 78: 368-373
61. Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 67-71



## Danksagung

Ich möchte zunächst meinem Doktorvater, Privatdozent Dr. med. Stefan Schröder, für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung über halb Deutschland hinweg danken. Er verstand es ausgezeichnet, mit einer ausgewogenen Mischung aus Lob und Nachdruck die Beendigung meiner Dissertation trotz der langen Zeitdauer sicherzustellen.

Auch meinem Betreuer, Dr. med. Stefan Weber, danke ich an dieser Stelle. Er hat mich mit Geduld und Engagement in das Forschungsprojekt eingearbeitet, war bei allen auftretenden kleinen und großen Katastrophen stets der Anker, an dem alles hing. Mit seiner nicht aus der Ruhe zu bringenden Art bei den Versuchen und der Probenverarbeitung sowie der engagierten Durchsicht meiner Arbeit hat er wesentlich zum Gelingen der Dissertation beigetragen hat.

Vielen Dank auch meinen beiden guten Feen, Makbule und Caro, für die tolle Unterstützung, sowohl im Labor, als auch bei der Probenverarbeitung in Aachen. Ohne Ihr Lachen und Ihren Kaffee hätte alles nur halb so viel Spaß gemacht.

Dem Team des SchiffMedInst in Kiel-Kronshagen, FTA Dr. med. Andreas Koch und seinen MTA's, danke ich für die professionelle und reibungslose Zusammenarbeit.

Dr. med. Ullrich Siekmann, Dr. med. Stefan Wiese und Derk Remmers vom HBO-Zentrum Euregio danke ich herzlich für die Möglichkeit, in der Druckkammer des Zentrums einen Teil der Studie durchführen zu können sowie für die tatkräftige Unterstützung bei den notwendigen Tauchtauglichkeitsuntersuchungen.

Ich danke der Firma Dräger für die Überlassung verschiedener Grafiken und Daten zu Ihren Kreislauftauchgeräten.

Ich danke der Firma Boehringer, Mannheim, für die Überlassung der veröffentlichten Grafik.

Meinen Freunden Boris Teister, Martin Heinrich und Bernhard Tausch danke ich für das ernsthafte Gegenlesen und Korrigieren meiner Arbeit; Michael Kalaie und Bernhard Tausch dafür, sich als Probanden für die Druckkammerfahrten in Aachen zur Verfügung zu stellen. Meiner Familie, insbesondere meinen Geschwistern, danke ich für Ihre Unterstützung während der Arbeit. Schön, dass es Euch gibt!

Meinen Schwiegereltern, Hans Jürgen und Margit Birringer, danke ich für das Asyl, die gute Verpflegung und die geflissentliche Ignorierung des tagelang in ihrem Wohnzimmer wütenden Chaos auf dem Höhepunkt des Schreibens.

Last, but not least, möchte ich Tina danken. Ohne ihre Unterstützung und Hilfe, die Versorgung mit Unmengen von Kaffee und Essen, die Assistenz bei der Literaturrecherche in Köln, des stoischen Hinnehmens der Papierstapel in der ganzen Wohnung und die liebevolle Art hätte ich das alles nicht hinbekommen. Ich liebe Dich!